



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

**INTRODUCCIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE HOMOGENEIZACIÓN  
POR ALTAS PRESIONES PARA EL PROCESADO DE LÁCTEOS  
FUNCIONALES EN URUGUAY: LECHE FLUIDA ENTERA  
REDUCIDA EN COLESTEROL.**

**TESIS DE MAESTRIA**

Ing. Quím. Daniela Escobar

2019

**TUTORES:**

Q.F. Tomás López-Pedemonte, PhD

Ing. Quím. Patricia Lema, PhD

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis tutores Tomás López- Pedemonte y Patricia Lema, que me han dado la oportunidad de realizar esta maestría y tener el apoyo necesario de poder llevarla adelante.

A la ANII, la Agencia Nacional de Investigación e Innovación del Uruguay, quien ha financiado el proyecto dentro del cual he podido realizar esta tesis, así como apoyo a la Universidad de la República (UdelaR) para la creación de la Maestría en Ingeniería de alimentos dentro de la misma.

A Santiago Jorcín quien, como parte del equipo, estuvo apoyando en todo el proyecto, principalmente con el equipo de homogeneización de altas presiones, para que este estuviese siempre a disposición para su uso.

A Ronny Pelaggio, quien no solo estableció el contacto con un productor lechero para que nos proveyera de leche de buena calidad, sino también acompañando en varias madrugadas en la carretera de la leche para cada experiencia.

A Gustavo Domínguez quien siempre dio aliento y fuerza para continuar con la tesis, así como todos mis compañeros del equipo de Latitud que de una u otra manera siempre están.

Por último, a mi familia que son mi todo, mi vida y quienes me dan fuerza, alegría, esperanza y hacen que yo quiera dar lo mejor de mí, no solo por mí misma, sino para ser un humilde ejemplo para mis hijos de que en la vida nada se consigue sin no es con esfuerzo.

## TABLA DE CONTENIDOS.

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCION.....	9
2.1 Colesterol y salud.....	9
2.2 La leche.....	11
2.3 Lípidos en leche.....	12
2.4 Colesterol en leche.....	19
2.5 Remoción de colesterol en leche.....	21
2.6 Homogeneización por altas presiones.....	25
2.7 Efectos de la UHPH en los componentes de la leche.....	31
2.7.1 Inactivación microbiana.....	31
2.7.2 Efectos en proteínas, grasas y otros componentes.....	35
2.8 Efecto combinado del uso de la $\beta$ -CD con UHPH.....	37
3. OBJETIVO.....	38
3.1 Objetivos específicos.....	38
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4.1 Remoción de colesterol.....	
4.2 ....	39
4.3 Análisis de colesterol.....	40
4.4 Análisis de tamaño de glóbulos grasos .....	41
4.5 Evaluación sensorial del agrado general.....	42
4.6 Recuento de Aerobios Mesófilos Totales.....	43
4.7 Color.....	43
4.8 Análisis estadísticos.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Remoción de colesterol.....	44
5.2 Incremento de temperatura en el proceso de homogeneización por altas presiones.....	48
5.3 Tamaño de partícula del glóbulo graso de la leche.....	49
5.4 Color.....	52
5.5 Evaluación microbiológica.....	53
5.6 Aceptabilidad por consumidores.....	54

6. DISCUSIÓN.....	54
6.1 Incremento de temperatura.....	54
6.2 Remoción de colesterol.....	56
6.3 Tamaño de partícula del glóbulo graso de la leche.....	59
6.4 Color.....	63
6.5 Evaluación microbiológica.....	64
6.6 Aceptabilidad por consumidores.....	65
7. CONCLUSIONES.....	66
8. BIBLIOGRAFIA.....	67
9. ANEXOS.....	81
9.1 Diseño Experimental.....	81
9.2 Tabla de remoción de colesterol y datos estadísticos.....	82
9.3 Tabla de tamaño de glóbulo graso y datos estadísticos.....	83
9.4 Tabla de color y datos estadísticos.....	85

## TABLA DE ABREVIACIONES

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
AS	Área superficial específica
Ci	Concentración de colesterol en la leche cruda inicial
Cf	Concentración de colesterol en la leche finalizado el proceso de extracción según cada tratamiento
CLSM	Microscopía confocal de barrido láser
D[4,3]	Diámetro de volumen medio o valor de diámetro medio ponderado en volumen, también denominado media “de Broucker”.
D[3,2]	Diámetro medio ponderado de la superficie equivalente, denominado también “Diámetro medio Sauter”.
D[v, 0.50]	Diámetro por debajo del cual se encuentran el 50% del volumen de partículas.
D[v, 0.90]	Diámetro por debajo del cual se encuentran el 90% del volumen de partículas.
Di	Diámetro medio del volumen.
HPH	Homogeneización por altas presiones (sigla proveniente del inglés High Pressure Homogenization)
HTST	Alta temperatura y corto tiempo, proveniente del inglés High temperature Short time
MG	Materia grasa
MGGL	Membrana del glóbulo de la grasa de la leche
PC	Fosfatidilcolina

PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PM	Peso molecular
PS	Fosfatidilserina
SM	Esfingomielina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida(Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
Te	Temperatura de entrada al homogeneizador por altas presiones
Ts	Temperatura de salida del homogeneizador de altas presiones
UHPH	Ultra alta presión de homogeneización
UHT	Ultra alta temperatura, proveniente del inglés Ultra High Temperature
Vi	Volumen de los glóbulos grasos
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -ciclodextrina
$\alpha$ -CN	$\alpha$ -caseína
$\beta$ -CN	$\beta$ -caseína
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
$\beta$ -Lg	$\beta$ -lactoglobulina
$\gamma$ -CN	$\gamma$ -caseína
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -ciclodextrina
% m/m	Porcentaje masa-masa
°C	Grados centígrados
g	Gramos

h	Horas
L	Litros
L/h	Litros por hora
MPa	Megapascal
mg	Miligramos
min	Minutos
nm	Nanómetros
µm	Micrómetros
s	Segundos
ufc/mL:	Unidades formadoras de colonia por mililitro
L*	Luminosidad
a*	Valores de componente cromático: negativo, verde; positivo, rojo
b*	Valores de componente cromático: negativo, amarillo; positivo, azul

## 1. RESUMEN

La tendencia al consumo de alimentos saludables, nutritivos y naturales viene aumentando en los últimos años. En parte es debido a la creciente preocupación por reducir el riesgo de contraer enfermedades crónicas y debilitantes, en especial, trastornos cardiovasculares, obesidad, cáncer, osteoporosis y diabetes. Existe una correlación entre el alto consumo de colesterol y el riesgo de contraer enfermedades coronarias e hipertensión. La leche entera de vaca es un alimento nutritivo y de alto consumo, en la grasa se encuentran compuestos que presentan beneficios para la salud, como ser el ácido linoleico conjugado (CLA), vitaminas liposolubles (principalmente vitamina D) y antioxidantes. Remover el colesterol de la leche entera conservando la grasa, presenta la ventaja de mantener estos compuestos que son de interés para la salud. Además, la grasa aporta características organolépticas (palatabilidad, sabor, aroma y textura), atractivas para los consumidores de productos lácteos.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso para obtener leche entera reducida en colesterol, combinando de forma sinérgica, el uso de dos estrategias tecnológicas: la adición de  $\beta$ -CD y la utilización de ultra alta presión de homogeneización (UHPH), buscando la eficiencia de proceso, con la potencialidad de ser utilizada para productos saludables.

Se estudió la extracción del colesterol en leche cruda y homogeneizada a altas presiones (100, 200 y 300 MPa) con adición de  $\beta$ -CD (0, 0,1; 0,3 y 0,6 %). Se midieron los cambios en tamaño de los glóbulos grasos y el color (método cielab) de la leche que resultan de la aplicación del proceso. A la leche que tuvo mayor remoción de colesterol se le hizo recuento de aerobios mesófilos totales y se evaluó sensorialmente por un panel de consumidores al que no se le informó que se trataba de un producto reducido en colesterol. Se evaluó el agrado general en comparación con leche comercial pasteurizada (HTST) y leche ultra pasteurizada (UHT). Los mayores porcentajes de remoción de colesterol obtenidos fueron 87 y 89% utilizando  $\beta$ -CD al 0,6 % con presiones de homogeneización entre 200 y 300 MPa. En esas condiciones se obtuvieron concentraciones menores a 2 mg de colesterol/100 g de leche, por lo que se

puede declarar como “sin colesterol” según la reglamentación vigente. La utilización de UHPH en leche redujo el tamaño del glóbulo graso potenciando el uso más eficiente de  $\beta$ -CD. El estudio de color de la leche tratada con UHPH y  $\beta$ -CD presentó valores de  $L^*$  superiores a la leche cruda. Se logró desarrollar un proceso combinado homogeneización por ultra altas presiones con remoción química para obtener leche entera sin colesterol aceptable sensorialmente y con una carga microbiológica  $\leq 100$  ufc/ml después de 6 días de almacenada a 4°C. Se dispone de un proceso que permitiría elaborar derivados lácteos reducidos en colesterol.

## **2. INTRODUCCION**

### **2.1 Colesterol y salud.**

Las tendencias de consumo de alimentos a nivel mundial apuntan a un crecimiento de los alimentos saludables y sostenibles, siendo además enfatizadas por recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Existe un interés mundial en reducir el riesgo de los factores asociados a enfermedades crónicas y debilitantes, en especial, trastornos cardiovasculares, obesidad, cáncer, osteoporosis y diabetes. El consumo de alimentos con colesterol elevado es una de las preocupaciones de la población, debido a la correlación que existe entre su consumo en exceso y el riesgo de contraer enfermedades coronarias e hipertensión. La fuerte asociación entre el colesterol sérico y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares es uniforme a través de las diferentes culturas (Menotti et al., 2008).

Varios factores de riesgo están involucrados en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares. Dentro de ellos se distinguen los que no pueden ser modificables, como ser la edad, sexo y genética; y sobre los que se puede ejercer un control como la dieta, el tabaquismo, el estrés y el sedentarismo. Uno de los factores de riesgo modificables es el colesterol dietético, que en concentraciones elevadas ha sido relacionado con el desarrollo de la disfunción endotelial y la aterosclerosis. (Oggioni et al., 2015)

Las enfermedades no transmisibles (cardiovasculares, cáncer, respiratorias crónicas y diabetes) siguen siendo las principales causas de mortalidad y enfermedades de los uruguayos, siendo comparables en los países que presentan los mismos niveles de desarrollo y estructuras demográficas. Las enfermedades del sistema circulatorio son la primera causa de muerte en Uruguay, causando el 28,1% de las defunciones. Entre los factores de riesgo asociados a las enfermedades cardiovasculares, se encuentran la hipertensión y el colesterol siendo estas las enfermedades “silenciosas”, que se presentan y progresan sin que las personas que lo sufren se den cuenta. La prevalencia del colesterol elevado, si bien ha disminuido desde el año 2006 al 2013, de 29% a 21,5% en la población que se encuentra entre 25 y 64 años, sigue siendo aún una preocupación para las autoridades sanitarias (Presidencia de la República Oriental del Uruguay, Reporte Uruguay 2015).

En busca de disminuir factores de riesgo en la salud, la remoción del colesterol en leche y otros alimentos ha sido objeto de estudio (Lee et al., 1999, García Rojas et al., 2007, Dias et al., 2010, Sun et al., 2011, Jung et al., 2013, Thair et al., 2013a, Oliveira et al., 2015 y Gómez-Cortés et al., 2015). Otra tendencia es el agregado de fitoesteroles en leche, yogures, panificados y cereales (Clifton et al., 2004 y Thomsen et al., 2004) que son asociados con la inhibición de la absorción del colesterol.

La asociación del colesterol proveniente de los productos de origen animal con las enfermedades cardiovasculares ha influenciado el mercado de alimentos. Las margarinas vegetales se consideraron un buen sustituto de la manteca, aunque años después han sido cuestionadas por el alto contenido de ácidos grasos trans. El consumo de productos descremados (0% grasa) fue promovido en varios países y actualmente existen en el mundo una gran variedad de productos lácteos con agregado de fitoesteroles que ayudan a la reducción de niveles de colesterol LDL (colesterol malo). En cuanto a productos lácteos que están disponibles en el mercado nacional relacionados con enfermedades cardiovasculares, se encuentra “Vidacol” de la empresa “La serenísima” y “Vital más Lowcol” de la empresa “Conaprole”, ambos alimentos a base de yogur descremado con fitoesteroles añadidos. En el mercado internacional empresas

multinacionales comercializan distintos productos atendiendo al mercado de la prevención de enfermedades cardiovasculares.

## **2.2 La leche**

La leche es el primer alimento que reciben las distintas especies de mamíferos para su nutrición y la inmunización necesaria en la primera etapa de la vida. La leche de vaca es un alimento clave en la alimentación humana, por su valor nutricional y energético, y ha formado parte de la dieta desde al menos 10000 años (Fernández et al., 2015).

Bromatológicamente, la leche es definida como el producto integral del ordeño total e ininterrumpido de hembras lecheras sanas, adecuadamente nutridas y no fatigadas, recogidas en forma higiénica y sin contener calostro (Reglamento Bromatológico Nacional, 1994). Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es un fluido acuoso, complejo, formado por la presencia de varias fases en equilibrio. Se puede decir que es una emulsión de una fase grasa dispersa y una fase acuosa coloidal continua, en la que coexisten varios estados: emulsión (materia grasa bajo forma globular), suspensión (de caseína ligada a las sales minerales) y solución (acuosa, como medio continuo) (Alais, C. 1985).

La leche está compuesta por diferentes componentes químicos, los que son de interés tanto por su valor nutricional, como para la comprensión y optimización de los procesos de elaboración de los distintos productos lácteos.

Los principales componentes de la leche bovina se muestran en la Figura 1.

<b>LECHE</b>	<b>AGUA</b> (85,3 - 88,7 %)				
	<b>SÓLIDOS DE LA LECHE</b> (11,3 - 14,7%)	<b>GRASA</b> (2,5 - 5,5%)			
		<b>SÓLIDOS NO GRASOS</b> (7,9 - 10%)	<b>LACTOSA</b> (3,8- 5,3%)		
			<b>MINERALES</b> (0,57-0,83%)		
			<b>PROTEINAS</b> (2,3-4,4%)	<b>CASEINAS</b> (1,7- 3,5%)	
		<b>PROTEINAS DEL SUERO</b> (0,6- 0,9%)			
		<b>ENZIMAS</b>			

**Figura 1.** Composición aproximada de la leche de vaca en % (m/m). Elaboración realizada por datos adaptados de Walstra, et al., 2006.

La composición de la leche es variable, y depende de diversos factores: 1) *genéticos*, variabilidad que se presenta entre razas diferentes y también dentro de una misma raza, según la procedencia de cada animal; 2) *ambientales*, dependiendo de la alimentación suministrada a las vacas y el tipo de explotación del rodeo, así como los factores climáticos en relación a la estación del año; 3) *fisiológicos*, que dependen del ciclo de lactación, edad y número de preñez del animal; 4) *la salud e higiene del animal* y 5) *los diferentes ordeños*. Todos estos factores afectan de distinta manera a cada componente de la leche, siendo la materia grasa el componente que presenta mayor variabilidad y la lactosa la menor (Walstra, et al., 2006).

### **2.3 Lípidos de la leche**

Los lípidos se secretan en la leche en forma de gotas citosólicas llamadas glóbulos grasos (García et al., 2014). Éstos están formados principalmente por triglicéridos, en un porcentaje entre 97 y 98 %. En menor proporción se encuentran (0,2 a 1,0 %) lípidos complejos como son los fosfolípidos, los que se presentan en forma de lecitina, fosfatidilcolina, cefalinas, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina, fosfatidilinositol, cerebrósidos y

plasmalógenos. Aproximadamente un 1% está constituido por esteroides (colesterol, escualeno, etc.), carotenos (Provitamina A), tocoferoles (Vitamina E), vitaminas D y K (Jensen, 2002 y García et al., 2014)

Los triglicéridos del glóbulo graso son sintetizados en el retículo endoplásmico, donde se acumulan y son liberados en forma de gotitas discretas al citoplasma, recubiertos con lípidos y proteínas polares (Argov et al., 2008). Las gotas lipídicas pequeñas son liberadas en el citosol de la célula epitelial mamaria y se fusionan entre sí, originando gotas lipídicas de mayor tamaño llamadas *macrodroplets* o *droplets* lipídicos citoplasmáticos. Estos son secretados envolviendo a la membrana plasmática de la célula epitelial que va a pasar a formar parte de la membrana del glóbulo graso (Heid y Keenan, 2005 y García et al., 2014). Algunas gotas de lípidos crecen sustancialmente entre el momento de su formación y su secreción. Además, después de la secreción, algunas de los glóbulos de grasa grandes de la leche pueden fusionarse con otros más pequeños y por lo tanto aumentar su diámetro (Argov et al., 2008).

El 95% de la grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos grasos emulsionados en fase acuosa, cuyo tamaño varía entre 1 hasta 10 y 20  $\mu\text{m}$  según lo reportado por distintos estudios (Jensen, 2002; Michalski et al., 2004; Couvreur et al., 2007 y Logan et al., 2014), presentando un diámetro medio entre 4 y 5  $\mu\text{m}$  (Lopez, 2011b). Según Logan et al. (2014), el tamaño dentro de un mismo rebaño puede variar desde 2,7 a 5,7  $\mu\text{m}$ , siendo esta diferencia relevante en las propiedades nutricionales y funcionales de la leche.

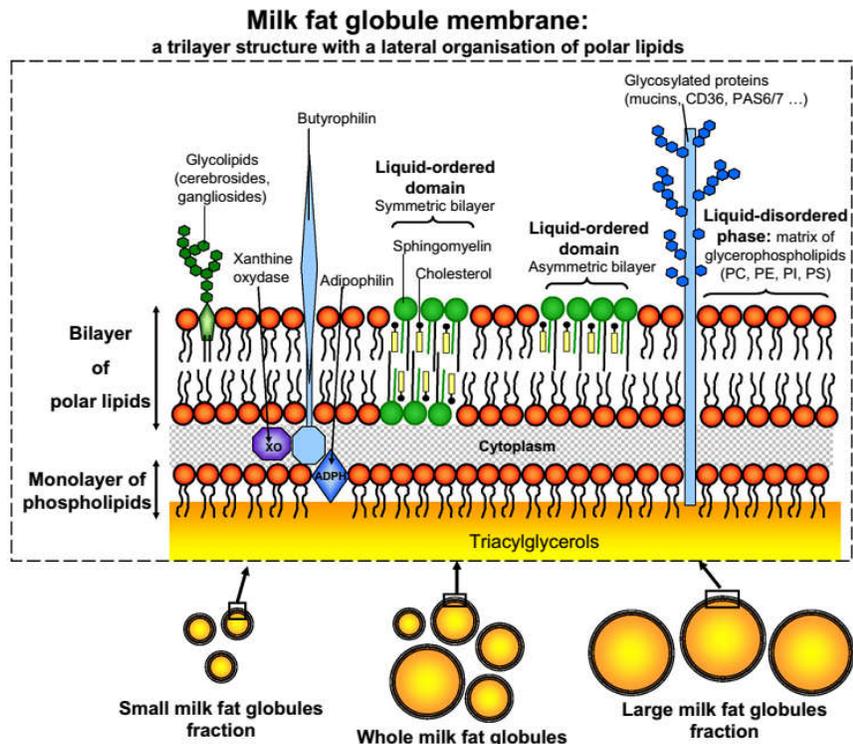
El diámetro medio del glóbulo graso en la leche bovina y su distribución dependen de diversos factores, entre ellos las distintas especies (Holstein, Jersey, Frisia, Suiza Brown, etc.), la etapa de lactancia (Michalski et al., 2005, Lopez, 2011a y Melisati et al., 2014), la alimentación animal y las condiciones fisiológicas (Fleming et al., 2017). Según Couvreur et al., (2007) las vacas con mayor potencial de actividad metabólica mamaria secretan glóbulos grasos más pequeños.

Los distintos tamaños de glóbulos tienen diferente relación de composición entre triglicéridos y fosfolípidos. La composición de los fosfolípidos de la membrana y

el perfil de ácidos grasos juegan un papel importante en las propiedades físicas y funcionales de la membrana del glóbulo de grasa de la leche (Argov et al., 2008)

Estos glóbulos de grasa están recubiertos por una membrana biológica, llamada membrana del glóbulo de la grasa de la leche (MGGL), cuyo espesor varía entre 10 y 50 nm. La estructura y composición de la MGGL depende de los mecanismos de secreción de la leche y se compone principalmente de lípidos polares, tales como glicerofosfolípidos y esfingolípidos, colesterol, proteínas, glicoproteínas y enzimas. (Lopez et al., 2010; Lopez et al., 2011 b, Logan et al., 2014 y Castro-Gómez et al., 2015)

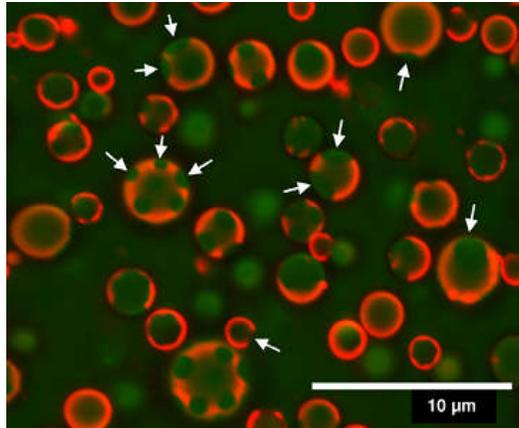
La estructura de la membrana es compleja y ha sido representada por diferentes modelos. La representación de la MGGL como una estructura en tricapa, ha sido el modelo más utilizado en investigaciones recientes. En la Figura 2 se muestra una representación de la membrana con una estructura de tres capas con una organización lateral de lípidos polares. En contacto con el núcleo de triglicéridos del glóbulo graso se encuentra una primera monocapa lipídica originaria del retículo endoplasmático, seguida de una capa proteica electrodensa y, por último, una bicapa lipídica. En la bicapa de lípidos polares se encuentra una fase líquida desordenada de glicerofosfolípidos (PC, PE, PI, PS) y una fase de dominio líquida ordenada rica en esfingomielina (SM), dentro de la cual se encuentra el colesterol formando dominios líquidos ordenados.



**Figura 2.** Estructura de membrana adaptado de Lopez et al., 2011b.

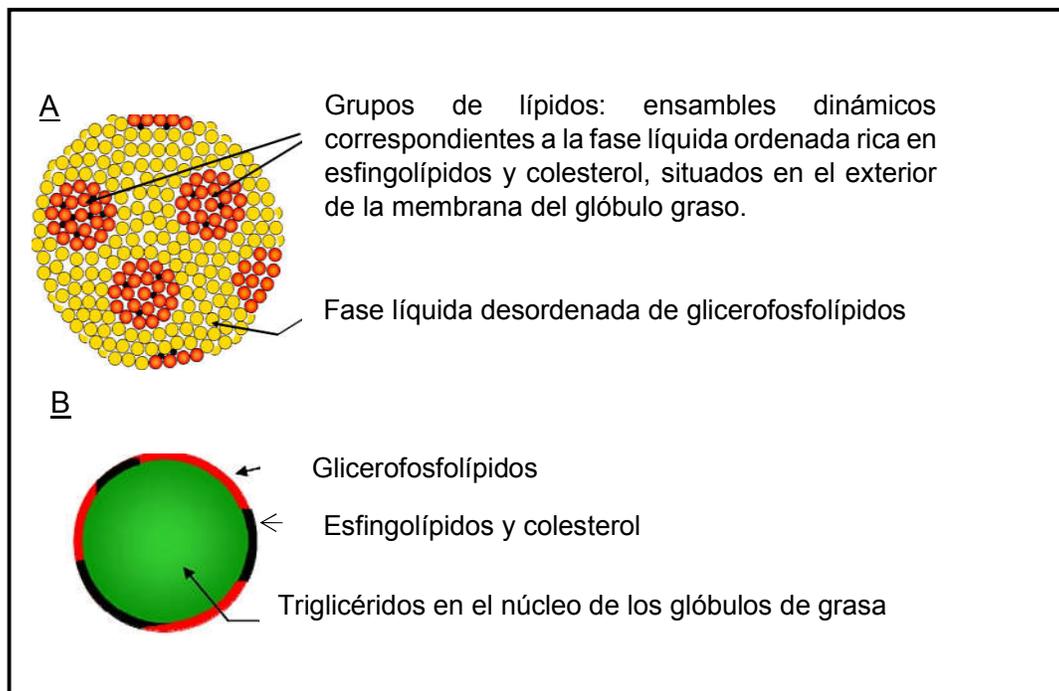
Estudios realizados utilizando microscopía confocal de barrido láser (CLSM), han demostrado heterogeneidades en la organización lateral de lípidos y glicoproteínas polares en la MGGL de leches bovinas enteras (Lopez et al., 2010) (Figura 3).

En la Figura 2 se observa una distribución heterogénea de glucolípidos y glicoproteínas en la MGGL, con las cadenas de carbohidratos de glucoproteínas y glucolípidos dirigidas hacia la superficie externa del glóbulo de la grasa de la leche.



**Figura 3.** Organización de los lípidos polares en la membrana de los glóbulos grasos de diferentes tamaños de la leche entera. Tomada de Lopez et al., 2011b

En la Figura 4 se muestra una representación tridimensional de la organización de los lípidos polares en la membrana de los glóbulos de grasa de la leche, observándose la segregación de esfingomielina en micro-dominios en una matriz de glicerofosfolípidos en la fase líquido-desordenada.



**Figura 4.** Organización de membrana de glóbulos grasos (A) tridimensional (B) sección transversal. Adaptado de Lopez et al 2010 y Lopez et al 2011 b.

Se ha demostrado que el colesterol influye fuertemente en la organización de las capas lipídicas formadas en la membrana del glóbulo graso, actuando directamente en la formación de los dominios, no habiéndose dilucidado aún como éste puede afectar la inserción de proteínas de la membrana o adsorción de las enzimas en el dominio (Murthy et al., 2015).

La composición de la MGGL de la leche cruda, es afectada cuando se utilizan procesos como es la homogeneización, que disminuye el tamaño de glóbulo graso de la leche y aumenta el área total superficial de la MGGL. Cuando este fenómeno ocurre se incorporan proteínas a la misma, se estima que sólo el 10% de la membrana del glóbulo graso total después de homogeneización está cubierto por el material original de la membrana (Argov et al., 2008).

La parte interior del glóbulo graso está formado por triglicéridos, y la proporción de ácidos grasos es variable y ésta puede ser alterada principalmente por los siguientes tres factores: alimentación, animales (individualidad de la vaca y etapa de lactancia) y medio ambiente. Se muestra en la Tabla 1 el contenido medio (% m/m) en ácidos grasos mayoritarios en grasa láctea de leche de vaca (Jensen, 2002).

**Tabla 1.** Contenido medio (%) en ácidos grasos mayoritarios en grasa láctea de leche de vaca. Datos suministrados por Jensen, 2002.

<b>Tipos de ácidos</b>	<b>Ácidos grasos</b>	<b>Átomos de Carbonos</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Ácidos saturados</b>			
Volátiles solubles	Butírico	C4:0	2-5
	Caproico	C6:0	1-5
Volátiles insolubles	Caprílico	C8:0	1-3
	Cáprico	C10:0	2-4
	Laurico	C12:0	2-5
Fijos	Mirístico	C14:0	8-14
	Valérico	C15:0	1-2
	Palmítico	C16:0	22-35
	Margárico	C17:0	0,5-1
	Esteárico	C18:0	9-14
	Aráquico	C20:0	0,2
<b>Ácidos insaturados</b>			
Monoenos	Palmitoleico	C16:1	1-3
	Oleico	C18:1	20-30
Polinsaturados no conjugados	Vaccénico (trans)	C18:2	2-3
	Linoleico	C18:2	1-3
	Linolénico	C18:3	0.5-2
	Araquidónico	C20:2	0,3
Poliinsaturados conjugados	CLA	C18:2 conjugado	0,3-1

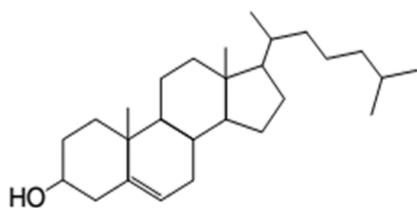
La grasa de la leche presenta mayoritariamente ácidos grasos saturados, especialmente los fijos, los cuales han sido cuestionados por muchos años por su efecto adverso en la salud. Sin embargo, según informes recientes no se ha encontrado ninguna asociación entre el consumo de ácidos grasos saturados en la dieta y la enfermedad cardiovascular (Volek et al., 2012).

Los glóbulos grasos de la leche presentan componentes que se consideran benéficos para la salud humana, como ser las vitaminas liposolubles (riboflavina, vitamina A, folatos, vitamina D). También contiene ácido linoleico conjugado (CLA) que es reconocido como agente para la inhibición del cáncer, arteriosclerosis, reducción de los síntomas de diabetes mellitus tipo II y del mejoramiento de las funciones inmunológicas (Siurana y Calsamiglia, 2016). Los ácidos de cadena corta (C6, C8 y C10) se han descrito como poseedores de actividades antibacterianas y antivíricas (Rodríguez-Alcalá et al., 2014). En los últimos años se ha encontrado que presentan un alto potencial como compuestos bioactivo, los fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina), y esfingolípidos (glucoceramidas, lactosilceramida y esfingomielina) que se encuentran en la MGGL (Castro-Gómez et al., 2015). Se ha encontrado que poseen beneficios para la salud, como ser, en la regulación de las respuestas inmunitarias, la modulación del microbioma intestinal, y protección contra infecciones bacterianas (Ortega-Anaya y Jiménez-Flores, 2019)

Las grasas además de su rol nutricional juegan un papel fundamental en la formulación de numerosos productos lácteos, ya que contribuyen en gran medida a las propiedades de textura, aroma y sabor (Coppa et al., 2011, McGhee et al., 2015 y Logan et al., 2017).

#### **2.4 Colesterol en leche.**

El colesterol (3-hidroxi-5,6 colesteno) es una molécula que se encuentra en los alimentos de origen animal. En la grasa de la leche, los esteroides son los componentes minoritarios (0.3% del total lipídico). El componente principal es el colesterol con un 95% de los esteroides totales. Es un compuesto apolar y fácilmente se asocia con fosfolípidos (Taylor and Gibbon, 2011). El colesterol es el mayor componente insaponificable que presenta la leche; presenta la estructura básica de los esteroides formada por un sistema de 4 anillos denominado ciclopentanoperhidrofenantreno con cabeza polar (grupo hidroxilo) y cola apolar, según se muestra en la Figura 5.

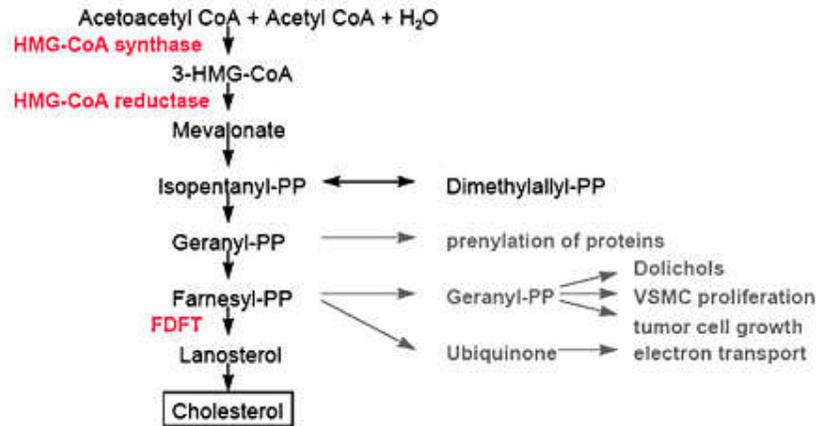


**Figura 5.** Estructura molecular del colesterol. Fuente (Walstra et al, 2006)

El colesterol se encuentra principalmente en la membrana del glóbulo graso. También existe un pequeño porcentaje en la parte sérica que está ligado a la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg); y además hay alrededor de un 10% que se esterifica. La leche de vaca contiene aproximadamente entre 10 a 20 mg / dl de colesterol y según Viturro et al. (2009) puede llegar hasta 30 mg / dl. Si se expresa sobre la grasa total, se ha reportado que tiene entre 308 a 606 mg de colesterol /100 g de grasa en la leche entera (Jensen, R. 2002 y Precht et al., 2001).

La variación de la concentración de colesterol en la leche depende de varios factores como la especie, las razas, los individuos, el momento del ciclo de lactancia, la época del año y la alimentación (Browaska et al, 2011 y Bonczar et al., 2016). El contenido de colesterol también está condicionado probablemente al progreso de los procesos bioquímicos del organismo de la vaca, que trabajan en la secreción de colesterol dependiendo estos de factores genéticos (Viturro et al., 2009 y Strzałkowska et al., 2010).

El colesterol en la vaca es sintetizado, según la representación esquemática que se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema de síntesis del colesterol. Extraído de Viturro et al., 2009

## **2.5 Remoción de colesterol en leche**

Existen diferentes métodos para reducir el colesterol, estos pueden ser mediante el uso de agentes físicos, químicos y biológicos.

**Métodos físicos:** Se han estudiado métodos de destilación y cristalización, así como también de extracción con fluidos supercríticos (Ong et al., 1990). Los fluidos supercríticos son sustancias que se utilizan a temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico, con capacidad de difundir como un gas, y son utilizados para procesos de extracción. (Velasco et al., 2007). El dióxido de carbono y etano han sido estudiados para la extracción de colesterol en grasa láctea (Huber et al., 1996; Mohamed et al., 2000; Sahena et al., 2009; Sieber, et al 2011).

**Métodos biológicos:** Existen en la naturaleza distintos microorganismos que degradan al colesterol, entre ellos los géneros *Nocardia* y el *Rhodococcus* que han sido utilizados experimentalmente para la extracción de este compuesto (Watanabe, et al., 1989). *Nocardia labegensis* tiene un alto potencial de degradación de esteroides de grasas animales y vegetales. Si bien *Rhodococcus equis* remueve el colesterol, ha sido cuestionada su utilización debido a su toxicidad por considerarse patógeno, (Sieber et al., 2011).

**Métodos químicos:** Entre ellos se presentan los de extracción sólido-líquido y también líquido-líquido. Han sido reportados estudios que incluyen la extracción

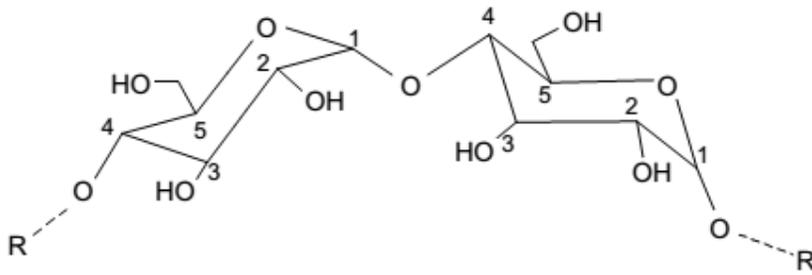
con pectinas de alto metoxilo (Garcia Rojas, et al., 2007), mezclas de aceites vegetales y otros solventes orgánicos (Alonso et al., 2009 y Thair et al., 2013a). Sin embargo, la mayoría de estos métodos son relativamente no selectivos y no se eliminan totalmente los componentes de sabor en el producto (Dias et al., 2010).

La utilización de agentes acomplejantes como es el uso de la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) ha sido objeto de estudio desde hace más de dos décadas en la remoción de colesterol en alimentos de origen animal, como la mayonesa, yema de huevo, leche, mantequilla y queso (Dias et al., 2010). Con el fin de mejorar la eficiencia del complejo que forman las ciclodextrinas con esteroides, se ha estudiado su utilización en conjunto con un método mecánico como es el molino de bolas, para lograr dispersiones sólidas micronizadas libres de solventes y eficientes para la extracción (Rinaldi et al., 2015)

En leche, la utilización de la  $\beta$ -CD es uno de los métodos químicos más estudiados y más rentables desde el punto de vista industrial (Lee et al., 1999; Kim et al., 2004; Kwank, et al. 2004 y Alonso et al., 2009).

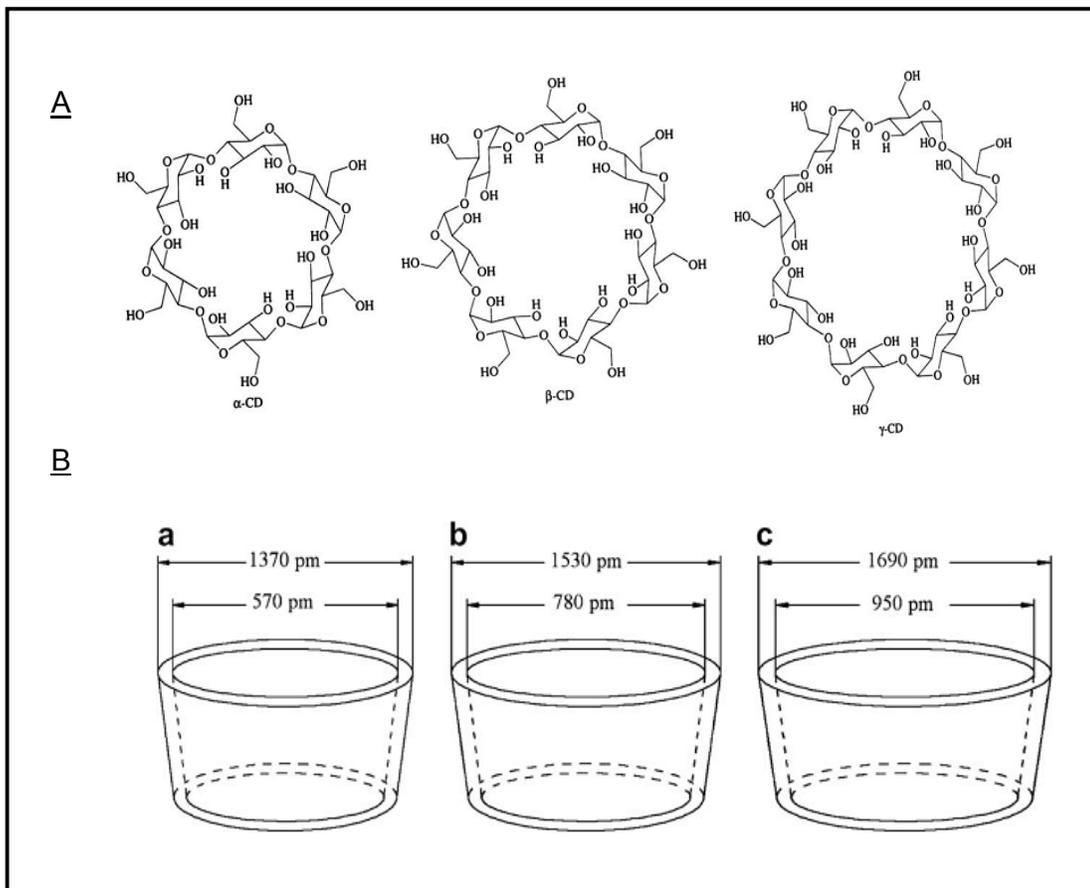
El uso de polvo de  $\beta$ -CD es una de las maneras efectivas para eliminar el colesterol de los productos lácteos. Con el fin de optimizar la utilización del agente acomplejante, en la remoción del colesterol, se han realizado estudios de inmovilización de  $\beta$ -CD en perlas de vidrio sometidas a un proceso de silanización (Kwak et al., 2004) y en esferas de quitosano (Dias et al., 2010). También se han realizado reticulados de  $\beta$ -CD con epíclorhidrina (Kim et al., 2004), y con ácido adípico (Han et al., 2007 y Han et al., 2008).

La  $\beta$ -CD es un oligosacárido cíclico, formado por uniones  $\alpha$ -(1-4) vinculado a la  $\alpha$ -D glucopiranososa que surge de la degradación del almidón por bacterias tales como *Bacillus macerans* (Astray et al., 2009 y Rinaldi et al., 2015). La enzima ciclodextrina.-glucosiltransferasa cataliza la reacción de degradación de la amilosa produciéndose dextrinas cíclicas y acíclicas, que son oligosacáridos de tamaño intermedio. El resultado cíclico se produce por el enlace entre las unidades de glucopiranososa que constituyen las dextrinas. Las uniones realizadas por puentes de oxígeno glicosídicos se muestran en la Figura. 7.



**Figura 7.** Puentes de oxígeno glicosídicos  $\alpha$ -(1,4) entre dos moléculas de glucopiranososa. (Astray et al., 2009)

Las ciclodextrinas son sustancias cristalinas, homogéneas y no higroscópicas. La  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) está compuesta de seis unidades de glucopiranososa, la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) se compone de siete unidades, y la  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) comprende ocho de tales unidades, como se muestra en la Figura 8.



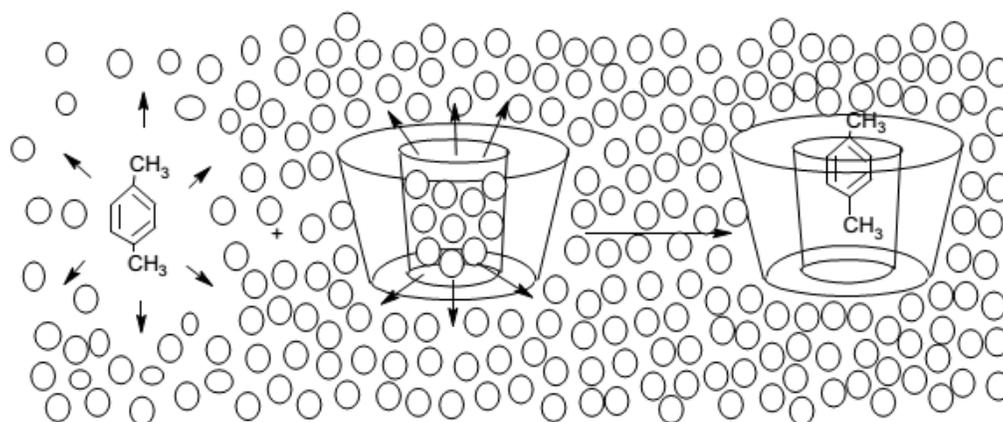
**Figura 8.** (A) Estructura química de las ciclodextrinas:  $\alpha$ -Cd,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD. (B) Dimensiones geométricas aproximadas de: a)  $\alpha$ -CD, b)  $\beta$ -CD y c)  $\gamma$ -CD. (Astray et al., 2009)

La  $\beta$ -CD es un compuesto no tóxico, comestible, no higroscópico, no se absorbe en el tracto gastrointestinal superior, y es completamente metabolizado por la microflora del colon. Es considerada sustancia GRAS (*Generally Recognized as Safe*) en la lista de la Food and Drugs Administration (FDA) de los Estados Unidos de América desde 1998.

Las ciclodextrinas por su disposición presentan una cavidad, cuyo tamaño depende de los arreglos moleculares (Figura 8). El interior de la cavidad que forman las ciclodextrinas son de carácter hidrófobo, debido a que estas, están compuestas por unidades de glucosa y los oxígenos de los enlaces glicosídicos. Mientras que la parte externa es hidrófila debido a la presencia de grupos hidroxilo. Debido al carácter apolar de la cavidad interna de la  $\beta$ -CD ciclodextrina, esta es capaz de formar complejos de inclusión estables con diversos compuestos apolares que presenten el tamaño adecuado. Esta actúa comúnmente como “anfitrión” de diversos “huéspedes”, entre ellos el colesterol. (Kwak et al., 2004; Astray et al., 2009; Tahir et al., 2013a). La estequiometría de la formación del complejo de inclusión, depende del tamaño de la ciclodextrina y de la estructura de la molécula huésped a incluir, siendo la relación estequiometría del complejo  $\beta$ -CD: colesterol de 3:1 (Rozycki et al., 2013).

La  $\beta$ -CD en solución acuosa se encuentra rodeada de moléculas de agua, cuando se agrega a la solución moléculas menos polares (como el colesterol) el agua es desplazada de la cavidad interna, y se forma el complejo de inclusión “huésped-hospedador”. La inclusión en la cavidad del compuesto menos polar se muestra en la Figura 9.

La formación del complejo se debe a factores estéricos, donde la molécula tiene que presentar un tamaño adecuado para desplazar el agua de la cavidad de la  $\beta$ -CD y a factores termodinámicos tal que se produzca un balance favorable de energía en la formación del complejo (Del Valle, 2004 y Astray et al., 2009).



**Figura 9.** Esquema de inclusión de un compuesto menos polar en ciclodextrina (Astray et al., 2009).

El complejo formado entre el colesterol y la  $\beta$ -CD es de fácil separación utilizando métodos de centrifugación o filtración y no altera la composición, ni las características nutricionales de la materia prima; y la vitamina D no es removida en este proceso (Lee et al., 1999; Rozycki et al., 2013).

## **2.6 Homogeneización por altas presiones**

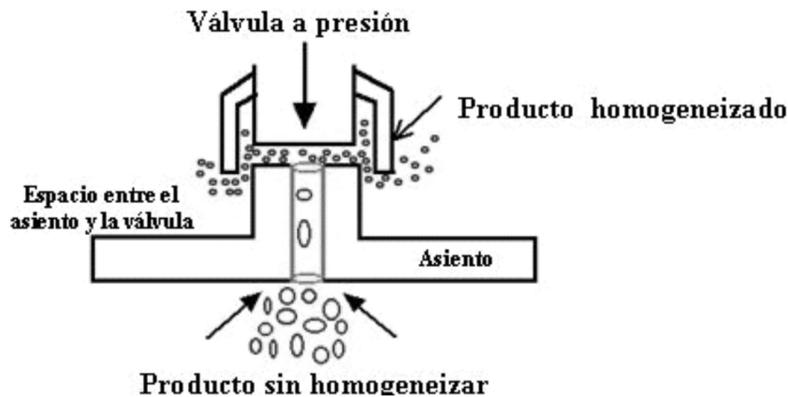
Una de las alternativas promisorias en el área alimentaria es la homogeneización por altas presiones, tecnología que fue tomando interés por su efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos y microorganismos alterantes en leche, jugos y bebidas (Pereda et al., 2007; Suárez-Jacobo et al., 2010; Poliseli-Scopel et al., 2013 y Codina-Torrella et al., 2018). Puede ser considerada como método de conservación alternativo al procesado térmico, con el fin de obtener alimentos seguros que mantengan las características organolépticas y/o nutricionales (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010, Mor-Mur et al., 2010 y Amador Espejo et al., 2015). Otros beneficios y funcionalidades que ofrece la aplicación de esta tecnología, está relacionado al efecto que se produce en los distintos componentes de los alimentos; especialmente en proteínas, grasas y polisacáridos, con la consecuente modificación de las propiedades funcionales y estructurales de productos lácteos y otros alimentos (Escobar, 2010, Escobar et al., 2011, Loveday et al., 2013; Zamora y Guamis 2015).

En el proceso de homogeneización por altas presiones se producen distintos fenómenos físicos, como la alta presión, estrés de cizalla, esfuerzo cortante, pinzamiento, cavitación, ondas de choque, incremento de temperatura, impactos y turbulencia (Shirgaonkar, et al., 1998; Flourey, et al., 2004b y Hayes et al., 2005, Dumay et al., 2013). En su conjunto, estos fenómenos provocan diversos cambios que han permitido numerosas aplicaciones en el campo farmacéutico, de la biotecnología, la nanotecnología y la industria de los alimentos, entre ellas la industria láctea. La ultra alta presión de homogeneización puede ser utilizada para obtener emulsiones muy finas, conseguir la disrupción de cultivos microbianos densos, obtener metabolitos celulares, inactivar enzimas y algunos virus, estabilización de sabores y de antimicrobianos, disminución del tamaño de las macromoléculas y modificación de propiedades funcionales de hidrocoloides (Middelberg, 1995; Flourey et al., 2002; Hayes et al., 2005, Dumay et al., 2013, Betoret et al., 2015). El incremento de los niveles de presión permite la reducción del tamaño de partícula de las emulsiones, llegando según las condiciones hasta nanómetros, permitiendo obtener emulsiones estables. Asimismo, dependiendo de los niveles de presión y temperatura alcanzados se produce la disrupción de células y destrucción de microorganismos cuando se tratan determinados fluidos alimentarios (Middelberg 1995; Pandolfe and Kinney, 1998; Flourey et al., 2002; Miller, 2002; Thiebaud et al., 2003; Flourey et al., 2004a).

La homogeneización por altas presiones se basa en la homogeneización clásica que es una operación unitaria utilizada en la industria láctea, farmacéutica y cosmética desde 1920, donde el fluido es forzado a pasar a través de un orificio (~100 a 300  $\mu\text{m}$ ) a presiones que oscilan entre 10y 60 MPa. Esta práctica es utilizada en la industria láctea para reducir el tamaño de los glóbulos grasos de la leche, evitando la separación de la grasa durante su almacenamiento (Thiebaud et al., 2003). Los avances en la ciencia de los materiales han permitido innovar en el diseño de los homogeneizadores, permitiendo trabajar a muy altas presiones. Con la modificación de los materiales y la geometría se ha logrado alcanzar hasta 400 MPa de presión en equipos a nivel de escala piloto.

Muchos autores consideran la alta presión de homogeneización (HPH) cuando se utilizan presiones hasta 200 MPa y ultra alta presión de homogeneización (UHPH) cuando las presiones utilizadas están entre los 200 y 400 MPa (Dumay

et al., 2013). Los homogeneizadores convencionales presentan válvulas de homogeneización como se muestra en la Figura 10.

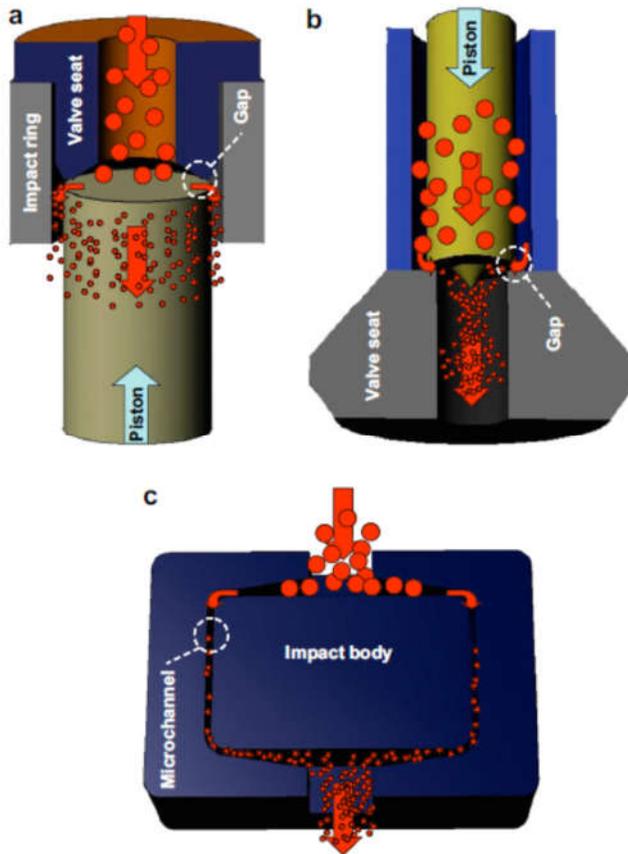


**Figura 10.** Esquema de válvula de homogeneizador convencional (Briñez, W.J. 2008).

Ya en la década de los 90 se comenzó con el desarrollo de una nueva generación de homogeneizadores, utilizando presiones más altas; debido principalmente a los nuevos diseños de válvulas y a la ciencia de los materiales que permitió alcanzar presiones entre 10-15 veces mayores que los homogeneizadores clásicos (Paquin, 1999). Básicamente, un ultra homogeneizador consiste en un generador de alta presión y una válvula diseñada específicamente para trabajar a ultra presión. El fluido procesado pasa a alta presión en una sección donde se encuentra la válvula y sale a través de un espacio que queda libre entre el cabezal y el asiento.

Esta nueva tecnología permitió generar nuevos diseños de las cámaras de homogeneización y permite presiones en líquidos por encima de hasta 500 MPa. Distintos fabricantes empezaron a producir homogeneizadores desde prototipos de escala piloto hasta industriales.

En la Figura 11 se muestran distintos tipos de válvulas de altas presiones (Donsi et al., 2009 b)



**Figura 11.** Esquemas de válvulas de homogeneización: a) Manton-Gaulin APV; b) Standed Fluid Power; c) Microfluidics. (Donsi et al., 2009b)

En los homogeneizadores clásicos de alta presión (APV-Gaulin, Rannie), el fluido es alimentado de manera axial en el asiento y después acelerado radialmente a una pequeña zona situada entre el asiento y el cabezal. Después el fluido sale de la válvula por un resquicio (10 y 30 $\mu$ m), y choca de manera axial con un anillo de impacto antes de llegar de nuevo a presión baja (Kleinig and Middelberg, 1998). Stansted Fluid Power, empresa fabricante de equipos de UHPH ha modificado esta configuración alcanzando presiones de hasta 400MPa, desde el año 2006. Las válvulas diseñadas por esta empresa son de material cerámico y su geometría modificada comparada con las válvulas clásicas (APV-Gaulin). El fluido es alimentado axialmente a lo largo de la parte móvil y después acelerado radialmente entre la parte del asiento y el cabezal. El tamaño de la ranura por donde pasa el fluido es de ( $h \sim 2.5$  y  $2.0 \mu$ m), la velocidad

resultante depende de la presión conseguida entre la válvula y el mecanismo de contrapresión el cual permite su ajuste. La presión conseguida en el fluido es la presión de homogeneización (Floury et al., 2004a y 2004b). Los homogeneizadores de Stansted Fluid power suelen estar equipados con una válvula de alta presión (HP-válvula o de primera etapa) y una válvula de baja presión (LP-válvula o la segunda fase). Los equipos actúan sobre los distintos fluidos dependiendo del diseño de la válvula (características geométricas de la aguja y el asiento, la altura y forma del intervalo de válvula), y también en las características fisicoquímicas del fluido (densidad, viscosidad, velocidad de flujo) (Dumay et al., 2013).

El líquido que atraviesa la válvula se ve afectado por un fenómeno de calentamiento en los pocos segundos de residencia que permanece, esto produce un salto en la temperatura que debe ser medido y en lo posible controlado y evitado por dispositivos de refrigeración eficientes que eviten el sobre-procesamiento de las biomoléculas sensibles al calor.

Este aumento de la temperatura del fluido, es debido no solo al aumento de la presión, sino también a la conversión de energía cinética en térmica de los fenómenos que ocurren dentro de la válvula de homogeneización, como ser la cavitación, esfuerzo de corte, turbulencia y fuerza de cizalla. Este aumento de temperatura es lineal con la presión de homogeneización con saltos desde 15 a 20 °C por cada 100 MPa. (Donsi et al., 2009).

En cuanto al consumo energético, la homogeneización a ultra alta presión permite procesar alimentos fluidos presentando mejor calidad de producto y menor consumo de energía, en comparación con los tratamientos térmicos, considerándose como una de las nuevas tecnologías limpias. Hoy en día el avance de las tecnologías emergentes en la producción de alimentos es una prioridad clave para la sostenibilidad (Zamora y Guamis, 2015 y Valsasina et al., 2017). Actualmente esta nueva tecnología está presente en diversas aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica, generando emulsiones, nanopartículas, siendo utilizada como sistemas portadores de fármacos, así como para la creación de ingredientes funcionales, entre otros usos. Se estima un crecimiento en el mercado de los nanoalimentos, que podría

representar más de U\$S 21 mil millones para el año 2020 (Santillán- Urquiza et al., 2017). Sin embargo, no se ha logrado aún implementarlo en la industria alimentaria, si bien presenta potenciales aplicaciones para leches, jugos y bebidas vegetales. (Zamora y Guamis, 2015).

Para el uso de esta tecnología en la industria de alimentos, sería necesario la disponibilidad de equipos que puedan satisfacer las necesidades de presión requerida para el procesamiento en relación a la capacidad operativa de cada empresa.

Si bien los avances en la ciencia de materiales han permitido el aumento de la presión de operación, se requiere diseños de equipos que sean resistentes a las mismas, lo que impacta directamente en los costos. Esto repercute directamente en los equipos que se han ido desarrollando en el mercado, encontrándose en plaza que los equipos que requieren alta presión y ultra alta presión presentan menor capacidad (l/h) operativa que los homogeneizadores clásicos.

Actualmente existen diversos equipos de homogeneizadores industriales clásicos (Gaulin- Rannie) que operan desde 10 MPa a 60 MPa con flujos de operación entre los 1000 y 45000 l/h, llegando en algunos casos a 100 MPa para una capacidad de 2500 l/h. Otra de las empresas más reconocidas en equipamiento industrial es Niro-Saovi, la que presenta homogeneizadores de distintos modelos, con distintas capacidades y presiones de operación, los equipos que llegan hasta un máximo de 150 MPa procesan como máximo 4000 l/h a esa presión operacional.

Existen en el mercado homogeneizadores con presiones de operación en el rango de la ultra-alta presión de homogeneización, aunque con capacidades limitadas. Empresas como Avestin (Ottawa, Canadá), Bee International (South Easton, USA), Microfluidics International Corporation (Newton, USA), Gea Niro Soavi S.p.A (Parma, Italia), Nanojet Haskel (Burbank, USA), APV Systems (Unna, Alemania), IKA (Staufen, Alemania), FBF Italia (Parma, Italia) y Stansted Fluid Power (Essex, UK), han innovado en equipos de homogeneización a altas presiones, con distintas presiones máximas operativas y capacidades. A modo de ejemplo se encuentran en el mercado homogeneizadores con 200 MPa y 1000 l/h (Avestin); 300 MPa y 1500 l/h (Bee internacional); y para la escala piloto

la empresa Stantsted Fluid Power ha diseñado homogeneizadores de hasta 400 MPa con 120 l/h.

## **2.7 Efectos de la UHPH en los componentes de la leche**

### **2.7.1 Inactivación microbiana**

La homogeneización por altas presiones es una de las tecnologías de tratamiento no térmico estudiada como alternativa a la pasteurización para la conservación de los fluidos alimenticios, por lo cual existen numerosos estudios de la disminución de la carga microbiana en la leche y otros alimentos líquidos. Ha sido ampliamente demostrada su eficacia en la reducción de la flora nativa de la leche, así como el efecto sobre distintos microorganismos patógenos y sobre bacterias perjudiciales para la calidad de la leche.

La permeabilidad de las membranas biológicas de los microorganismos es afectada por distintos efectos físicos que ocurren dentro del circuito de alta presión que poseen los equipos. Por lo tanto, el resultado de la inactivación microbiana es variable dependiendo de: la presión de homogeneización, la temperatura de entrada de la leche, el equipo utilizado (diseño de la válvula y de la máquina), así como el número de pases por equipo.

En la Tabla 2 se recopilan resultados de estudios realizados por distintos autores sobre la reducción de la carga de bacterias patógenas y perjudiciales de la calidad de la leche. Los distintos microorganismos, así como las distintas especies presentan diferente resistencia al tratamiento. El compromiso entre las variables tecnológicas para una adecuada inactivación, es vital para lograr un alimento inocuo.

Uno de los patógenos estudiado por diversos autores, que constituye un peligro para la salud y puede ser encontrado en los alimentos y en el medio ambiente es *Listeria monocytogenes*. Según estudios realizados por Roig-Sagues et al., (2009) en leches enteras y descremadas a 6 °C entre 200 y 400 MPa, se encontraron las mayores reducciones microbianas cuando se utilizó leche entera

de 3,6% de materia grasa a 300 MPa (5.8 log ufc/mL) y 10% de materia grasa a 400 MPa (7,5 log ufc/mL). El efecto de la grasa láctea en la inactivación microbiana también fue estudiado por Briñez et al., 2006, en *Escherichia coli* ATCC10526, que encontraron que la utilización de leche entera produce mayor reducción microbiana que la leche descremada. Sin embargo, en publicaciones en las que se utilizó *Listeria innocua* se observó una mayor reducción microbiana en las leches semi descremadas (2% de materia grasa) que en las enteras (3,4% de materia grasa) a una temperatura de 28°C y 200 MPa (Kheadr et al., 2002). En *Staphylococcus aureus* se encontró que a 300 MPa la reducción fue de 3,4 log ufc/mL utilizando una temperatura de entrada al equipo de 4 ° C, pero si se aplica 20 °C se llega a 4 log ufc/mL (Briñez et al., 2007). Sin embargo, Ruiz-Espinosa et al., (2013) con un estudio de superficie de respuesta encontró que se alcanza una reducción de 5 log ufc/mL a 25°C utilizando 5 pasajes a 202 MPa o 4 pasajes con 232 MPa.

**Tabla 2.** Reducción de carga de bacterias patógenas y bacterias perjudiciales de la calidad de la leche utilizando homogeneización por altas presiones.

Microorganismo	Tipo de leche	Presión (MPa)	Te (°C)	Ciclos de reducción log (ufc/ml)	Autores
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entera	300	6	3,4	Briñez et al 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entera	300	20	4,0	Briñez et al 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entera	202 (5 pases)	25	5,0	Ruiz-Espinosa et al 2013
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entera	232 (4 pases)	25	5,0	Ruiz-Espinosa et al 2013
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Entera	300	6	0,0	Briñez et al 2007
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Entera	300	20	3,6	Briñez et al 2007

<i>Listeria innocua</i>	Entera	300	24	1,8	Picart et al 2006
<i>Listeria innocua</i>	2% grasa	200	28	3,0	Kheadr et al., 2002
<i>Listeria innocua</i>	3,4% grasa	200	28	2,0	Kheadr et al., 2002
<i>E.coli ATCC10526</i>	Entera	300	20	4,3	Briñez et al., 2006
<i>E.coli ATCC10526</i>	Descremada	300	20	3,4	Briñez et al 2006
<i>E.coliO157</i>	Entera	300	20	3,9	Briñez et al., 2006
<i>E.coliO157</i>	Descremada	300	20	3,5	Briñez et al., 2006
<i>Pseudomonas fluorens</i>	Entera	200	10	6,0	Hayes et al., 2005
<i>Pseudomonas fluorens</i>	Entera	300	24	4,0	Picart et al., 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,3 % grasa	200	6	1,1	Roig- Sagues et al., 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,6 % grasa	200	6	1,3	Roig- Sagues et al., 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,3 % grasa	300-400	6	4,7	Roig- Sagues et al., 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,6 % grasa	300-400	6	5,8	Roig- Sagues et al., 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	10% grasa	200	6	2,8	Roig- Sagues et al., 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	10% grasa	300-400	6	7,5	Roig- Sagues et al., 2009

Se han alcanzado inactivaciones eficaces de la microbiota nativa de la leche (aerobios totales, psicótrofos, coliformes, lactococcus, enterococcus, pseudomonas, lactobacilus) utilizando presiones entre 200-400 MPa y temperaturas mayores a los 20 °C (Thiebaud et al., 2003; Hayes and Kelly 2003a, Hayes et al., 2005, Pereda et al., 2007). Según Pedras et al., 2012 los resultados obtenidos en evaluaciones realizadas con la microflora nativa de leche por HPH son similares a la pasteurización térmica, indicando que esta tecnología puede alcanzar una vida útil similar de la leche pasteurizada, aunque esto depende de las condiciones operacionales.

En leche cruda con presiones de 250 MPa y 45 °C se encontraron reducciones de 4,48 y 3,06 ciclos logarítmicos en recuentos de bacterias psicótrofas y mesófilas respectivamente (Hayes et al., 2005). En el mismo estudio se inactivaron las cargas iniciales de *Staphylococcus aureus* (1,12 log ufc/mL) y coliformes (2,71 log ufc/mL) que poseía la leche, no detectándose estos al final del tratamiento.

La inactivación microbiana depende de las variables que fueron mencionadas para microorganismos patógenos, siendo la presión y temperatura utilizadas los parámetros más importantes. A mayor temperatura de entrada y presión aplicada, mayor es la eficiencia de inactivación. Entre los estudios realizados que lo demuestran se encuentra el de Thiebaud et al., (2003), quien trabajo con leche bovina entera a temperaturas de entrada de 4, 14 y 24 °C y a presiones de 200 y 300 MPa. Las reducciones logarítmicas encontradas a 24 °C fueron de 0,93 y 3,05 ciclos logarítmicos a 200 y 300 MPa respectivamente, siendo similares a las obtenidas pasteurizando a 30 min y 63°C en dicho trabajo.

Pereda et al., (2007) lograron una leche UHPH con una vida útil en refrigeración de 18 días utilizando 200 y 300 MPa de presión de homogeneización, y obtuvieron reducciones de 3 o 4 ciclos sobre los recuentos de bacterias totales, psicótrofas y *Lactococcus*, para temperaturas de entrada de 30 y 40°C respectivamente y con una inactivación total de los coliformes.

Los microorganismos esporulados aeróbicos del género *Bacillus* tienen la particularidad de ser termoresistentes, y son causa de deterioro en las leches pasteurizadas, ultra pasteurizadas y leches en polvo. (Scott et al., 2007; Pinho et al., 2011; Amador Espejo et al., 2014). También el *Clostridium tyrobutyricum* genera problemas en la industria láctea, principalmente por la pérdida económica que produce por la hinchazón tardía de quesos; por lo que a través de los años se han buscado tecnologías que disminuyan o eviten los problemas que conllevan los esporulados en la leche (Brände et al., 2016). Por esta razón ha sido objeto de estudio a nivel científico la posibilidad de la utilización de la tecnología de HPH y UHPH para la reducción de microorganismos esporulados. Pinho et al., 2011 concluyó que el proceso de UHPH no es el adecuado para la inactivación de *Clostridium sporogenes* ni de *Bacillus stearothermophilus* en leche descremada tratada a presiones hasta 300 MPa utilizando temperatura de entrada de 45 °C, solo observando algunas reducciones de esporas (0,67 ciclos logarítmicos) cuando las muestras de leche fueron sometidos a tratamiento de homogeneización 16 veces (pases múltiples) a 300 MPa. Sin embargo, Amador Espejo et al. (2014) revelaron la gran importancia que tiene la temperatura generada en la válvula durante el tratamiento para la inactivación de esporas. En estudios realizados a 300 MPa con *B. sporothermodurans*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, y *G. stearothermophilus*, se encontró un aumento en la tasa de inactivación de esporas con el incremento de temperatura. *G. stearothermophilus* y *B. subtilis* fueron los más resistentes requiriéndose una temperatura de 85 °C para lograr una inactivación de esporas de 5 log ufc/ml, mientras que en las otras cepas estudiadas fue suficiente con 65 °C. Se han reportado estudios con esporas de *B. amyloliquefaciens* en leche, obteniéndose reducciones de 3,5 ciclos logarítmicos con presiones de 350 MPa y 150 °C (Dong et al., 2015).

### **2.7.2 Efectos en proteínas, grasas y otros componentes**

El efecto en la desnaturalización de las proteínas séricas, especialmente en la  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) y la  $\alpha$ -Lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) ha sido objeto de investigación dada su importancia en la formación de complejos con la caseína.

Este hecho afecta la funcionalidad de las proteínas en la estabilidad de la leche y en las propiedades de coagulación de la misma, siendo vital para la producción de los derivados lácteos, como quesos y yogur.

No se ha observado desnaturalización de las proteínas séricas sometidas a HPH entre 50 y 200 MPa con una temperatura de entrada entre 6 y 10°C (Hayes y Kelly, 2003), ni a 186 MPa y 25°C (Sandra y Dalglish, 2005). Datta et al., (2005) encontraron que la  $\beta$ -Lg es resistente a la desnaturalización con 200 MPa hasta que la temperatura de salida es de aproximadamente 65°C, a temperaturas mayores se produce un efecto sinérgico entre la temperatura y las fuerzas producidas por la presión de homogeneización, provocando una mayor desnaturalización.

En cuanto a las caseínas, existen estudios que apoyan la teoría de que el diámetro aparente de las micelas de caseína disminuye con la aplicación de la presión. Roach y Harte (2008) observaron una caída del 30% entre 0 y 200 MPa en leche cruda descremada, con reducciones en el tamaño de partícula que fue desde 278 nm a 171 nm. Sin embargo, luego de alcanzar presiones de 250 MPa se produce un aumento en el diámetro de las partículas que es asignado a la producción de agregados entre las micelas. Resultados similares fueron encontrados por Sandra y Dalglish (2005) en leche en polvo reconstituida, manifestándose una reducción en el tamaño de partícula cuando se aumenta la presión de 114 a 186 MPa.

La HPH también afecta significativamente el tamaño del glóbulo graso en la leche dependiendo de la presión de homogeneización y de la temperatura de entrada (Hayes y Kelly, 2003). Se ha encontrado que el tamaño del glóbulo graso disminuye con el incremento de presión y de la temperatura, aunque Zamora et al. (2007) y Pereda et al., (2007) encontraron que por encima de los 300 MPa a temperaturas mayores de 30-40°C se produce una agregación que aumenta el tamaño de los mismos.

Los diferentes tratamientos térmicos que se aplican a la leche, pasteurización (72 °C durante 15 segundos), alta pasteurización (90 °C durante 15 segundos), y alta ultra temperatura (de 142 a 150 °C durante 4 segundos), son aplicados por la industria láctea para obtener leches inocuas en el mercado. Estos tratamientos

provocan una desvalorización en la composición nutricional de la leche, desnaturalizando proteínas y destruyendo las vitaminas liposolubles que se encuentran en la leche (Deeth and Datta 2011).

La aplicación de homogeneización por altas presiones presenta la ventaja de mantener las vitaminas liposolubles que se encuentran en la materia grasa de la leche. En estudio realizado por Amador Espejo et al., 2015 con vitaminas hidro y liposolubles, no se encontró disminución de la nicotinamida, ácido fólico, riboflavina, retinol, alfa tocoferol y cianocobalamina que presenta la leche cruda con la aplicación de 300 MPa y temperaturas de entrada a la válvula de homogeneización de 45 °C. La vitamina C disminuye un 19 % con la aplicación de UHPH, siendo está una retención mayor que la que se tiene al aplicar pasteurización y ultra alta temperatura de pasteurización donde disminuyen 41 y 62% respectivamente.

### **2.8. Efecto combinado del uso de la $\beta$ -CD con UHPH**

La UHPH reduce el tamaño de los glóbulos grasos de la leche, llegando a la escala de nanómetros cuando se aplican presiones por encima de los 100 MPa, produciendo un mayor número de glóbulos grasos y aumentando de esta manera el área superficial de los mismos. En este proceso se produce la ruptura de la membrana del glóbulo graso de la leche, aumentando la superficie expuesta con una nueva formación en el material de la membrana del glóbulo graso (Zamora et al.,2012). Este fenómeno podría producir una mayor disponibilidad del colesterol, pudiendo de esta manera mejorar la interacción con el agente complejante ( $\beta$ -CD), aumentando así la eficiencia de remoción.

Por otro lado, la aplicación de UHPH como alternativa al tratamiento térmico convencional para la conservación de alimentos fluidos, puede garantizar la destrucción de microorganismos en productos alimenticios líquidos, manteniendo las propiedades nutricionales y sensoriales (Zamora y Guamis 2015), dependiendo de las condiciones de operación del equipo (presión de homogeneización y temperatura de entrada)

El desarrollo de una leche entera reducida en colesterol utilizando el efecto combinado de la ultra alta presión de homogeneización y la remoción química con  $\beta$ -CD podría otorgar un beneficio doble: una mejora del proceso de extracción de colesterol manteniendo las ventajas que presenta el uso de UHPH como tecnología de conservación y elaboración de productos nutritivos y saludables. Esto permitiría elaborar productos de mayor valor agregado y que estarían enfocados hacia un sector de la población con enfermedades cardiovasculares y de hipertensión, apuntando además a la prevención y mejora de la calidad de vida de la población adulta a través de un producto alimenticio de consumo masivo y fácil acceso.

### **3. OBJETIVO**

Desarrollar el proceso para obtener leche fluida entera reducida en colesterol aplicando la tecnología de homogeneización por ultra alta presión y remoción química utilizando  $\beta$ -CD como agente complejante, con el potencial de ser utilizada para productos saludables

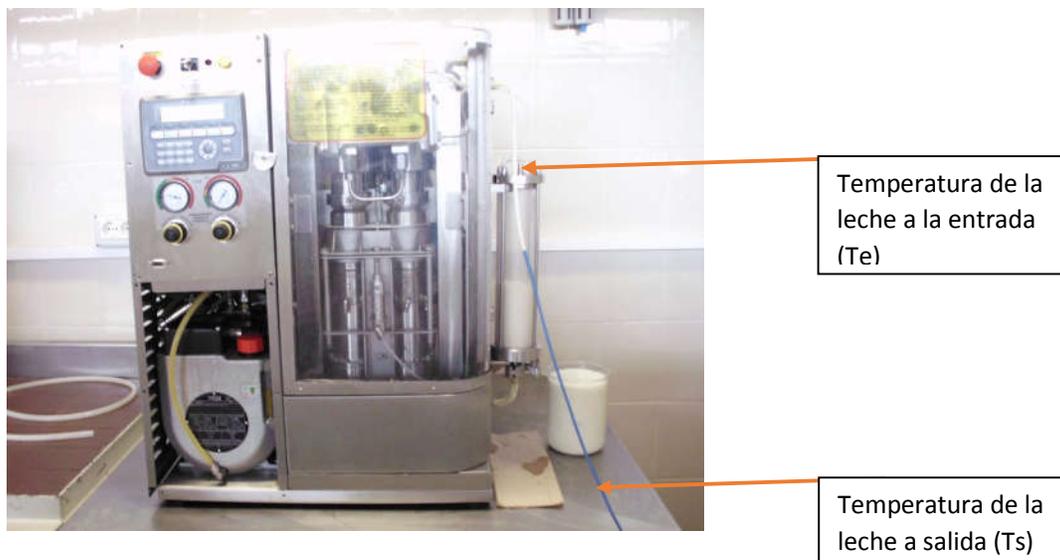
#### **3.1 Objetivos específicos**

- 1- Estudiar y seleccionar las condiciones tecnológicas del proceso (presión de homogeneización y concentración de  $\beta$ -CD) para la remoción del colesterol en leche cruda entera.
- 2- Estudiar los cambios inducidos por el proceso de homogeneización de altas presiones y la concentración de ciclodextrina seleccionada en el perfil de tamaño de partícula los glóbulos grasos y color en la leche.
- 3- Evaluar la estabilidad microbiológica y la aceptación del consumidor de la leche entera reducida en colesterol de las condiciones tecnológicas seleccionada.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Remoción del colesterol

Para la extracción del colesterol se utilizó un diseño factorial de dos factores, la presión de homogeneización y la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) (Sigma-Aldrich, Swizwerland). Se estudió la extracción del colesterol en leche cruda (LC) y homogeneizada a altas presiones (100, 200 y 300 MPa) con adición de  $\beta$ -CD (0, 0,1; 0,3 y 0,6 %) (Anexo 9.1). Las experiencias fueron realizadas por triplicado, a partir de leche entera de vaca recolectada de un mismo tambo ubicado en la ruta 6 de la zona de Sauce, Canelones, Uruguay. La leche fue calentada en un baño de agua (Haake D1) a 32 °C, y homogeneizada a ultra alta presión utilizando un equipo continuo de homogeneización con 2 intensificadores (modelo FPG 12500, Stansted Fluid Power, Essex, UK). La leche se homogeneizó a presiones de 100, 200 y 300 MPa. Se identificaron como LH100, LH200 y LH300 respectivamente, y como LC la leche sin homogeneizar. Se registraron las temperaturas a la entrada ( $T_e$ ) y a la salida ( $T_s$ ) del equipo de UHPH según se muestra en la Figura 12. Luego fueron enfriadas a 10 °C en baño de hielo. A 100 ml de leche (LC, LH100, LH200 y LH300) a 10 °C se le agregó la  $\beta$ -CD (0, 0,1; 0,3 y 0,6 %) y se agitó a 530 rpm por 15 minutos. Fueron mantenidas a 4 °C por 16 horas y luego se centrifugaron a 158 g, por 10 minutos a 4 °C (Hael Force, Shangai Listhen Scientific Equipment. Co. Ltd. China) (Lee et al, 1999).



**Figura 12.** Equipo de alta presión de homogeneización utilizado para la leche

#### **4.2 Análisis de colesterol**

Se realizó el análisis del colesterol en la leche luego de cada tratamiento, según la norma AOAC 994.10 "Cholesterol in Foods. Direct Saponification-Gas Chromatographic Method".

Se realizó la saponificación utilizando KOH al 50% (Macron, Fine Chemicals, México) y alcohol reactivo (mezcla etanol y metanol 95:5 v/v) (Burdick & Jackson, USA), a alta temperatura y con agitación magnética durante 70 minutos. Luego se realizó la extracción utilizando hexano (Macron, Fine Chemicals, USA) y sucesivos lavados con KOH 1N, KOH 0,5N y agua. Una alícuota de la solución de hexano se llevó a sequedad y se re disolvió con dimetilformamida (Fluka, Analytical, Sigma-Aldrich, Germany) y por último se derivatizó con hexametildisiloxano (Fluka, Analytical, Sigma-Aldrich, USA) y trimetilclorosilano (Fluka, Analytical, Sigma-Aldrich, Germany). Se agregó a cada una de las muestras una solución patrón interno 5  $\alpha$ -colestano, (Sigma Aldrich, USA) en heptano. Se realizó una curva de calibración de colesterol con el mismo estándar interno y se inyectaron los distintos puntos de curva y las muestras en un cromatógrafo gaseoso-espectrómetro de masa con impacto electrónico (Agilent MS 5975C Inert XL y Agilent GC 7890A). Las condiciones utilizadas fueron:

temperatura del inyector 250°C, modo de inyección Splitless, temperatura inicial del horno 190°C durante 4 minutos, rampa de temperatura de 30°C/min hasta 280°C, temperatura final del horno 280°C durante 20 min. Se utilizó una columna capilar: HP-5MS 0,25mm x 30m x 0,25um o similar, gas carrier Helio 99,999% de pureza, detector de Masa de ionización por impacto electrónico y temperatura de la fuente de 200°C. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad “para análisis de residuos”.

El porcentaje de remoción de colesterol se calculó según:

$$\text{Remoción de colesterol (\%)} = [(C_i - C_f) / C_i] * 100$$

Donde:

*C<sub>i</sub>*: Concentración de colesterol en la leche cruda inicial

*C<sub>f</sub>*: Concentración de colesterol en la leche finalizado el proceso de extracción según cada tratamiento.

#### **4.3 Determinación del tamaño de partícula del glóbulo graso de la leche**

Se determinó en leche sin el agregado de ciclodextrina (0% β-CD) y con el agregado de 0,6% β-CD (β-CD 0,6%), que fue la concentración que presentó mayor remoción de colesterol. En ambos casos se analizaron en LC y las distintas presiones de homogeneización utilizadas (LH100, LH200, LH300).

Se realizó la distribución de tamaño de partícula del glóbulo graso por difracción de luz por láser utilizando un equipo Microtrac S3500 (Microtec. Inc. USA.). Las muestras se diluyeron en agua MilliQ hasta un oscurecimiento apropiado para la célula del difractómetro, con un flujo del 40%. Se utilizó un índice de refracción de 1,46 y 1,33 para la grasa de la leche y el agua, respectivamente. Las mediciones se realizaron por triplicado, a temperatura ambiente de aproximadamente 20°C (Amador-Espejo et al, 2014 y Garcia-Amezquita et al 2009). Se tomaron los valores de área superficial específica del glóbulo graso y para caracterizar la distribución del tamaño del glóbulo graso se calcularon los siguientes parámetros:

1-  $D[4,3]$ , el diámetro de volumen medio o valor de diámetro medio ponderado en volumen, también denominado media “de Broucker”.

$$D[4,3] = \frac{\sum(vi * di)}{\sum vi}$$

Donde  $vi$  es el volumen de los glóbulos grasos y  $di$  es el diámetro medio del volumen.

2-  $D[3,2]$ , el diámetro medio ponderado de la superficie equivalente, denominado también “Diámetro medio Sauter”.

$$D[3,2] = \frac{\sum vi}{\sum(vi/di)}.$$

3-  $D[v, 0.50]$ , el diámetro por debajo del cual se encuentran el 50% del volumen de partículas.

4-  $D[v, 0.90]$ , el diámetro por debajo del cual se encuentran el 90% del volumen de partículas.

#### **4.4 Evaluación sensorial del agrado general**

Para determinar la aceptación del consumidor de la leche reducida en colesterol desarrollada, y además comparar diferencias del agrado general con otras leches del mercado se realizó una prueba de grado de aceptación por parte de los consumidores. Las muestras de leche se mantuvieron en heladera a 4 ° C hasta su evaluación. Se realizó la evaluación de 3 muestras: leche sin colesterol desarrollada, leche entera comercial pasteurizada (proceso HTST) y leche entera comercial ultra pasteurizada (UHT), ambas comerciales. Las tres muestras de las distintas leches fueron presentadas en vasos codificados con números aleatorios de tres dígitos siguiendo un orden de presentación balanceado para que probara cada participante, no se identificaron a qué tipo de leches correspondía cada una de las muestras (muestras ciegas). La evaluación se realizó en una sala normalizada según ISO 8589:1988 bajo luz artificial blanca. A la evaluación concurren 48 consumidores de entre 18 y 60 años, de los cuales el 49% era de sexo femenino. Se utilizó una escala hedónica estructurada de nueve puntos (1-Me disgusta mucho, 5-Me es indiferente, 9-Me

gusta mucho) para la determinación del agrado de las muestras (Drake, M.A., 2007).

#### **4.5 Recuento de Aerobios Mesófilos Totales**

Se realizó el análisis de aerobios mesófilos totales de la leche sin colesterol, tratada por homogeneización por altas presiones a 200 MPa y un 0,6% de  $\beta$ -CD. Se mantuvieron en heladera a una temperatura de 4 °C durante 6 días, período en el que se encuentra en góndola una leche comercial pasteurizada. Se tomaron muestras a los 1,3 y 6 días de elaboradas.

Los ensayos se realizaron según la Norma ISO 4833 “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of microorganism- Colony-count technique at 30 °C”, on Plate Count Agar, incubando durante 72 horas

#### **4.6 Color**

Los valores de color de las muestras de leche fueron determinados utilizando un colorímetro Hunter Lab (LabScan XE, Hunter Associates Laboratorio Inc., Reston, VA). Se utilizó el método CIELAB con fuente de luz D65 y observador estándar 10°, se calibró con dos placas estándares una de color blanco y otra negra. Las muestras fueron colocadas en un vaso de vidrio protegido de la luz exterior. Se midieron los valores de L \* (luminosidad), representando de 0 (negro) a 100 (blanco). Los valores de a \* y b \* representan componentes cromáticos. Los valores positivos de a \* son rojos y los valores negativos son verdes, mientras que los valores positivos de b \* son de color amarillo y los negativos son de color azul (Pereda et al., 2007)

#### **4.7 Análisis estadístico**

Para la evaluación se utilizó un modelo mixto de 3 vías, fueron tratados como factores fijos los porcentajes de  $\beta$ -CD y las presiones de homogeneización de la leche y el factor aleatorio es la repetición. Se realizó la prueba utilizando la

concentración de colesterol como covariable. Las pruebas de comparación que se realizaron fueron de Tukey con un nivel de significación del 5%. El software utilizado fue el R Core Team (2013).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Remoción de Colesterol

Para este estudio se tomaron muestras de leche de un mismo establecimiento, sin embargo, fueron recolectadas en distintos meses del año, desde el otoño hasta el verano. La composición de la leche utilizada fue variable, se muestra en la Tabla 3 los valores de concentración de materia grasa, colesterol y colesterol en base a la materia grasa en las 6 leches crudas (LC) que se tomaron para realizar el estudio.

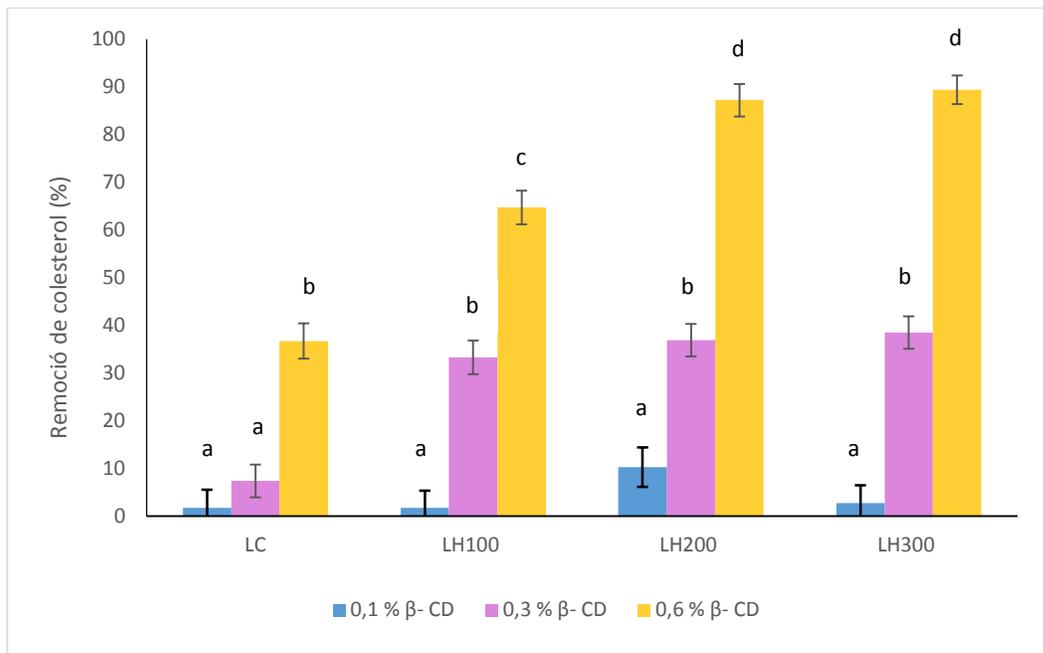
Tabla 3. Valores de concentración de materia grasa (MG) (g/100g), colesterol (mg/100g) y colesterol en base a materia grasa (mg de colesterol/100 g de MG) de las leches individuales utilizadas para las repeticiones. Las muestras de leche utilizadas para las 3 repeticiones de cada tratamiento fueron tomadas al azar.

<b>Leche cruda</b>	<b>MG (g/100g leche)</b>	<b>Colesterol (mg/100g leche)</b>	<b>Colesterol expresado en Mg /100 g de MG</b>
LC1	3,70	13,4	360
LC2	4,60	14,4	312
LC3	3,36	12,3	365
LC4	3,71	13,8	373
LC5	3,53	6,5	183
LC6	4,34	17,4	401

Las leches utilizadas presentaron distintas concentraciones de materia grasa, colesterol, y colesterol por cada 100 mg de materia grasa según se muestra en

la Tabla 3. Los porcentajes de  $\beta$ -CD que fueron agregados a las leches de cada tratamiento fueron tomados en base a la cantidad de leche (100 ml de leche), sin embargo, como se muestra en la Tabla 3, se observa que la concentración de colesterol (mg/100 g leche) en cada leche utilizada no fue la misma, por lo cual esta variable se tuvo en cuenta en los análisis estadísticos del cálculo de la remoción. Los valores de colesterol iniciales (Tabla 3) se tomaron como una covariable en la prueba de ANOVA, resultando significativo con un coeficiente de -1,13 ( $p < 0,05$ ). Este resultado muestra que la remoción del colesterol presenta una dependencia con la concentración del colesterol inicial en la leche cruda, donde el porcentaje de remoción decrece a mayor cantidad de colesterol inicial.

El efecto de las distintas presiones de homogeneización y del contenido de  $\beta$ -CD sobre la remoción de colesterol se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Remoción de colesterol en leche bovina (m/m %) en función de leche cruda sin homogeneizar (LC), leche homogeneizada a presiones de 100, 200 y 300 MPa (LH100, LH200 y LH300) y al porcentaje de  $\beta$ -CD agregada (0,1%  $\beta$ -CD; 0,3 %  $\beta$ -CD y 0,6%  $\beta$ -CD).

Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), las barras corresponden al error estándar.

Según se muestra en la Figura 13, la remoción del colesterol aumenta con el incremento de la concentración de  $\beta$ -CD desde 0,1 % al 0,6% cuando se utiliza leche cruda (LC) y leche homogeneizada a altas presiones (LH100, LH200 y LH300). Se encontró que tanto la concentración de  $\beta$ -CD como la presión de homogeneización influyen significativamente en la remoción de colesterol ( $p < 0,05$ ).

En el tratamiento de extracción de colesterol realizado con leche cruda sin homogenizar (LC) y 0,3%  $\beta$ -CD se removió un 7% del colesterol y con el aumento de la concentración de  $\beta$ -CD a niveles del 0,6% la remoción ascendió a un 37%. Valores similares de remoción se obtuvieron al utilizar la mitad de la concentración de  $\beta$ -CD (0,3 %) y presión de homogeneización de 100, 200 y 300 MPa (LH100, LH200 y LH300), donde se removieron el 33%, 37% y 39% de colesterol respectivamente.

Cuando se aumentó la concentración de  $\beta$ -CD a 0,6 % con 100 MPa (LH100) de presión, la remoción se incrementó al 65%. La mayor remoción de colesterol se obtuvo cuando se utilizó 0,6 % de concentración de  $\beta$ -CD y niveles de presión 200 y 300 MPa (LH200 y LH300) y fueron de 87% y 89%, respectivamente. Esto muestra una fuerte influencia de la concentración de  $\beta$ -CD en el porcentaje de remoción de colesterol en las condiciones estudiadas.

Todas las leches que fueron tratadas con concentraciones de  $\beta$ -CD de 0,6 % y presiones de homogeneización de 200 y 300 MPa, presentaron concentraciones de colesterol remanentes en la leche de aproximadamente 2 mg/100g de colesterol ( $1,73 \pm 0,14$  mg/100g de colesterol). Todos los valores fueron mayores que el límite de detección de la técnica utilizada (0,8 mg/100g de colesterol)

Fue de interés conocer cuanto de la  $\beta$ -CD que es agregada a la leche, se utilizó efectivamente en la formación del complejo de inclusión con el colesterol, para lo cual se calculó el porcentaje de la  $\beta$ -CD agregada que constituyó el complejo "colesterol- $\beta$ -CD" (%  $\beta$ -CD acomplejada). Se calculó teniendo en cuenta la

concentración de colesterol inicial en la leche cruda utilizada en cada experimento (Tabla 3) y los porcentajes de remoción obtenidos en cada tratamiento (Figura 13). Para lo cual se tomaron en cuenta; los moles de colesterol acomplejados utilizando el peso molecular del colesterol (PM colesterol = 387 g/mol), la relación estequiométrica entre la  $\beta$ -CD y el colesterol acomplejado de 3 a 1 respectivamente (Rozycki et al., 2013) y el peso molecular de la  $\beta$ -CD (PM  $\beta$ -CD = 1135 g/mol) para determinar la concentración de la  $\beta$ -CD acomplejada. El porcentaje de la  $\beta$ -CD acomplejada para cada condición experimental se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** %  $\beta$ -CD acomplejada, (es el porcentaje de la  $\beta$ -CD agregada que fue utilizado para la formación del complejo colesterol- $\beta$ -CD) en función de leche cruda sin homogenizar (LC), leche homogeneizada a presiones de 100, 200 y 300 MPa (LH100, LH200 y LH300) y al porcentaje de  $\beta$ -CD agregada (0,1%  $\beta$ -CD; 0,3 %  $\beta$ -CD y 0,6%  $\beta$ -CD).

$$\% \beta - CD \text{ acomplejada} = \frac{\text{concentración } \beta - CD \text{ acomplejada} * 100}{\text{concentración } \beta - CD \text{ agregada}}$$

Las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) (Medias con error estándar de  $\pm 1,87$ )

<b>% <math>\beta</math>-CD acomplejada</b>			
	<b>Concentración de <math>\beta</math>-CD agregada a la leche</b>		
	<b>0,1 %<math>\beta</math>-CD</b>	<b>0,3%<math>\beta</math>-CD</b>	<b>0,6%<math>\beta</math>-CD</b>
<b>LC</b>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	7 <sup>b</sup>
<b>LH100</b>	2 <sup>a</sup>	11 <sup>bc</sup>	12 <sup>bc</sup>
<b>LH200</b>	10 <sup>bc</sup>	14 <sup>bcd</sup>	17 <sup>d</sup>
<b>LH300</b>	3 <sup>a</sup>	16 <sup>cd</sup>	19 <sup>d</sup>

De la  $\beta$ -CD agregada, solo una parte es utilizada para formar el complejo “colesterol-  $\beta$ -CD”. El mayor porcentaje de  $\beta$ -CD acomplejada (entre 14% y 19 %) se encuentra cuando la leche es homogeneizada a 200 y 300 MPa, con el agregado de 0,3 y 0,6 % de  $\beta$ -CD. Valores menores se encontraron cuando se utilizó leche cruda sin homogeneizar (3 y 7%), como lo muestra la Tabla 4.

Tanto en leche cruda, como homogeneizada, el agregado de 0,6 % de  $\beta$ -CD presenta mayor porcentaje de  $\beta$ -CD acomplejada que cuando se agrega un 0,1%, mostrando una influencia de la concentración de  $\beta$ -CD agregada en la formación del complejo.

## **5.2 Incremento de temperatura en el proceso de homogeneización por altas presiones**

La leche utilizada para todos los tratamientos fue calentada a 32°C ( $T_e$ ) antes de entrar al homogeneizador por altas presiones, luego del pasaje de la leche por las válvulas de homogeneización, se produce un incremento de temperatura, la temperatura de salida se observa en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Temperatura de la leche a la salida de la válvula de homogeneización en las leches tratadas a presiones de homogeneización de 100, 200 y 300 MPa, con una temperatura de entrada al equipo de 32 °C.

<b>Presión de Homogeneización (MPa)</b>	<b><math>T_s</math> (°C)</b>
<b>100</b>	56,5 +/- 1,8 (n=18)
<b>200</b>	70,7 +/- 2,3 (n=20)
<b>300</b>	93,5 +/- 3,6 (n=32)

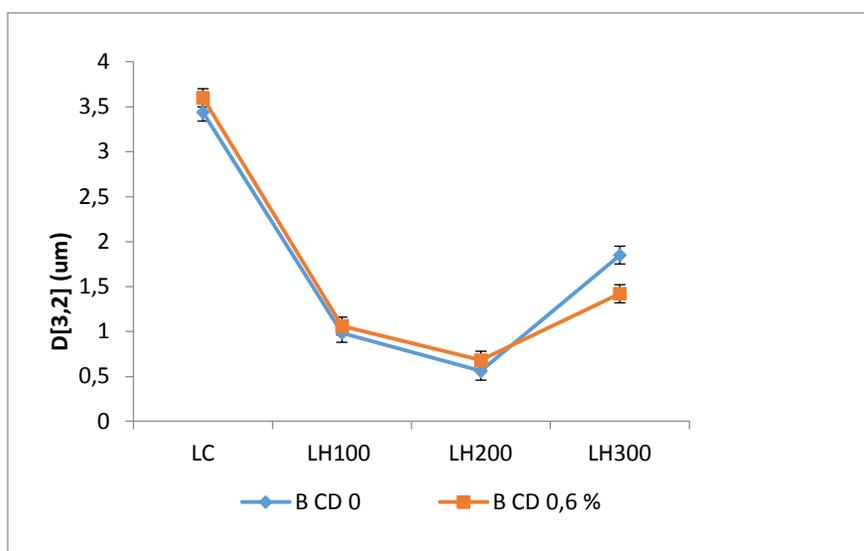
La temperatura de la leche luego de la homogeneización aumentó 24,5 °C; 38,7°C y 61,5°C al utilizar presiones de 100, 200 y 300 MPa respectivamente. En el tratamiento a 300 MPa la temperatura utilizada supera la temperatura de pasteurización rápida (72°C durante 15 s), por lo que el tratamiento además de las altas presiones presenta un tratamiento térmico indirecto a la leche. El tiempo total que se requirió para homogeneizar los 300 ml de leche de cada experimento fue de 65 s.

### **5.3 Tamaño de partícula del glóbulo graso de la leche**

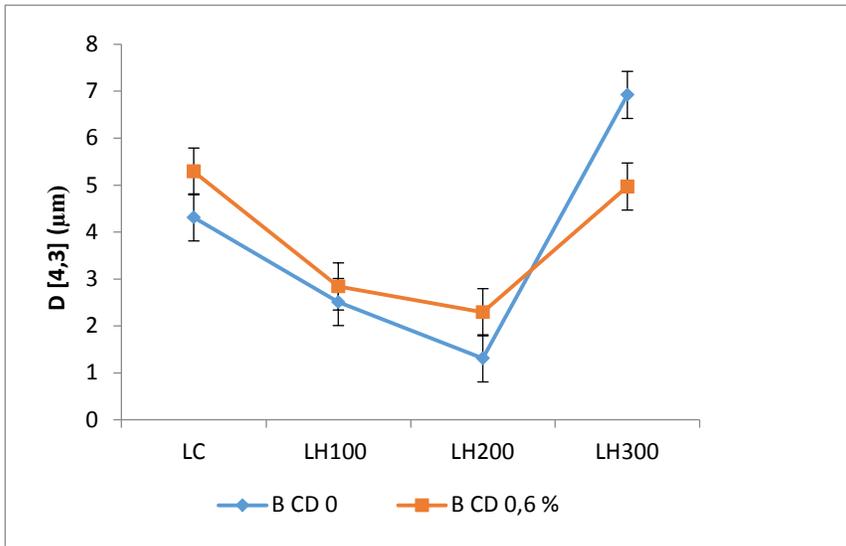
Se expone en las Figuras 14,15,16 y 17 los resultados de los diámetros  $D[4,3]$ ,  $D[3,2]$ ,  $D[v, 0.50]$  y  $D[v, 0.90]$  y el área específica superficial (Figura 18) de la leche cruda (LC) y homogeneizada a las distintas presiones (LH100, LH200, LH300). En todos los casos, se incluyen dos condiciones: leches sin el agregado de ciclodextrina (0%  $\beta$ -CD) y las correspondientes a ciclodextrina al 0,6% (0,6%  $\beta$ -CD), esta última fue seleccionada por haber sido la concentración que presentó mayor remoción de colesterol. Los resultados muestran que el proceso de homogeneización por altas presiones reduce el tamaño de glóbulo graso con el aumento de la presión hasta un mínimo que se produce a los 200 MPa y luego aumenta hacia los 300 MPa.

El diámetro medio de "Sauter" ( $D [3,2]$ ) disminuyo de 3,44  $\mu\text{m}$  en leche cruda hasta 0,56  $\mu\text{m}$  al utilizar 200 MPa (Figura 14), presión a la cual se encontró la mayor área superficial según se visualiza en el Figura 18.

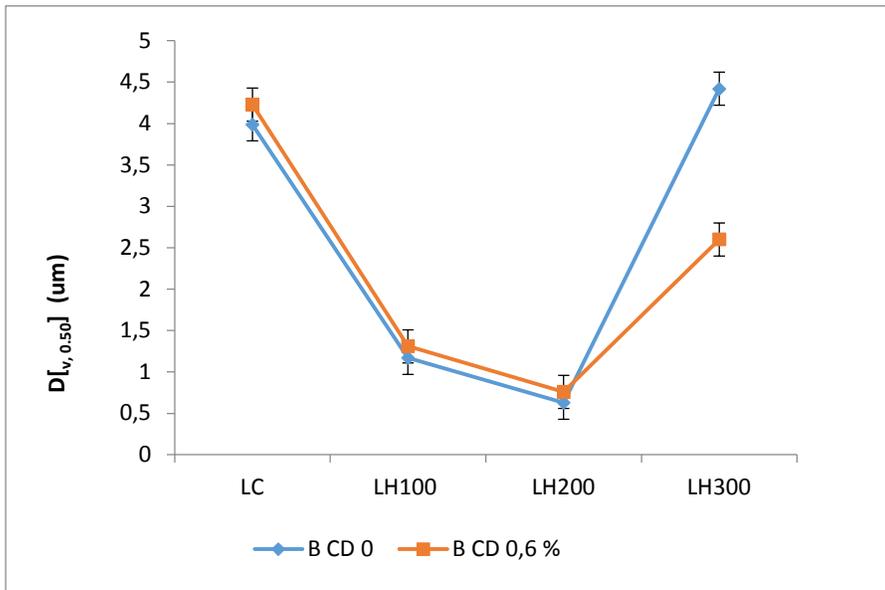
Las leches que fueron presurizadas a 300 MPa utilizando 0,6% de  $\beta$ -CD presentaron menor tamaño de glóbulo graso que la leche homogeneizada a esa presión donde no fue agregada la  $\beta$ -CD (0%  $\beta$ -CD) (Figuras del 14 al 17).



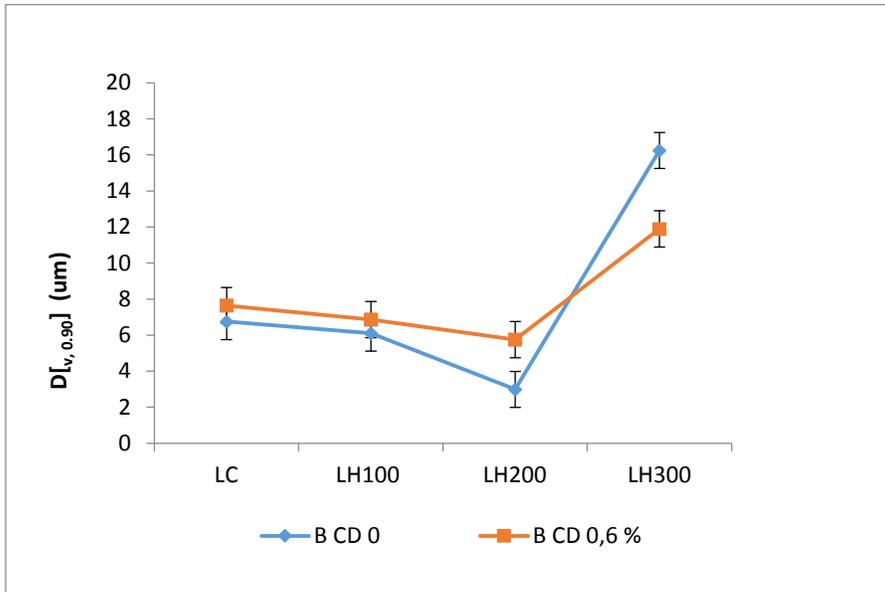
**Figura 14.**  $D[3,2]$ , según la presión de homogeneización y al porcentaje de  $\beta$ -CD agregada. (Medias con error estándar de  $\pm 0,05 \mu\text{m}$ )



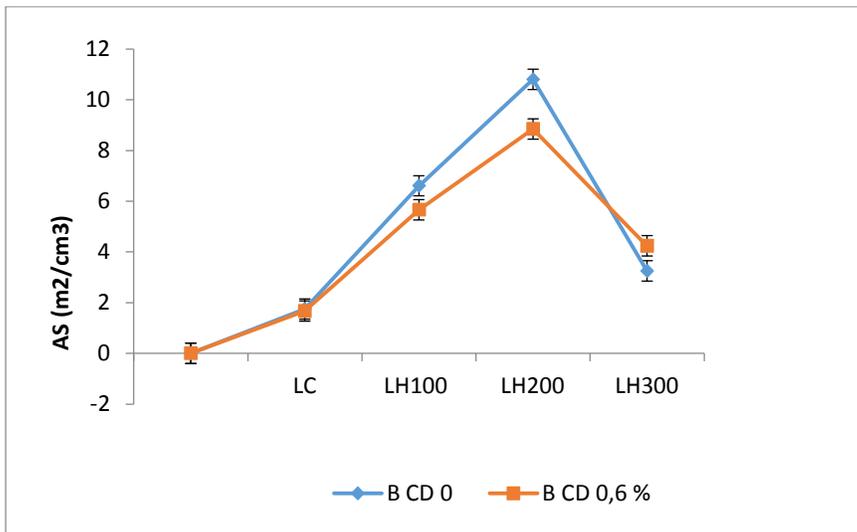
**Figura 15.**  $D_{[4,3]}$ , según la presión de homogeneización y al porcentaje de  $\beta$ -CD agregada. (Medias con error estándar de  $\pm 2,36 \mu\text{m}$  )



**Figura 16.**  $D_{[v, 0.50]}$  según la presión de homogeneización y al porcentaje de  $\beta$ -CD agregada. (Medias con error estándar de  $\pm 0,21 \mu\text{m}$ )



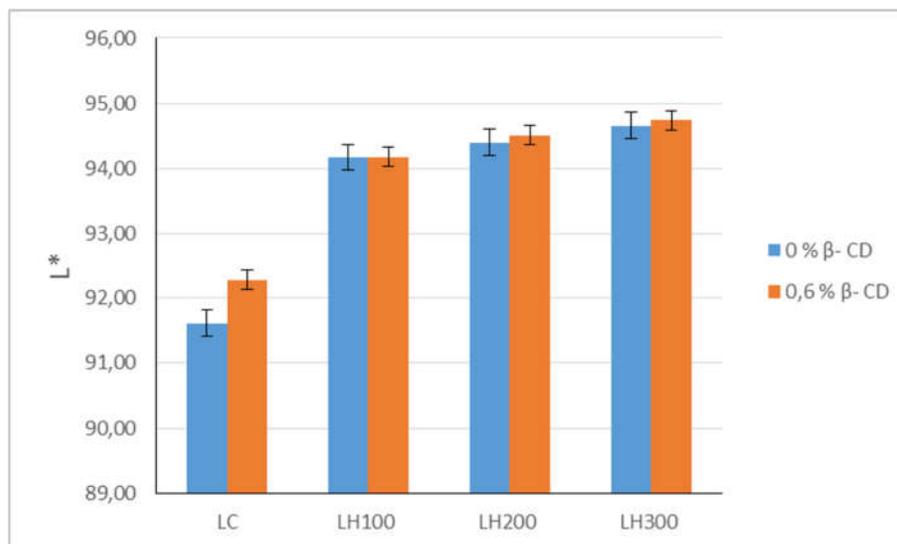
**Figura 17.**  $D_{[v, 0.90]}$  según la presión de homogeneización y al porcentaje de  $\beta$ -CD agregada. (Medias con error estándar de  $\pm 1,06 \mu\text{m}$  )



**Figura 18.** Área superficial específica de los glóbulos grasos de la leche, según la presión de homogeneización y el porcentaje de  $\beta$ -CD agregada. (Medias con error estándar de  $\pm 0,33 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ )

## 5.4 Color

Las medidas de color de las leches tratadas con homogeneización por altas presiones, con y sin colesterol se representan según la luminosidad  $L^*$  (Figura 19) y los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  (Tabla 6)



**Figura 19.** Diferencias de color medido según el parámetro  $L^*$  de las leches enteras a las distintas presiones de homogeneización, sin  $\beta$ -CD (0 %) y 0,6% de  $\beta$ -CD. (Medias con error estándar de  $\pm 0,06$  a  $0,09$ )

**Tabla 6.** Parámetros  $a^*$  y  $b^*$  de las leches enteras a las distintas presiones de homogeneización, sin  $\beta$ -CD (0 %) y 0,6% de  $\beta$ -CD. (Medias con error estándar para  $a^*$  de  $\pm 0,07$  a  $0,11$  y para  $b^*$  de  $\pm 0,08$  a  $0,18$ )

Nota: media del valor con letras mayúsculas iguales no son significativamente diferente ( $P < 0,05$ )

	$a^*$		$b^*$	
	Concentración de $\beta$ -CD agregada a la leche			
	0% $\beta$ -CD	0,6% $\beta$ -CD	0% $\beta$ -CD	0,6% $\beta$ -CD
<b>LC</b>	-1,50 <sup>A</sup>	-1,43 <sup>A</sup>	14,21 <sup>A</sup>	14,36 <sup>A</sup>
<b>LH100</b>	-0,81 <sup>B</sup>	-0,87 <sup>B</sup>	12,38 <sup>B</sup>	12,41 <sup>B</sup>
<b>LH200</b>	-1,09 <sup>C</sup>	-1,11 <sup>C</sup>	12,20 <sup>B,C</sup>	12,32 <sup>B,C</sup>
<b>LH300</b>	-1,15 <sup>A</sup>	-1,43 <sup>A</sup>	12,58 <sup>C</sup>	12,46 <sup>C</sup>

En la Figura 19 se observa que las leche tratadas por ultra alta presión de homogeneización en todas las presiones estudiadas presentaron mayores

valores de  $L^*$  que la leche cruda, y esta aumentó con la presión de homogeneización. Los valores de  $L^*$  de la leche cruda sin agregado de  $\beta$ -CD fueron de 91,61 y los de homogeneización variaron desde 94,17; 94,40 y 94,66 con presiones de 100, 200 y 300 MPa respectivamente. Solo en la leche cruda, hubo diferencia significativa del color según  $L^*$  cuando se le agregó un 0,6% de  $\beta$ -CD. En las leches que fueron homogeneizadas el agregado de ciclodextrina no influyó en el color de la leche.

El parámetro  $a^*$  el cual describe el rango de color del rojo al verde, presentó valores iguales  $p$  ( $<0,05$ ) para la leche cruda y la leche homogeneizada a 300 MPa. Las leches tratadas a 100 y 200 MPa presentaron valores mayores que los correspondientes a la leche cruda. Con respecto al valor de  $b^*$  que representa la escala del amarillo al azul, se encontró que existe diferencia estadística entre la leche cruda y homogeneizadas, siendo estas menores (Tabla 6).

## **5.5 Evaluación microbiológica**

**Tabla 7.** Recuento de aerobios mesófilos totales de la leche sin colesterol (leche homogeneizada a 200 MPa) durante 6 días de estudio, mantenidas a 4 °C. (Límite de detección: 2 log ufc/mL) (Valores individuales)

Recuento de aerobios mesófilos totales log (ufc/mL)			
Leche cruda	LH200 a 1 días	LH 200 a 3 días	LH 200 a 6 días
5,2	2,20	<2,00	<2,00
5,3	2,00	2,18	<2,00
5,2	2,15	<2,00	<2,00

En la Tabla 7 se muestra los resultados del recuento de aerobios mesófilos totales, donde se observa una reducción de 3 unidades logarítmicas con respecto a la leche cruda, debido al proceso de homogeneización a 200 MPa. La leche sin colesterol de las condiciones estudiadas se mantuvo estable durante los 6 días a 4°C

## **5.6 Aceptabilidad por consumidores**

Los resultados de la evaluación sensorial del agrado general de las leches se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Evaluación sensorial del agrado general de las leches por consumidores.

Nota: Medias del valor con letras minúsculas iguales no son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). *Escala utilizada: hedónica estructurada de nueve puntos*

	Leche entera sin colesterol con proceso ( UHPH)	Leche entera comercial con proceso (UHT)	Leche entera comercial con proceso (HTST)
<b>Agrado general</b>	6,1 a	6,0 a	6,8 a

La leche entera sin colesterol que fue obtenida por el proceso mixto de homogeneización a 200 MPa y una concentración del 0,6 % de  $\beta$ -CD tuvo el mismo nivel de aceptabilidad en la evaluación sensorial por consumidores que leches comerciales con procesos de ultra alta temperatura (UHT, proceso 135 °C durante 2 a 8 segundos), y de pasteurización de alta temperatura y corto tiempo (HTST, proceso de 72 °C durante 15 segundos).

Los valores obtenidos de los tres tipos de leches estuvieron en el rango de 6 y 7 que corresponde a me gusta poco y me gusta.

## **6. DISCUSIÓN**

### **6.1 Incremento de temperatura**

Durante el proceso de homogeneización por altas presiones se produjo un aumento de temperatura de la leche desde su ingreso al equipo (~32°C) hasta la salida de la válvula. Estos incrementos dependieron de las presiones de homogeneización utilizadas; los aumentos fueron de 24,5 °C al utilizar 100 MPa,

38,7 °C con 200 MPa y 61,5°C con 300 MPa. Estudios anteriores han demostrado un aumento lineal de temperatura que se da en las válvulas de homogeneización donde se transforma la energía mecánica y cinética en térmica (Hayes and Kelly 2003, Donsi et al., 2009a y Zamora et al., 2012).

Este aumento es similar al encontrado por otros autores. Pinho et al., (2011) obtuvieron aumentos de temperatura de 21,5 °C a 100 MPa, 39,4°C a 200 MPa y 57,7 °C a 300 MPa con temperatura de entrada al homogeneizador entre 24 °C y 25 °C, utilizando un equipo Stansted, model FPG 7400H:350. A temperaturas de entrada de 30 °C y 35 °C al trabajar a 200 MPa se tuvieron temperaturas de salida de la válvula entre 68,3 °C y 71,1 °C, similares a las encontradas en este trabajo (Datta et al., 2005). Pereda et al. (2007) homogeneizaron leche con temperatura de entrada de 30°C a 200 y 300 MPa, las temperaturas de salida fueron de 78,7 °C y 97,3°C, levemente más altas que las encontradas en este trabajo de 70,7°C y 93 °C. Dumay et al., 2013 exponen que se producen aumentos de temperaturas entre 17 y 21 °C cada 100 MPa, y que corresponden principalmente a la conversión parcial de energía mecánica en térmica. El calentamiento se produce principalmente cuando el líquido pasa a través de la válvula de alta presión, en lapsos breves de tiempo (< 1s), con velocidades estimadas entre 200 y 250 m/s (Picart et al., 2006 y Dumay et al., 2013). Para minimizar el efecto del incremento de temperatura en la leche, se utilizan dispositivos de enfriamiento a la salida de la válvula de alta presión (Donsi et al., 2009, Dumay et al, 2013 y Amador-Espejo et al., 2015). Cuando un tratamiento térmico es utilizado, se observan cambios en las características sensoriales de los alimentos, por otro lado, cuando el procesamiento por altas presiones es a temperatura ambiente se mantienen los atributos de calidad (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010). El manejo de las condiciones del proceso de homogeneización (temperatura de entrada, equipo con o sin intercambiador de calor, etc.) determina si se produce tratamiento térmico, lo que estaría impactando en las propiedades sensoriales de la leche como el sabor. En este trabajo se produce un incremento de temperatura a la salida del equipo cuando se utilizaron presiones de 200 y 300 MPa, lo que podría afectar el sabor debido a un tratamiento térmico indirecto de la leche.

## **6.2 Remoción de Colesterol**

En el presente trabajo se realizó la extracción de colesterol con el agente complejante  $\beta$ -CD en leche entera cruda luego de haber sido sometidas a las distintas presiones de homogeneización. Según se observa en la Figura 13, la remoción del colesterol aumenta con el incremento de la concentración de  $\beta$ -CD desde 0,1 % al 0,6% cuando se utiliza leche cruda (LC) y leche homogeneizada a altas presiones (LH100, LH200 y LH300). Encontrándose que tanto la concentración de  $\beta$ -CD como la presión de homogeneización influyen significativamente en la remoción de colesterol ( $p < 0,05$ ).

La mayor remoción de colesterol se obtuvo cuando se utilizó 0,6 % de concentración de  $\beta$ -CD y niveles de presión 200 y 300 MPa (LH200 y LH300) y fueron de 87% y 89%, respectivamente (Figura 13). Todas las leches resultantes de estas condiciones (0,6%  $\beta$ -CD con 200 y 300 MPa, independientemente de la concentración de colesterol inicial) presentaron cantidades menores a 2 mg/100 g de colesterol luego de la remoción. Según el reglamento Técnico MERCOSUR, REG\GMC\RES N° 01/12 se considera que un alimento es “libre de” o “sin” colesterol cuando su concentración es menor a 5 mg/100 g. Esto permite que la leche obtenida por el proceso de homogeneización por altas presiones que cumpla estas condiciones pueda ser denominada como “leche sin colesterol”.

Valores de remoción de colesterol del 64% se encontraron al utilizar 0,6% de  $\beta$ -CD y 100 MPa de presión. Además, se obtuvieron reducciones de 33% 37% y 39 % al utilizar 0,3% de  $\beta$ -CD con presiones de homogeneización de 100, 200 y 300 MPa, respectivamente. Si bien no fueron los mayores valores de remoción del colesterol obtenido, estas condiciones de proceso pueden ser consideradas para productos bajo o libre de colesterol dependiendo de la concentración inicial de colesterol en leche y la reglamentación correspondiente.

La utilización de 0,6% de concentración de  $\beta$ -CD y una presión de homogeneización de 200/300 MPa, con una temperatura de entrada al equipo de 32 °C, podría presentar un doble propósito. Lograr una leche “sin colesterol” procesada por una tecnología innovadora con potencial de ser utilizada para obtener productos saludables. Sin embargo, es necesario controlar la

temperatura de salida de la leche con un intercambiador de calor, para que no se produzca la combinación de temperatura y tiempo de pasteurización.

Amador Espejo et al., (2015) demostraron que la utilización de presión de 300 MPa con temperatura de entrada de 45 °C presentó un contenido de vitaminas hidro y liposolubles cercanas a la leche cruda. Sharabi et al., (2018) reportaron que la riboflavina y la vitamina C son menos afectadas cuando son tratadas con UHPH a 200 MPa ( $T_e=25^\circ\text{C}$ ) que con la pasteurización (72 °C durante 15 segundos) y lo adjudican a que el tiempo que se encuentra la leche a alta temperatura es muy corto.

La remoción de colesterol utilizando  $\beta$ -CD fue estudiada por otros autores, Lee et al, (1999) estudiaron las condiciones de proceso de extracción del colesterol utilizando  $\beta$ -CD como agente complejante, donde lograron remociones hasta un 95%, utilizando 1,5 % de  $\beta$ -CD. Si bien han sido reportados porcentajes mayores al 90% de extracción de colesterol, varios autores han seguido investigando la remoción del colesterol en leche utilizando  $\beta$ -CD, en busca de procesos más eficientes y beneficios adicionales (disminución de la cantidad de  $\beta$ -CD, reducción del residuo que se genera con la separación del complejo colesterol- $\beta$ -CD, etc.). Kim et al, (2004) obtuvieron tasas de reducción de colesterol de un 80% utilizando epíclorhidrina para obtener un reticulado de la  $\beta$ -CD permitiendo un efectivo reciclaje del complejo formado. La inmovilización de la  $\beta$ -CD en distintos soportes ha sido otro proceso estudiado en busca de la eficiencia en la extracción de colesterol. Kwank et al., (2004) utilizaron inmovilización en perlas de vidrio preparadas por salinización, resultando con una tasa del 41% de eliminación de colesterol en leche, estos resultados fueron mejorados por Tahir et al, (2013b), con la utilización soporte de vidrio modificado utilizando  $\beta$ -CD logrando un 68 % de reducción de colesterol de la leche y una fácil separación del complejo, así como la posibilidad de utilizar un proceso continuo a escala industrial. Con utilización de superficie de vidrio modificada se ha logrado el valor más alto reportado en la literatura utilizando  $\beta$ -CD inmovilizada de una reducción del 72%, siendo un método que permite reuso y fácil separación (Tahir, 2013a). En busca de mejoras en el proceso de extracción de colesterol, Roycki et al., (2013), estudiaron la influencia de la homogeneización convencional de la leche. Estos autores encontraron una influencia directa de la presión de

homogeneización trabajando entre 110 (11,1 MPa) y 170 atm (17,2 MPa), aunque con menor influencia que el porcentaje de la  $\beta$ -CD

Reportaron valores de remoción del 83% y 92 % con presión de homogeneización de 135 atm (13,7 MPa) utilizando 0,776% y 1,624% de  $\beta$ -CD respectivamente.

De la Tabla 4, surge que la  $\beta$ -CD que es agregada en leche cruda (LC), solo es utilizada para formar el complejo “colesterol-  $\beta$ -CD” del 2% al 7%. Se encontró que cuando se utilizó homogeneización por altas presiones aumentó la cantidad de  $\beta$ -CD que efectivamente pasa a formar parte del complejo, con valores del 10% al 17% al utilizar 200 MPa. En todas las condiciones de estudio (LC, LH100, LH200 y LH300) la utilización de 0,6 % de  $\beta$ -CD agregada presentó mayor porcentaje de  $\beta$ -CD acomplejada (7%, 12%, 17% y 19%) que el 0,1% de  $\beta$ -CD agregada (2%, 25, 10% y 3% respectivamente), lo que podría explicarse por un desplazamiento del equilibrio en la formación del complejo “ $\beta$ -CD-colesterol” por efecto de la concentración.

En este trabajo se evidenció, que el porcentaje de  $\beta$ -CD acomplejada podría ser afectado no solo por la concentración de la % de  $\beta$ -CD agregada, sino también por las altas presiones de homogeneización. Se observa en la Grafica 14 y 18 que a 200 MPa se presenta el menor tamaño de glóbulo grasa y mayor área superficial, lo que podría estar implicando una mayor disponibilidad del colesterol. Según Del Valle, (2004) la capacidad de formar complejos de inclusión entre el colesterol y la  $\beta$ -CD, depende de dos factores, el estérico y el correspondiente a las interacciones termodinámicas entre los distintos componentes del sistema. Se necesitarían más estudios para conocer como las presiones utilizadas afectan estas interacciones.

Roycki et al., (2013), observaron que para una leche de 12,13 mg/100g de colesterol utilizando 1,624% de  $\beta$ -CD para que se produjera la formación del complejo “colesterol-  $\beta$ -CD”.se utilizó entre el 5-6% de la  $\beta$ -CD agregada. Este autor alega que en las condiciones de su trabajo cuanto más  $\beta$ -CD se agrega más colesterol es acomplejado y por ende extraído. Lo que se explicaría debido a la existencia de un equilibrio entre la  $\beta$ -CD libre y la  $\beta$ -CD acomplejada. En este trabajo, se encontró que para leche con concentración de  $12,9 \pm 1,5$  mg/100g de

colesterol el % de  $\beta$ -CD acomplejada fue del 14 y 19 % cuando la concentración de  $\beta$ -CD agregada es del 0,3 y 0,6 % y es homogeneizada a 200 y 300 MPa (Tabla 1). Estos valores de % de  $\beta$ -CD acomplejada son mayores que los encontrados por Roycki et al., (2013) (5-6%) al utilizar 1,624% de  $\beta$ -CD agregada y 13,7 MPa.

Para los estudios de remoción de colesterol, se utilizaron leches crudas con distintas concentraciones de colesterol inicial como se muestra en Tabla 3. Las concentraciones de materia grasa y colesterol en leche fueron variables, debido a que fueron recogidas en distintos periodos del año de un mismo tambo, con alimentación en base pastoril, donde las vacas del rodeo estuvieron sometidas a distinto clima, alimentación, periodo de lactancia, etc. El promedio de la concentración inicial de colesterol de las leches crudas fue de  $12,9 \pm 1,5$  mg/100 g leche. También se presentaron variaciones del colesterol expresado por materia grasa de la leche, encontrándose que 5 de las leches crudas presentaron valores de colesterol en materia grasa que varió entre 312 y 401 mg de colesterol/100 g de MG y un 183 mg de colesterol/100 g de MG. Se han reportado valores de colesterol que varían desde 308 a 606 mg de colesterol /100 g de MG, tomando un período de 5 años en Estados Unidos y distintos sistemas de producción (Jensen, 2002). En Alemania, Precht et al. (2001) reportaron valores entre 204 y 337 mg/100 g de MG, en vacas alimentadas a pasturas. Sería recomendable para un posible uso de esta tecnología de remoción realizar un estudio de los parámetros de colesterol en leche que se presenten según zonas geográficas y sistemas de producción en Uruguay, para tener en cuenta posibles variabilidades que se puedan encontrar a la hora de realizar el proceso.

### **6.3 Tamaño de partícula del glóbulo graso de la leche**

La leche cruda presentó valores de diámetro de Sauter ( $D_{[3,2]}$ ) de 3,44 micras y de media “de Broucker” ( $D_{[4,3]}$ ) de 4,31 micras, según se observa en las Figuras 14 y 15. El tamaño de las partículas de glóbulo graso para leche cruda, ha sido estudiado por varios autores, Michalski, et al, (2004) estudiaron el diámetro de

Sauter ( $D_{[3,2]}$ ) en leche entera y encontraron diámetros entre 0,93 y 3,26 en leches de tamaño de glóbulos grasos nativos pequeños y de entre 5,31 a 7,34 en las leches de tamaño glóbulos grasos nativos grande. García-Amezquita, et al., 2009 reportaron para leche bovina entera valores de media “de Broucker” ( $D_{[4,3]}$ ) de 3,34 micras, y con una distribución de diámetro que varía de 0,1 a 9 micras. Los valores que se reportan tanto en este como en los otros trabajos dependen del tipo y origen de leche, su genética, el clima, alimentación, etc.

De las Figuras 14 a 17 se observa que el tamaño de los glóbulos de grasa, expresado como  $D_{[3,2]}$ ,  $D_{[4,3]}$ ,  $D_{[v,50]}$  y  $D_{[v,90]}$ , disminuye a medida que aumenta la presión de homogeneización aplicada hasta los 200 MPa, donde alcanza el mínimo y a los 300 MPa los diferentes diámetros estudiados aumentan significativamente. Esta disminución del tamaño con la presión de homogeneización y posterior aumento fue encontrada por otros autores (Hayes and Kelly 2003, Thiebaud, et al 2003, Pereda et al 2007, Zamora et al 2012 y Amador-Espejo et al, 2014). También es explicado por Dumay et al., (2013), que la distribución del tamaño de partículas se desplaza gradualmente pero significativamente hacia valores menores con el aumento de presión y cuando se llega a 250/300 MPa se produce un aumento de tamaño, que estos autores manifiestan que es debido a la agregación de las partículas.

En este trabajo se tomaron los valores de los diámetros de los glóbulos grasos según las presiones de homogeneización aplicadas de las muestras sin agregado de  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD 0) y con el agregado de 0,6% de  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD 0,6) según se muestra en las Figuras 14 al 17. Se encontró que cuando la leche es tratada a 300 MPa y contiene 0,6% de  $\beta$ -CD, los valores de diámetro de glóbulo graso son menores que cuando no tienen  $\beta$ -CD ( $\beta$ -CD 0). No se han reportado estudios con la combinación de estos procesos, y estos resultados podrían estar indicando que la presencia de 0,6% de  $\beta$ -CD estaría afectando en los distintos fenómenos que se producen en

la agregación de los glóbulos grasos.

El diámetro medio de “Sauter”( $D_{[3,2]}$ ) disminuyó con el aumento de la presión de homogeneización hasta 200 MPa, con el concomitante aumento del área superficial específica, resultados similares fueron encontrados por Zamora et al.,

(2012) (Figuras 14 y 18). Thiebaud, et al., (2003), encontraron una disminución de los valores de tamaño de partículas dependiendo de la temperatura de entrada al homogeneizador, bajando el  $D_{[3,2]}$  de 3,10 en leche cruda a 0.19 micras cuando utilizaron homogeneización por altas presiones a 200 MPa con una temperatura de entrada al homogeneizador de 24 °C; y a 0,24 si la entrada es a 14°C. Hayes and Kelly (2003), obtuvieron disminuciones de  $D_{[v,50]}$ ,  $D_{[v,90]}$  y  $D_{[4,3]}$  entre 7 y 8 veces menores al utilizar leche entera con 200 MPa a una temperatura de entrada de 9,5 °C. En los resultados de este trabajo (Figuras 14 al 17) se observa que el  $D_{[v,50]}$  disminuye 6 veces (de 3,99  $\mu\text{m}$  a 0,63  $\mu\text{m}$ ), respectivamente mientras que solo 3 veces el  $D_{[v,90]}$  y  $D_{[4,3]}$  (6,75  $\mu\text{m}$  a 2,99  $\mu\text{m}$  y 4,31  $\mu\text{m}$  a 1,31  $\mu\text{m}$ ), siendo la temperatura de entrada al equipo de 32 °C. De acuerdo a lo observado se mantiene una tendencia similar en la disminución del tamaño de glóbulo graso que estos autores (Hayes and Kelly, 2003 y Thiebaud, et al., 2003), aunque la temperatura de entrada al equipo utilizada en este trabajo fue mayor.

Los parámetros de tamaño de glóbulos grasos además de la presión de homogeneización utilizada, dependen de la temperatura de entrada y salida del homogeneizado (Pereda et al., 2007, Zamora et al., 2012 y Amador-Espejo et al., 2014). En muestras tratadas a 100, 200 y 300 MPa Zamora et al, (2012) encontraron una disminución del tamaño de partícula  $D_{[3,2]}$  con la temperatura desde 20 a 40 °C, al igual que Pereda et al 2007 estudiando temperaturas de 30 y 40 °C de 200 MPa.

Amador-Espejo et al. (2014) estudiaron el efecto conjunto entre la presión de homogeneización y temperaturas de entradas mayores de 55 °C. Encontraron que al utilizar tratamientos con presiones de 200 y 300 MPa los parámetros de  $D_{[v,50]}$ ,  $D_{[v,90]}$ ,  $D_{[3,2]}$ , y  $D_{[4,3]}$  disminuyen desde 55 °C a 75 °C, para luego aumentar cuando se llega a 85 °C de temperatura. Esto demuestra que la agregación de las partículas que ocurre no solo es debida a los eventos que suceden en de la válvula de homogeneización, tales como alta velocidad, colisión entre partículas, cavitación y turbulencia, sino también de la temperatura inicial aplicada.

En el proceso de homogeneización, se produce la ruptura del glóbulo graso de la leche cruda, formándose así glóbulos grasos de menor tamaño, lo que provoca un aumento en el área superficial de los mismos. En este proceso se incorporan distintas proteínas de la leche a la membrana del glóbulo graso, formando una nueva estructura de la misma (Ye et al., 2004, Singh, 2006, Ye et al., 2008, Zamora et al., 2012).

La membrana del glóbulo graso de la leche representa un sistema biofísico único, y su composición es modificada con el procesamiento de la leche, como ser el tratamiento térmico, donde a temperaturas de 60-65°C la  $\beta$ -Lg estaría asociada a la membrana del glóbulo graso mediante enlaces disulfuros y esta asociación se incrementa con la temperatura (Singh, 2006). Se encontró una asociación de las micelas de caseínas mediante enlaces disulfuros de la  $\kappa$ -CN con los componentes de la membrana del glóbulo graso y además una absorción de micelas de caseína "intactas" durante el proceso de homogeneización tradicional a 7 MPa (Ye et al., 2008).

Zamora et al. (2012) demostraron mediante SDS-PAGE y microscopía electrónica las diferentes asociaciones producidas entre el material de membrana y las diferentes proteínas de la leche que se producen en procesos de pasteurización, homogeneización convencional y con altas presiones, así como los efectos de la temperatura. Encontró que en contraste con la homogeneización y pasteurización convencional, el tratamiento UHPH no solo provocó la asociación directa de  $\kappa$ -CN con la membrana del glóbulo graso a través de enlaces covalentes, sino también de la  $\alpha$ -CN y  $\beta$ -CN.

La ultra alta presión de homogeneización provoca una ruptura en los glóbulos de grasa nativos, con la creación de un mayor número de nuevos glóbulos de grasa debido al proceso, esto hace que aumente la cantidad de caseína adsorbida en la membrana del glóbulo graso para estabilizar el sistema que aumentaría con la presión. Sin embargo se presentan fenómenos de agregación de las grasas a presiones superiores a 250/300 MPa, que algunos autores explican que puede deberse a que los glóbulos de grasa se estabilizan por las micelas de caseína, que son el último componente limitante en este mecanismo (Hayes et al, 2005). Dumay et al., 2013 exponen que esta agregación puede deberse a

distintos fenómenos entre ellos estar relacionados con enfriamiento insuficiente inmediatamente a la salida de la válvula de alta presión favoreciendo la desnaturalización de las proteínas, especialmente las de suero, ayudando a la estabilización de las grasas.

En este trabajo se encontró que el área superficial específica es mayor cuando se homogeneiza a 200 MPa que a 300 MPa (Figura 18), estando relacionado al tamaño de los glóbulos grasos (Figura 14 a 17). Sin embargo, los porcentajes de remoción de colesterol (Figura 13) cuando se homogeneiza a 200 y 300 MPa son los más altos obtenidos e iguales estadísticamente (87 y 89 %). Lo que podría indicar la importancia no solo de la mayor área superficial en la mayor remoción de colesterol, sino también en el proceso de ruptura de la MGGL, y la formación de la nueva membrana.

#### **6.4 Color**

Los mayores valores de  $L^*$  encontrados en leches homogeneizadas por altas presiones también han sido observado en otros estudios (Hayes and Kelly 2003, Hayes et al., 2005, Pereda et al., 2007 y Amador espejo et al., 2014). Estos autores sugieren que este fenómeno se debe al aumento del número partículas de menor tamaño que difractan la luz de manera más eficiente percibiéndose de esta manera la leche más blanca. Se visualiza en la Tabla 6 que la leche cruda presenta valores de  $b^*$  mayores que las leches homogeneizadas en todas las presiones estudiadas, no habiendo diferencia con la utilización de  $\beta$ -CD, esta misma tendencia fue encontrada por Pereda et al., 2007 utilizando tratamientos homogeneización de 200 y 300 MPa con temperaturas de entrada de 30 y 40 ° C, y cambios pequeños en  $a^*$  y  $b^*$  fueron citados también por Hayes et al., (2005). En cuanto a los parámetros de  $a^*$ , Hayes and Kelly (2003) también encontraron valores menos negativos utilizando presiones desde 100,150 y 200 MPa, mientras que Pereda et al., (2007), si bien encontraron diferencias significativas en los valores de  $a^*$ , la tendencia fue contraria. Por otro lado, Amador Espejo et al., (2014) utilizando presiones de 200 y 300 MPa y temperaturas de entrada de 55°, 65°, 75 ° y 85° no encontraron cambios significativos de  $a^*$  y  $b^*$  en todas las condiciones que estudiaron.

## **6.5 Evaluación microbiológica**

La disminución encontrada de aerobios mesófilos en la leche (Tabla 7) de 3 unidades logarítmicas entre la leche cruda y homogeneizada a altas presiones, es debido principalmente a las condiciones de presión y de temperatura de entrada de la leche (200 MPa y Te de 32 °C) que se utilizaron en el proceso.

En las condiciones de presión y temperaturas estudiados existen varios trabajos que reportan disminución de la carga microbiana, y de patógenos comunes en la leche (Kheadr et al., 2002, Hayes et al., 2005, Pereda et al., 2007, Pedras et al., 2012, Ruiz-Espinosa et al., 2013, Amador Espejo et al., 2014), disminución que depende de la combinación de temperatura de entrada y presión utilizadas. Hayes and Kelly, (2003) reportaron reducciones de 1 unidad logarítmica en la microbiota nativa de la leche entera al trabajar con 200 MPa y 10°C. La inactivación de 3 unidades logarítmicas en bacterias psicótrofas y coliformes se reportaron con la utilización de 200-400 MPa con temperaturas de entrada de 45 y 30°C (Hayes et al., 2005 y Pereda et al., 2007). Pereda et al., (2007) obtuvieron una reducción de bacterias totales, psicótrofos y lactobacilos entre 3,3 y 3,5 unidades logarítmicas a presiones de 200 MP y 300 MPa y temperaturas de entrada de 30 °C y 40 °C, condiciones similares a las estudiadas en este trabajo.

La disminución microbiana depende de varios factores como ser la presión de homogeneización, la temperatura de entrada al equipo, el equipo utilizado (distintos diseño de válvulas de homogeneización y materiales), número de pases y la grasa de la leche (aunque en este último punto hay resultados contradictorios) (Kheadr et al., 2002, Briñez et al., 2007, Roig-Sagués et al., 2009, Donsi et al., 2009, Dumay et al., 2013, Ruiz Espinosa et al., 2013).

Estudios realizados a presiones iguales a la de este estudio (200 MPa) y menor temperatura de entrada de la leche (24 °C) reportaron reducciones microbianas de 1,5 y 2 unidades logarítmicas (Thiebaud et al., 2003 y Picart et al., 2006). Sin embargo, a temperaturas mayores se han encontrado reducciones de bacterias totales de aproximadamente 5 unidades logarítmicas con la utilización de 200 MPa y temperaturas de entrada de 55, 65 y 75 °C (Amador Espejo et al., 2014) y con 250 MPa a 55 y 70 °C (Smiddy et al., 2007).

## **6.6 Aceptabilidad por consumidores**

Según los resultados de la Tabla 8 no hubo diferencias significativas en la aceptabilidad por los consumidores entre la leche sin colesterol desarrollada con este proceso y las comerciales (procesadas con UHT y HTST) que se utilizaron en el análisis. Los valores de aceptabilidad, medida como agrado general (6 a 7 en escala hedónica) que resultaron de la prueba de consumidor en este estudio son similares a los encontrados por otros autores en leche pasteurizada (Gandy et al., 2008 y Potts et al., 2017).

Este resultado estaría indicando que los dos procesos utilizados para la obtención de la leche entera sin colesterol no tuvieron incidencia en la aceptación por parte de los consumidores. En el presente trabajo no se le explicitó al consumidor que una de las muestras de leche no contenía colesterol, siendo este un valor agregado que podría haber aumentado su aceptabilidad. Al tratarse de un producto que posee un beneficio para la salud, podría haber una influencia en el consumidor si esta es identificada al realizarse el estudio. Rebollar et al., 2016 demostraron en una investigación en quesos españoles que la sugerencia en las etiquetas de los productos tiene una influencia sobre las expectativas de los consumidores sobre los atributos y características del producto y los quesos saludables y bajos en calorías tuvieron mayor puntuación en la voluntad de compra del producto de los participantes.

La utilización de  $\beta$ -CD como acomplejante químico para remover el colesterol en leche entera, con porcentajes entre 0,9 a 1,5%, fue evaluada sensorialmente con el descriptor de "gusto" en leche entera sin colesterol por Rozycki et al., (2013). Resultando que el 77% de los consumidores la clasificaron en un nivel de aceptabilidad entre buena y muy buena.

En cuanto al proceso de homogeneización por altas presiones Amador Espejo et al., (2014) compararon leche UHT con la procesada por UHPH con panel de jueces entrenados en distintos atributos de sabor, no encontrando diferencias significativas entre ambos tratamientos en color, aspecto, sensación en boca, excepto el del sabor cocido (levemente menos sabor a cocido la tratada por UHPH). Boeneke et al., (2009) comparando leches tratadas UHPH a 200 MPa con leches tratadas térmicamente no encontraron diferencias en el sabor y

aparición en un periodo de 3 semanas. En los estudios realizados por estos autores, así como en este trabajo se producen incrementos de temperatura con las presiones de homogeneización utilizadas (200 y 300 MPa) que podrían causar un sabor a cocido, similar a las leches pasteurizadas.

Se ha demostrado en este trabajo que no hay diferencias significativas en el agrado general evaluado por consumidores entre la leche entera sin colesterol con otros tipos de leches comerciales. Sin embargo, cuando se requiera utilizar la leche sin colesterol para elaborar distintos tipos de productos, el proceso desarrollado puede cambiar características de los productos por lo que es necesario evaluar en cada caso particular. En quesos cheddar se encontraron diferencias en la maduración de los quesos al utilizar la  $\beta$ -CD en el proceso de remoción (Seon et al., 2009).

## **7. CONCLUSIONES**

Se logró desarrollar un proceso combinado de homogeneización por altas presiones con remoción química para obtener leche entera reducida en colesterol aceptable sensorialmente, con una carga microbiológica  $\leq 100$  ufc/ml después de 6 días almacenada a 4°C. Cuando se aplica el proceso de homogeneización a 200/300 MPa y temperatura de entrada de 32 °C, con concentración de  $\beta$ -CD del 0,6% se extrae el 87-89 % del colesterol inicial, permitiendo obtener una leche que puede ser denominada como “sin colesterol”, según la normativa MERCOSUR REG/GMC/RES/ N°01/12.

La leche reducida en colesterol obtenida a partir de la homogeneización a 200 MPa y 0,6%  $\beta$ -CD presenta un color más blanco que la leche cruda y un tamaño de partícula de glóbulo graso menor. Además, presenta una reducción de microorganismos aerobios totales de manera que luego de aplicado el proceso cumple con el criterio microbiológico de este parámetro que es necesario para la leche apta para consumo humano. Estos efectos son producidos por la utilización de UHPH que es una tecnología emergente de conservación con la potencialidad de producir alimentos saludables y nutritivos.

La leche obtenida tuvo una aceptación en el agrado general por prueba con consumidores similar a las leches HTST y UHT que se comercializan en el mercado.

La utilización de UHPH combinada con la remoción química del colesterol con  $\beta$ -CD logró obtener una leche entera reducida en colesterol, que permitiría elaborar derivados lácteos reducidos en colesterol y así generar mayor valor agregado a la leche y sus subproductos.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

Alais Ch.2003. Ciencia de la leche. Editorial Reverté publicada en 1985. 4ta edición reimpressa en 2003. pp.17

Alonso, L.; Cuesta, P.; Fontecha, J.; Juarez, M.; Gilliland, S.E. 2009. Use of  $\beta$ -cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 92, pp.863–869.

Amador-Espejo, G.G.; Suárez-Berencia, A.; Juan, B.; Bárcenas, M.E; Trujillo, A.J. 2014. Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of Dairy Science*. 97, pp.659–671

Amador-Espejo, G.G.; Gallardo-Chacon, J.J.; Nykanen, H.; Juan, B.; Trujillo, A. J.2015. Effect of Ultra High-Pressure Homogenization on hydro-and liposoluble milk vitamins. *Food Research International*. 77, pp. 49-54

Argov, N.; Lemay D.G.; German J. 2008. Milk fat globule structure and function: nanoscience comes to milk production. *Trends in Food Science & Technology* 19, pp. 617-623

Astray, C.; González-Barreiro, J.C.; Mejuto, R.; Rial-Otero; Simal-Gandara, J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, pp.1631–1640.

Barbosa-Cánovas, G.; Bermúdez-Aguirre, D. 2010. Procesamiento no térmico de alimentos Non thermal Processing of Food. *Scientia Agropecuaria*, 1, pp. 81 – 93.

Betoret, E; Betoret, N.; Rocculi, P.; Dalla Rosa, M.2015. Strategies to improve food functionality: Structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. *Trends in Food Science & Technology*. pp. 1-12.

Barłowska, J.; Sz wajkowska, M.; Litwińczuk, Z.; Matwijczuk, A. 2011. The influence of cows breed and feeding system on the dispersion state of milk fat and content of cholesterol. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 3, pp. 57-65

Boeneke, C.A.; Pastorek, A.; Aryana, K.J.; 2009. Effect of high pressure homogenization on milk. *Milchwissenschaft*, 64, pp.40–42.

Drake, M.A. 2007. Sensory analysis of dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 90, pp. 4925-4937

Bonczar, G.; Walczycka, M.B.; Domagała, J.; Maciejowski, K.; Dorota Najgebauer-Lejko, D.; Sady, M.; Wszolek, M. 2016. Effect of dairy animal species and of the type of starter cultures on the cholesterol content of manufactured fermented milks. *Small Ruminant Research*, 136, pp. 22–26.

Brändle, J.; Domig, K.J.; Kneifel, W. 2016. Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control* 67, pp. 96-113.

Briñez W.J.; Roig-Sagués, A.X.; Hernández Herrero, M.M.; Guamis-López. B. 2006. Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultra-high-pressure homogenization. *Lait*, 86, pp.241-249

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

- Briñez, W.J. 2008 Cap. LXXIX. La ultra alta presión de homogeneización, tecnología para la conservación de lácteos fluidos. Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito. Ediciones Astro Data S.A, pp. 930-940.
- Cano-Ruiz, M.E.; Richter, R.L. 1997. Effect of homogenization pressure on the milk fat globule membrane proteins. *Journal of Dairy Science*, 80, pp.732-2739
- Castro-Gómez, P.; Garcia-Serrano, A.; Visioli, F.; Fontecha, J. 2015. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 101, pp. 41–51
- Clifton, P.M.; Noakes, M.; Sullivan, D.; Erichsen, N.; Ross, D.; Annison, G, Fassoulakis, A.; Cehun, M.; Nestel, P. 2004. Cholesterol lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, pp.503-509.
- Codina-Torrella, I.; Guamis, B.; Zamora, A.; Quevedo, J.M.; Trujillo, A.J. 2018. Microbiological stabilization of tiger nuts' milk beverage using ultra-high pressure homogenization. A preliminary study on microbial shelf-life extension. *Food Microbiology* 69, pp. 143-150.
- Coppa, M.; Ferlay, A., Monsallier, F.; Verdier-Metz, I.; Pradel, P., Didiene, R., Farruggia, A.; Montel, M.C.; Martin, B. 2011. Milk fatty acid composition and cheese texture and appearance from cows fed hay or different grazing systems on upland pastures. *Journal of Dairy Science*, 94, pp. 1132–1145
- Couvreur, S.; Hurtaud, C.; Marnet, P.G.; Faverdin, P.; Peyraud, J.L. 2007. Composition of Milk Fat from Cows Selected for Milk Fat Globule Size and Offered Either Fresh Pasture or a Corn Silage-Based Diet. *Journal of Dairy Science*, 90, pp.392–403.
- Datta, N.; Hayes, M.G.; Deeth, H.C.; Kelly, A.L. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*, 72, pp. 393–399.
- Deeth, H.C. and Datta, N. 2011. Ultra-High Temperature Treatment (UHT) Heating Systems. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Editorial Elsevier, 2, pp.699-708.

Dias, H.M.A.M.; Berbicz, F. Pedrochi, F.; Baesso, L.M.; and Matioli, G. 2010. Butter cholesterol removal using different complexation methods with beta-cyclodextrin and the distribution of photoacoustic spectroscopy to the evaluation of the complex. *Food Research International*, 43, pp.1104-1110

Dong, P.; Georget, E.S; Aganovic, K.; Heinz V.; Mathys, A. 2015. Ultrahigh pressure homogenization (UHPH) inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens* spores in phosphate buffered saline (PBS) and milk. *Frontiers in Microbiology*, 6, (712), pp. 1-11.

Donsi, F.; Ferrari, G.; Lenzab, E.; Maresca, P. 2009. Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating Chemical parameters and scale of operation. *Engineering Science*, 64, pp.520 – 532.

Donsi, F.; Ferrari, G.; Maresca, P.2009 b. High-pressure homogenization for food sanitization. *Global Issues in Food Science and Technology*, Editorial Elsevier. pp. 309–352.

Dumay, E.; Chevalier-Lucia, D.; Picart-Palmade, L.; Benzaria, A.; Gracia-Julia, A.; Blayo, C. 2013. Technological aspects and potential applications of ultra-high-pressure homogenization. *Trends in Food Science & Technology*, 31, pp.13-26.

Escobar, D. 2010. Potencial de la tecnología de homogeneización por alta presión en lácteos. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 61, pp.44-51

Escobar, D.; Clark, S.; Ganesan, V.; Repiso, L.; Waller, J.; Harte, F. 2011. High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition, and texture of queso fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 94, pp.1201–1210

Fernández Fernández, E.; Martínez Hernández, J.F.; Martínez Suárez, V.; Moreno Villares, J.M.; Collado Yurrita, L.R.; Hernández Cabria, M.; Morán Rey, F.J. 2015. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrition Hospitalaria*, 31(1) pp. 92-101

Fleming, A., Schenkel, F.S., Chen, J., Malchiodi, F., Ali, R.A., Mallard, B., Sargolzaei, M., Corredig, M.; Miglior, F. 2017. Variation in fat globule size in

bovine milk and its prediction using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 100, pp.1640–1649

Floury J., Desrumaux, A.; Axelos, M. A. V.; Legrand, J. 2002. Degradation of methylcellulose during ultra-highpressure homogenisation. *Food Hydrocolloids*, 16, pp.47-53

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

Floury J., Legrand, J.; Desrumaux, A. 2004b. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. Study of droplet break-up and recoalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*, 59, pp.1285-1294.

Gandy, A.L.; Schilling, M.W.; Coggins, P.C.; White, C.H.; Yoon, Y.; Kamadia, V.V. 2008. The Effect of Pasteurization Temperature on Consumer Acceptability, Sensory Characteristics, Volatile Compound Composition, and Shelf-Life of Fluid Milk. *Journal of Dairy Science*, 91, pp.1769–1777.

García, C.A.C.; Montiel, R.L.; Borderas, T. F. 2014. Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Archivos de Zootecnia*. 63, pp. 85-105.

Garcia-Amezquita, L.E.; Primo-Mora, A.R.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Sepulveda, D.R. 2009. Effect of non thermal technologies on the native size distribution of fat globules in bovine cheese-making milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, pp. 491–494

Garcia Rojas, E.E.; Coimbra, J.S.R.; Minim, L. A.; Freitas, J.F. 2007. Cholesterol removal in liquid egg yolk using high methoxyl pectins. *Carbohydrate Polymers*, 69, pp.72–78.

Gracia-Julia. A.; Rene, M.; Cortes-Muñoz, M.; Picart, L.; Lopez-Pedemonte, T.; Chevalier; D.; Dumay, E. 2008. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 22, pp. 1014-1032

- Gómez-Cortés, P.; Viturro, E.; Juárez, M.; De la Fuente, M.A. 2015. Alternative to decrease cholesterol in sheep milk cheeses. *Food Chemistry*, 188, pp. 325–327
- Han, E.M.; Kim, S.H.; Ahn, J.; Kwak, H.S. 2007. Optimization cholesterol removal from cream using  $\beta$ -cyclodextrin cross-linked with adipic acid. *International Journal of Dairy Technology*, 60, pp. 31–36
- Han, E.M.; Kim, S. H.; Ahn, J.; Kwak, H. S. 2008. Comparison of cholesterol-reduced cream cheese manufactured using crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin to regular cream cheese. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21, pp. 131–137.
- Hayes, M.G. and Kelly, A. 2003. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a). *Journal of Dairy Research*, 70, pp.297–305.
- Hayes, M.G.; Fox, P. F.; Kelly, A.L. 2005. Potential applications of high-pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72, pp.25-33
- Heid, H.W and Keenan, T.W. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology*, 84, pp. 245-58.
- Huber, W.; Molero, A.; Pereyra C.; Martínez de la Ossa, E. 1996. Dynamic supercritical CO<sub>2</sub> extraction for removal of cholesterol from anhydrous milk fat. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, pp. 143–151
- Jensen, R.G. 2002. Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85, pp. 295–350.
- Jung, H. J.; Ganesan, P.; Lee, S.J.; Kwak, H.S. 2013. Comparative study of flavor in cholesterol-removed Gouda cheese and Gouda cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 96, pp.1972–1983.
- Kwak, H.S.; Kim, S.H.; Kim J.H.; Choi, H.J.; Kang, J. 2004. Immobilized  $\beta$ -Cyclodextrin as a Simple and Recyclable Method for Cholesterol Removal in Milk *Archives of Pharmacal Research*, 27, pp. 873-877
- Kim, S.H.; Ahn, J.; Kwak, H. S. 2004. Crosslinking of  $\beta$ -cyclodextrin on cholesterol Removal from Milk. *Archives of Pharmacal Research*, 27, pp.1183-1187.

- Kim, J.J.; Jung, T.H.; Ahn, J.; Kwak, H.S. 2006. Properties of Cholesterol-Reduced Butter Made with  $\beta$ -Cyclodextrin and Added Evening Primrose Oil and Phytosterols. *Journal of Dairy Science*, 89, pp.4503-4510
- Kheadr, E. E.; Vachon, J. F.; Paquin, P.; Fliss, I. 2002. Effect of dynamic pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 12, pp. 435-446
- Kleinig A.R. and Middelberg, A. P. J. 1998. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*, 53, pp.891-89
- Lee, D.K.; Ahn, J.; Kwak, H.S. 1999. Cholesterol removal from homogenized milk with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*, 82, pp.2327- 2330.
- Logan, A.; Auldist, M.A.; Greenwood, J.; Day, L. 2014. Natural variation of bovine milk fat globule size within a herd. *Journal of Dairy Science*, 97, pp.4072-4082.
- Logan, A.; Xu, M.; Day, L.; Singh, T.; Moore, S.C.; Mazzonetto, M. L.; Auldist, M.A. 2017. Milk fat globule size affects Cheddar cheese properties. *International Dairy Journal*, 70, pp 46-54.
- Lopez, C. 2011a. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, pp. 391-404.
- Lopez, C.; Briard-Bion, V.; Ménard, O.; Beaucher, E.; Rousseau, F.; Fauquant, J.; Leconte, N.; Robert, B. 2011b. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains. *Food Chemistry*, 125, pp.355-368
- Lopez, C; Madec, M.N.; Jimenez-Flores, R. 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chemistry*, 120, pp.22-33
- Loveday, S.M.; Sarkar, A.; Singh, H. 2013. Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. *Trends in Food Science & Technology* 33, pp. 5-20

- McGhee, C. E.; Jones, J.O.; Park, Y.W. 2015. Evaluation of textural and sensory characteristics of three types of low-fat goat milk ice cream. *Small Ruminant Research*, 123, pp.293-300.
- Menotti, A.; Lantia, M.; Kromhoutb, D.; Blackburnc, H.; Jacobsd, D.; Nissinend, A.; Dontase, A.; Kafatosf, A.; Nedeljkovicg, S.; Adachih, H. 2008. Homogeneity in the relationship of serum cholesterol to coronary deaths across different cultures: 40-year follow-up of the Seven Countries Study. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 15, pp.719-725
- Mesilati, S.R.; Argov, A.N. 2014. The relationship between size and lipid composition of the bovine milk fat globule is modulated by lactation stage. *Food Chemistry*, 145, pp.562–570
- Michalskia, M.C; Ollivon, M.; Briard, V.; Leconte, N.; Lopez, C. 2004. Native fat globules of different sizes selected from raw milk: thermal and structural behavior. *Chemistry and Physics of Lipids*, 132, pp.247–261
- Michalski, M.C.; Briard, V., Michel, F.; Tasson, F.; Poulain, P. 2005. Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk, and infant formula. *Journal of Dairy Science*, 88, pp.1927–1940.
- Middelberg A.P.J. 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13, pp.491-551
- Miller J.; Rogowski, M.; Kelly, W. 2002. Using a CFD model to understand the fluid dynamics promoting *E. coli* breakage in a high-pressure homogeniser. *Biotechnology. Progress*, 18, pp.1060-1067
- Mohamed, R.S.; Saldan, M.D.A.; Socantaype, F.H.; Kieckbusch, T.G. 2000. Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. *Journal of Supercritical Fluids*, 16, pp. 225–233
- Mor-Mur. 2010. Alimentos tratados por alta presión. Aspectos Nutricionales. *Revista Española de Nutrición Humana y dietética* 14, pp. 53-58.
- Murthy, A.V.R.; Guyomarch, F.; Paboeuf, G.; Vié, V.; Lopez, C. 2015. Cholesterol strongly affects the organization of lipid monolayers studied as models of the milk

fat globule membrane: Condensing effect and change in the lipid domain morphology. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1848, pp. 2308–2316.

Oggioni, C.; Cena, H.; Wells, J.C.K.; Lara, J.; Celis-Morales, C.; Siervo, M. 2015. Association between worldwide dietary and lifestyle patterns with total cholesterol concentrations and DALYs for infectious and cardiovascular diseases: Anecological analysis. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 5, pp.315–325.

Oliveira, G.R.; Santos, A.V.; Lima, A.S.; Soares, C.M.F.; Leite, M.S. 2015. Neural modelling in adsorption column of cholesterol-removal efficiency from milk. *Food Science and Technology*, 64, pp.632-638

Ong, D.P.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y. 1990. Supercritical fluid extraction and chromatography of cholesterol in food sample. *Journal of Chromatography*, 515, pp.509-513.

Ortega-Anaya, J. and Jiménez-Flores, R. 2019. Symposium review: The relevance of bovine milk phospholipids in human nutrition—Evidence of the effect on infant gut and brain development. *Journal Dairy Science*, 102, pp 2738–2748.

Paquin P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9, pp.329-335

Pandolfe W.D. and Kinney, R.R. 1998. High-pressure homogenisation: latest technology expands performance and product possibilities. *Chemical Processing*, 61, pp.39-43

Pedras, M.M., Pinho, C.R.G, Tribst, A.A.L.; Franchi, M.A.; Cristianini, M. 2012. The Effect of high pressure homogenization on microorganisms in milk. *International Food Research Journal*, 19, pp. 1-5

Pereda J.; Ferragut, V.; Quevedo, J. M.; Guamis, B.; Trujillo, A. J. 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90, pp.1081-1093

Picart L., Thiebaud, M.; René, M.; Guiraud, J. P; Cheftel, J. C; Dumay, E. 2006. Effects of high pressure homogenization of raw bovine milk on alkaline

phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research.*, 73, pp.1-10

Pinho, C.R G.; Franchi, M.A.; Tribst, A.A.L.; Cristianini, M. 2011. Effect of high pressure homogenization process on *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores in skim milk. *Procedia Food Science*, 1, pp.869 – 873.

Pinho, C.R.G.; Franchi, M.A.; Tribst, A.A.L.; Cristianini, M. 2015.Effect of ultra high pressure homogenization on alkaline phosphatase and lactoperoxidase activity in raw skim milk. *Procedia Food Science* 1, pp. 874 – 878.

Potts, H.L.; Amin, K.N.; Duncan, S.E. 2017. Retail lighting and packaging influence consumer acceptance of fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 100, pp. 146–156

Precht D., 2001. Cholesterol content in European bovine milk fats. *Nahrung*, 45, pp. 2-8

Presidencia de la República Oriental del Uruguay. Reporte Uruguay 2015. [www.opp.gub.uy/hacemos/presupuesto/agev](http://www.opp.gub.uy/hacemos/presupuesto/agev)

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Poliseli-Scopel, F.E.; Hernández-Herrero, M.; Guamis, B.; Ferragut, V. 2013. Characteristics of soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization (UHPH). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, pp. 73-80.

Rebollar, R.; Lidón, I.; Gil, I.; Martín, J.; Fernández, M.J.; Riveres, C.E. 2016.The influence the serving suggestion displayed on soft cheese packaging has on consumer expectations and willingness to buy. *Food Quality and Preference*, 52, pp. 188–194.

Reglamento Bromatológico Nacional, 1994. Decreto N° 315/994.

Rinaldi, L.; Binello, A.; Stolle, A.; Curini, M. and Cravotto, G. 2015. Efficient mechanochemical complexation of various steroid compounds<sup>4</sup> with  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrin. *Steroids*, 98, pp. 58–62.

Roach, A., and Harte, F. 2008. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, pp.1–8.

Rodríguez-Alcalá, L.M.; Calvo, M.V.; Villar-Tajadura, M.T.; Castro-Gómez, P.; Holgado, F.; Juárez, M.; Fontecha, J. 2014. Desarrollo de una línea base para la potencial generación de productos lácteos diferenciados y protocolos de producción de leche y derivados de alto valor nutricional. Cap. 4 Lípidos bioactivos en productos lácteos. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/113482/1/L%C3%ADpidos%20bioactivos.pdf>. pp. 57-71.

Roig-Sagués, X.; Velázquez, R.M; Montealegre-Agramont, P.; López-Pedemonte, T.J.; Briñez-Zambrano, W.J.; Guamis-López, B.; Hernandez-Herrero, M.M. 2009. Fat content increases the lethality of ultra-high-pressure homogenization on *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Science*, 92, pp.5396-5402.

Rozycki, S.; Colombatti, F.; Spotti, M.J; Costa, F.F.; Lazzaroni, S.; Pavón Y. 2013. Obtención de leche entera sin colesterol mediante uso de  $\beta$ -ciclodextrina. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 68, pp.-32-38.

Ruiz-Espinosa H.; Amador-Espejo, G.G; Barcenas-Pozos, M.E.; Angulo-Guerrero, J.O.; Garcia, H.S.; Welti-Chanes, J. 2013. Multiple-pass high-pressure homogenization of milk for the development of pasteurization-like processing conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 56, pp.142-148.

Sahena, F.; Zaidul, I.S.M.; Jinap, S.; Karim, A.A.; Abbas, K.A.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M. 2009. Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 95, pp. 240–253

Sandra, S., and Dalgleish, D. G. 2005. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*. 15, pp.1095–1104.

Santillán- Urquiza, E.; Ruiz-Espinosa, H.; Angulo-Molina, A.; Vélez Ruiz, J.F. Méndez-Rojas, M.A. 2017. Applications of nanomaterials in functional fortified

dairy products: Benefits and implications for human health. *Nutrient Delivery*. A volume in *Nanotechnology in the Agri-Food Industry*. pp 293–328

Scott, S. A.; Brooks, J. D.; Rakonjac, J.; Walker, K. M. R; Flint, S. H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal. Dairy Technology*. 60, pp.109–117.

Seon, K. H.; Ahn, J.; Kwak, H. S. 2009. The accelerated ripening of cholesterol-reduced Cheddar cheese by crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal Dairy Science*, 92, pp. 49–57

Sharabi, S.; Okun, Z.; Shpigelman, A. 2018.Changes in the shelf life stability of riboflavin, vitamin C and antioxidant properties of milk after (ultra) high pressure homogenization: Direct and indirect effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47, pp. 161–169.

Shirgaonkar, I. Z.; Lothe, R. R.; Pandit, A. B. 1998. Comments on the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure and high-speed devices. *Biotechnology Progress*, 14, pp. 657–660.

Sieber, R.; Schobinger Rehberger, B.; Walther, W. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second Edition. Elsevier, 3, pp. 734-740

Singh, H. 2006. The milk fat globule membrane a biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, pp. 154-163

Siurana, A. and Calsamiglia, S. 2016. A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and the impact on daily human consumption. *Animal Feed Science and Technology*, 217, pp. 13–26

Smiddy, M.A; Martin, J.E.; Huppert, T.; Kelly, A.L. 2007. Microbial shelf life of high-pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal* 17, pp. 29–32

Suárez-Jacobo, Á. Gervilla, R.; Guamis, B.; Roig-Sagués, A.X.; Saldo, J. 2010. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice A preliminary study of microbial shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp. 261-267.

Strzałkowska, N.; Józwik, A.; Bagnicka, E.; Krzyżewski, J.; Cooper, R.G; Olav Horbańczuk, J. 2010.Factors affecting the cholesterol content of milk of cows

fed conserved feeds in a TMR system throughout the year. *Mljekarstvo*, 60, 4, pp. 273-279.

Sun, Y.; Yang, H.; Zhong, X.; Zhang, L.; Wang, W. 2011. Ultrasonic-assisted enzymatic degradation of cholesterol in egg yolk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, pp 505-508

Tahir, M.N.; Kwon, C.; Jeong, D.; Cho, E.; Paik, S.R.; Jung, S. 2013a. Cholesterol reduction from milk using  $\beta$ -cyclodextrin immobilized on glass. *Journal of Dairy Science*, 96, pp. 4191–4196

Tahir, M.N. and Lee, Y. 2013b. Immobilisation of  $\beta$ -cyclodextrin on glass: characterization and application for cholesterol reduction from milk. *Food Chemistry* 139, pp. 649–654

Taylor, M.W. and Gibbon. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second Edition. Elsevier, 3, pp, 734-740

Thiebaud, M.; Dumay, E.; Picart, L.; Guiraud, J.P.; Cheftel, J.C. 2003. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal* 13, pp. 427–439

Thomsen, A.B.; Hansen, H.B.; Christiansen, C.; Green, H.; Berger, A. 2004. Effect of free plant sterols in low fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, pp. 860-870.

Velasco, R.J., Villada, H.S.; Carrera, J.E. 2007. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18, pp. 53-66

Vituro, E.; Koenning, M.; Kroemer, A.; Schlamberger, G.; Wiedemann, S.; Kaske, M.; Meyer, H.H.D. 2009. Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression of candidate genes. *J. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 115, pp. 62–67.

Volek, J.S.; Volk, B.M.; Phinney, S.D. 2012. The twisted tale of saturated fat. *Lipid Technology*, 24, pp. 106-107.

Watanabe, K.H.; Aihara, H.; Nakamura, R. 1989. Properties of the purified extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37, pp. 1178-1182.

Walstra, P.; Wouters, J.T.M.; Geurts, T.J. 2006. Dairy Science and Technology (second edition) Taylor & Francis Group. pp. 3-65

Ye, A.; Anema, S.; Singh, H. 2008. Changes in the surface protein of the fat globules during homogenization and heat treatment of concentrated milk. Journal of Dairy Research, 75, pp. 347-353

Ye, A.; Singh, H.; Oldfield, D. J., Anema, S. 2004. Kinetics of heat-induced association of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. International Dairy Journal, 14, pp. 389-398.

Zamora, A.; Ferragut, V.; Guamis, B.; Trujillo, A.J. 2012. Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high- pressure homogenisation and conventional treatments of milk. Food Hydrocolloids, 29, pp.135-143.

Zamora, A. and Guamis, B. 2015. Opportunities for ultra-high-pressure homogenisation (UHPH) for the food industry. Journal of Food Engineering, 7, pp. 130-142.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Diseño experimental

#### Diseño factorial en dos factores, 4 niveles y 3 repeticiones.

Factores de estudio: concentración de beta ciclodextrina y presión de homogeneización.

Niveles:

Concentración de  $\beta$ -CD (m/m): 0, 0,1; 0,3 y 0,6 %

Homogeneización por altas presiones (0, 100, 200 y 300 MPa): LC, LH100, LH200 y LH300

**Variables respuesta ( $Y_{ijk}$ ): % Remoción del colesterol**

Concentración $\beta$ -CD	Presión de homogeneización			
	LC	LH100	H200	H300
0	$Y_{001}, Y_{002}, Y_{003}$	$Y_{011}, Y_{012}, Y_{013}$	$Y_{021}, Y_{022}, Y_{023}$	$Y_{031}, Y_{032}, Y_{033}$
0,1	$Y_{101}, Y_{102}, Y_{103}$	$Y_{111}, Y_{112}, Y_{113}$	$Y_{121}, Y_{122}, Y_{123}$	$Y_{131}, Y_{132}, Y_{133}$
0,3	$Y_{201}, Y_{202}, Y_{203}$	$Y_{211}, Y_{212}, Y_{213}$	$Y_{221}, Y_{222}, Y_{223}$	$Y_{231}, Y_{232}, Y_{233}$
0,6	$Y_{301}, Y_{302}, Y_{303}$	$Y_{311}, Y_{312}, Y_{313}$	$Y_{321}, Y_{322}, Y_{323}$	$Y_{331}, Y_{332}, Y_{333}$

#### 9.2 Tabla de remoción de colesterol y datos estadísticos.

Remoción de colesterol (%)			
	0,1 % $\beta$ - CD	0,3 % $\beta$ - CD	0,6 % $\beta$ - CD
LC	1,8 a	7,4 a	36,7 b
LH100	1,8 a	33,3 b	64,7 c
LH200	10,3 a	36,9 b	87,2 d
LH300	2,8 a	38,5 b	89,4 c

Se muestra el resultado del análisis de varianza de la remoción de colesterol según el porcentaje de beta ciclodextrina (%) y las presiones de ultra homogeneización utilizadas (identificación), y el colesterol en leche como covariable.

#### Análisis de la Varianza (SC tipo III)

Fuente de Variación	g.l.	F	p-valor	Coef
Modelo	12	103,78	<0,0001	
leche	3	1,12	0,3489	
$\beta$ -ciclodextrina	2	30,30	<0,0001	
colesterol	1	4,39	0,0493	-1,13
leche x $\beta$ -ciclodextrina	6	12,11	<0,0001	
Error	56			
Total	68			

Existe una relación lineal significativa ( $p < 0.0493$ ) de pendiente negativa (-1.13) entre la remoción del colesterol y el colesterol inicial de la leche cruda

### 9.3 Tabla de tamaño de glóbulo graso y datos estadísticos

LECHE	$\beta$ -CD	Dv 50 ( $\mu$ m)	Dv 90 ( $\mu$ m)	D <sub>[4,3]</sub> ( $\mu$ m)	D <sub>[3,2]</sub> ( $\mu$ m)	AS (m <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )
LC	0	3,99 c	6,8 b	4,31	3,44 e	1,75 a
LC	0,6	4,23 c	7,7 b	5,29	3,60 e	1,67 a
LH100	0	1,17 a	6,1 b	2,51	0,98 b	6,61 d
LH100	0,6	1,31 a	6,9 b	2,84	1,06 b	5,66 c d
LH200	0	0,63 a	3,0 a	1,31	0,56 a	10,81 f
LH200	0,6	0,76 a	5,7 a	2,29	0,68 a	8,85 e
LH300	0	4,42 c	16,2 d	6,92	1,85 d	3,25 a b
LH300	0,6	2,60 b	11,9 c	4,97	1,42 c	4,24 b c

#### Análisis de la Varianza (SC tipo III) en Dv50

Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	7		
leche	3	320,00	<0,0001
$\beta$ -ciclodextrina	1	132,25	0,04687
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	273,50	0,0009
Error	8		
Total	15		

#### Análisis de la Varianza (SC tipo III) en Dv90

Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	7		
leche	1	0,000	1,000
$\beta$ -ciclodextrina	3	24,727	0,000
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	5,716	0,022
Error	8		
Total	15		

#### Análisis de la Varianza (SC tipo III) Dv4,3

Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	7		
leche	3	6,698	0,032
$\beta$ -ciclodextrina	1	3,616	0,065
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	3,218	0,083
Error	8		
Total	15		

#### Análisis de la Varianza (SC tipo III) Dv 3,2

Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	7		
leche	3	42,667	0,029
$\beta$ -ciclodextrina	1	0,024	0,881
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	19,267	0,001
Error	8		
Total	15		

**Análisis de la Varianza (SC tipo III) en AS**

Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	7		
leche	3	42,66	0,0574
$\beta$ -ciclodextrina	1	4,91	<0,0001
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	9,18	0,0057
Error	8		
Total	15		

## 9.4 Tabla de color y datos estadísticos

Luminosidad L*		
	0 % $\beta$ - CD	0,6 % $\beta$ - CD
LC	91,61	92,29
LH100	94,17	94,18
LH200	94,4	94,51
LH300	94,66	95,74

Análisis de la Varianza L* (SC tipo III)			
Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	12	45.74575	<0.0001
leche	3	90.1765	<0.0001
$\beta$ -ciclodextrina	1	83.9465	<0.0001
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	8.2915	0.0002
Error	51		
Total	58		

Análisis de la Varianza a* (SC tipo III)			
Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	12	17,2293	<0,0001
leche	3	0,1218	0,7285
$\beta$ -ciclodextrina	1	27,9457	<0,0001
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	2,8024	0,04922
Error	51		
Total	58		

Análisis de la Varianza b* (SC tipo III)			
Fuente de Variación	gl	F	p-valor
Modelo	12	6,39	<0,0001
leche	3	21,366	<0,0001
$\beta$ -ciclodextrina	1	1,301	0,25981
leche x $\beta$ -ciclodextrina	3	2,575	0,07052
Error	51		
Total	58		