

## Capítulo LXXIX

### **La ultra alta presión de homogeneización, una nueva tecnología para la conservación de productos lácteos fluidos**

**Wilfido José Bríñez, MSc, DV**

---

#### **INTRODUCCIÓN**

El consumo de alimentos crudos se ha considerado como la causa más probable de infección en los diversos brotes de infecciones que han ocurrido durante la última década en todo el mundo (Orden *et al.*, 2002). Un amplio espectro de microorganismos puede contaminar los alimentos y causar enfermedades una vez que ellos y sus toxinas son consumidos.

La leche es un alimento sumamente perecedero y de una importancia especial como integrante de la dieta de personas jóvenes y de edad avanzada. Debido a su composición puede sustentar el crecimiento de muchas bacterias patógenas asociadas con ella y productos lácteos (Wang *et al.*, 1997), los cuales han sido asociados con brotes causados por *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* y, más recientemente, *Escherichia coli* O157:H7 (Johnson *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Altekruze *et al.*, 1998; Sparling, 1998).

En la conservación de alimentos para impedir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos se utilizan métodos físicos, químicos y biológicos. De los métodos físicos, los tratamientos térmicos son los escogidos en la mayoría de los casos para la conservación de la leche y otros muchos alimentos fluidos perecederos. Uno de sus inconvenientes es que las temperaturas altas pueden provocar efectos indeseables tales como alteraciones del sabor, pardeamiento no enzimático ó desnaturalización de compuestos esenciales como ciertas vitaminas y proteínas (Vachon *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2003, 2005).

En los últimos 15 años, la tendencia de identificar lo más fresco como alimentos de alta calidad ha generado un interés creciente por estos productos, y ha provocado que se realicen considerables esfuerzos de investigación para el desarrollo de nuevos procesos no térmicos para la conservación de alimentos, tales como la alta presión hi-

drostática (HHP), campos eléctricos pulsantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, pulsos lumínicos y más recientemente, la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) (Gervilla *et al.*, 2000; Diels *et al.*, 2003, 2004). Los tratamientos por alta presión son considerados como la tecnología emergente más prometedora para el procesamiento de alimentos gracias a las mejoras recientes en las máquinas de alta presión, que han permitido la introducción en el mercado de alimentos procesados por esta tecnología, nutritivos y seguros para el consumidor (Lucore *et al.*, 2000; Kheadr *et al.*, 2002).

La UHPH (también llamada alta presión dinámica) es una nueva alternativa basada en los mismos principios de diseño de la homogeneización convencional utilizada en la industria láctea para reducir el tamaño del glóbulo de grasa (1 a 10  $\mu\text{m}$ ), y a la vez, prevenir el desnatado y la coalescencia de la grasa, alargando su vida útil durante el almacenamiento (Vachon *et al.*, 2002; Hayes y Kelly, 2003; Thiebaud *et al.*, 2003). En el proceso de homogeneización convencional, la leche es forzada a través de una válvula ajustable a presiones hasta de 50 megapascuales (Mpa), las cuales provocan un incremento en la velocidad del flujo y una posterior caída de presión que trae como consecuencia un efecto de cavitación, roce, turbulencia y colisión en la fase estacionaria, que en combinación reducen el tamaño del glóbulo de grasa (Guerzoni *et al.*, 1999; Vachon *et al.*, 2002; Thiebaud *et al.*, 2003).

Presiones moderadas de homogeneización (20 a 50 MPa) se han usado extensamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética para dispersar fases no micelares y estabilizar emulsiones (Hayes y Kelly, 2003; Diels *et al.*, 2005). Sin embargo, las UHPH trabajan a presiones significativamente más altas (> 200 MPa) lo cual implica también la destrucción de grandes cantidades de microorganismos que puedan estar presentes en el alimento. En consecuencia, parece ser un importante medio para reducir la carga microbiana inicial en un alimento mientras ayudamos a minimizar los daños en el producto provocados por el calor (Popper y Knorr, 1990). No obstante, no se conocen aun de manera suficiente, los efectos de la UHPH en las células bacterianas; es probable que los microorganismos sean destruidos por la pérdida repentina de presión, la torsión, el roce y, más probablemente por la cavitación y las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de aire. El colapso en el líquido de tales cavidades podría transmitir varias fuerzas localizadas a partículas de la superficie o inclusive a las células microbianas (Popper y Knorr, 1990; Lanciotti *et al.*, 1996; Guerzoni *et al.*, 1999)

Algunas investigaciones previas usando UHPH han descrito cambios en la morfología de la célula, así como la separación o rotura de la membrana citoplasmática. Los aumentos repentinos en la permeabilidad o ruptura de la membrana de la célula, tal como puede ocurrir bajo la aplicación de alta presión puede ser la causa de la muerte celular (Kheadr *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002). Luego de un tratamiento con 5 pases a 300 MPa se observaron muy pocas células de *Listeria monocytogenes* intactas, apareciendo dañadas la mayoría de estas células, con su contenido vaciado parcial o completamente (Kheadr *et al.*, 2002). Otros estudios reportaron que los tratamientos por UHPH causaron daños en la célula, cuya severidad aumento con el nivel de presión y con el número de pases, al cual se sometió la muestra (Vachon *et al.*, 2002; Vannini *et al.*, 2004). Los daños observados fueron más severos cuando la presión aumentó y estos incluían descargas del contenido citoplasmático de la célula; además, se

demonstró que el grado de inactivación de los microorganismos dependió también de la cepa microbiana y del tipo o matriz alimenticia empleada.

En estudios recientes (Vachon *et al.*, 2002; Thiebaud *et al.*, 2003; Diels *et al.*, 2005; López-Pedemonte *et al.*, 2006; Bríñez *et al.*, 2006a,b,c; 2007) se ha evaluado la efectividad de la UHPH para inactivar microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, inoculados en diferentes matrices tales como jugo de naranja, soluciones de buffer fosfato salino (PBS) y leche, reportando diferencias significativas en los valores de letalidad cuando se ensayó con diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Listeria* y *Staphylococcus* usando diferentes temperaturas de tratamiento y número de pases. Por otro lado, se han descrito diferencias significativas en los niveles de inactivación al comparar cepas patógenas e inoquinas de los géneros *Escherichia*, *Listeria* y *Staphylococcus* presurizadas a diferentes temperaturas (Bríñez *et al.* 2006a,b,c; 2007). Estos autores han demostrado que el nivel de inactivación puede ser dependiente del género y del nivel de temperatura empleado durante el proceso de presurización.

La nueva generación de equipos de UHPH los cuales poseen un sistema de doble válvula, fabricados con aleaciones que permiten procesar los productos a presiones por encima de 300 MPa, evitan incrementar el número de pases para alcanzar niveles de letalidad aceptables superiores a las 3,0 unidades logarítmicas, hacen que esta tecnología tenga un futuro prometedor en los próximos años, requiriendo de estudios previos que permitan validar su utilización con diferentes alimentos y en diferentes condiciones de temperatura y presión.

## TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS DE LOS ALIMENTOS

La tendencia actual en todos los países es la demanda de productos naturales lo más semejante posible desde el punto de vista organoléptico y nutritivo a los productos frescos. Para ello, es necesario que estos no hayan sufrido un proceso de transformación severo y que, a su vez, sean seguros y que posean una larga vida útil (Lopez-Alonso y Antolín-Giraldo, 2004). Esta preferencia por los alimentos más frescos de alta calidad ha generado un interés creciente, y ha provocado que se desarrollen nuevos procesos no térmicos requeridos para la conservación de alimentos dentro de los que destaca la ultra-alta presión de homogeneización (UHPH) (Gervilla *et al.*, 1997, 2000; Diels *et al.*, 2003, 2004)

La búsqueda de tratamientos alternativos como la UHPH ha sido impulsada por el conocimiento que en la actualidad se tiene de la pérdida de valor nutritivo y características organolépticas que sufren los alimentos al ser sometidos a tratamientos térmicos. Por otra parte, el aumento de la demanda de los consumidores de productos de alta calidad, con características organolépticas y nutritivas semejantes a los productos frescos o naturales, y además que representen el mínimo riesgo sanitario, ha contribuido en estos últimos años al desarrollo y a la investigación de todas estas nuevas tecnologías (Splittstoesser *et al.*, 1996; McDonald *et al.*, 2000).

## ULTRA ALTA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN (UHPH)

El crecimiento de la demanda en los últimos años de alimentos novedosos, nutritivos y mínimamente procesados ha impulsado el desarrollo de métodos alternati-

vos para la higienización de alimentos buscando siempre afectar lo menos posible su apariencia, el sabor y el olor; es así, que tecnologías como las altas presiones HHP hayan alcanzado un buen auge en los últimos 10 años, aunque tienen la limitación de que solo permite tratar volúmenes reducidos de alimentos. Esto ha obligado a pensar y diseñar, procedimientos que permitan tratar grandes volúmenes de productos. Con esa idea, se ha comenzado a desarrollar la UHPH que constituye una alternativa que permite tratar mayores volúmenes de alimentos líquidos, tales como leche y jugos, aplicando presiones de hasta 400 MPa en forma continua e incluso permitiendo repetir el tratamiento en forma de ciclos hasta alcanzar un nivel de higienización adecuado.

La UHPH es una tecnología basada en los mismos principios de diseño que la homogeneización convencional (Figura 1), utilizada en la industria láctea para reducir el tamaño del glóbulo graso (1 a 10  $\mu\text{m}$ ), con el fin de incrementar la estabilidad de la emulsión durante el posterior periodo de almacenamiento de la leche (Paquin, 1999; Vachon *et al.*, 2002; Hayes y Kelly, 2003a,b; Thiebaut *et al.*, 2003). En la homogeneización convencional, la leche es forzada a pasar a través de espacios muy reducidos de una válvula ajustable a una temperatura entre 45-50°C y presiones menores de 50 MPa. Esto causa un incremento de la velocidad del fluido y una posterior pérdida de la presión a su paso por la válvula que provoca cavitación, efectos de roce, turbulencias y coalescencia en la superficie, efectos que al combinarse reducen el tamaño del glóbulo graso de la leche (Figura 1) (Guerzoni *et al.*, 1999; Vachon *et al.*, 2002; Thiebaut *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2005).

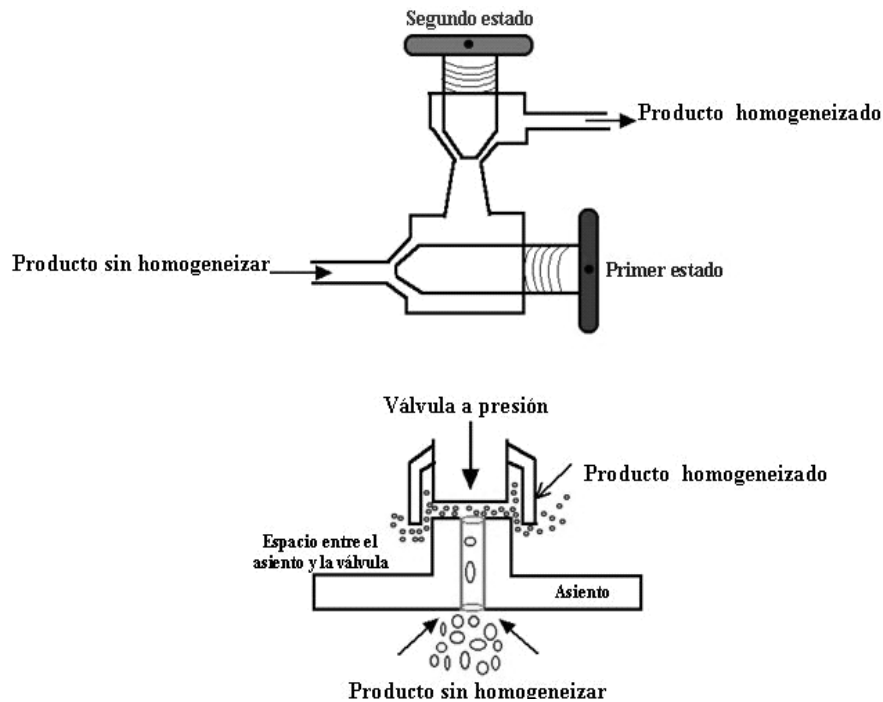


Figura 1. Esquema de una válvula en un sistema de homogeneización convencional.

Básicamente, un homogeneizador de UHPH consiste de un generador de alta presión, ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones muy altas. En cualquier tipo de válvula de homogeneización el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula, que es el espacio comprendido entre el cabezal y el asiento de la válvula, el cual puede ser regulado a través de la fuerza que se aplique al cabezal, para reducir el espacio entre este y el asiento de la válvula, lo que incrementaría el nivel de presión de tratamiento (Floury *et al.*, 2004b).

## TIPOS DE HOMOGENEIZADORES DE ALTA PRESIÓN

Varios tipos de homogeneizadores están disponibles para su uso en las industrias alimentarias, farmacéuticas y químicas. Uno de los más utilizados es el APV-Guillin, el cual solo puede alcanzar presiones máximas de 130 MPa; éste equipo tiene la capacidad de procesar volúmenes de hasta 10.000 L/h (Floury *et al.*, 2004b). Existen homogeneizadores de menor capacidad de procesamiento, pero capaces de alcanzar presiones superiores (hasta 400 MPa) e incluso cuentan con un doble sistema de válvulas dentro de los cuales se incluyen los homogeneizadores *Stansted*. La válvula *Stansted* está fabricada con un material cerámico capaz de soportar niveles de UHPH de hasta 400 MPa. Además, la geometría de la válvula ha sido modificada radicalmente, si se compara con un homogeneizador clásico de alta presión del tipo de APV-Guillin. La principal diferencia radica en que la dirección del flujo, a través de la válvula, es en reverso (Figura 2) (Floury *et al.*, 2004a,b).

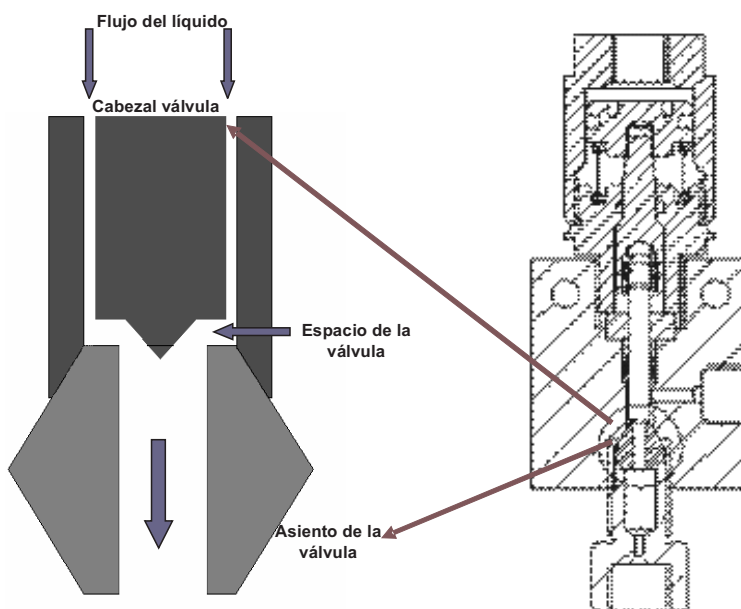


Figura 2. Sección transversal de la válvula de un homogeneizador *Stansted model/DRG FPG 7400H:350*. Flujo de la materia presurizada, cabezal y asiento de la válvula.

## **APLICACIONES DE LA UHPH EN EL PROCESADO DE LOS ALIMENTOS**

En la actualidad, el número de trabajos disponibles referentes a la inactivación de microorganismos por UHPH es limitado, sobre todo por ser esta una tecnología muy nueva y novedosa. Ha habido recientes avances en la última década en el diseño de nuevos equipos de UHPH, con doble sistema de válvula, capaces de alcanzar presiones de hasta 400 MPa, con un volumen máximo de 120 L h<sup>-1</sup>. Estos equipos hacen muy pocos años no estaban disponibles, y en la actualidad los equipos que trabajan a estos niveles de presión y volúmenes se encuentran en fase experimental. La UHPH ha sido utilizada previamente aplicando presiones de homogeneización moderadas (20 a 50 MPa) para dispersar fases no micelares y presiones inferiores a 100 MPa para producir emulsiones de gotas muy finas (0,3-0,4 μm), además para recuperar proteínas y otros componentes de las células microbianas (Popper y Knorr, 1990; Thiebaud *et al.*, 2003). La UHPH a presiones superiores de 200 MPa y temperaturas de entrada entre 40 y 50°C, puede inducir una significativa inactivación microbiana y enzimática, además de modificar las propiedades reológicas y/o de coagulación de la leche y de los productos lácteos (Popper y Knorr, 1990; Thiebaud *et al.*, 2003).

## **EFFECTOS DE LA UHPH SOBRE LOS MICROORGANISMOS**

Los efectos de la UHPH en las células bacterianas no son aun bien conocidos. Se cree que los microorganismos son destruidos por la pérdida repentina de presión, la torsión, el roce y, más probablemente, por cavitación y por las ondas de choque resultantes de la explosión de las burbujas de gas durante la aplicación de UHPH. El colapso en el líquido de tales cavidades podría transmitir varias fuerzas localizadas a partículas de superficie, o inclusive a células bacterianas (Popper y Knorr, 1990; Lanciotti *et al.*, 1994, 1996; Guerzoni *et al.*, 1999). La pared celular parece ser el objetivo principal de los daños ocasionados por la aplicación de este tipo de tratamientos, aunque también pueden ocurrir la inactivación de ciertos enzimas intracelulares (Kheadr *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002). Durante la aplicación de la UHPH ocurre un súbito incremento de la permeabilidad celular o se produce una ruptura de la membrana, lo que ocasiona una lesión irreversible y muerte celular, impidiendo una regeneración o reactivación de la célula como ocurre con la HHP, lo que, en teoría, convierte a esta tecnología en una técnica muy efectiva y segura al no generar microorganismos lesionados (Vachon *et al.*, 2002).

En estudios recientes (López-Pedemonte *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2006a,b,c; 2007) donde los autores compararon los valores de letalidad en diferentes matrices con diferentes cepas, no observaron ninguna diferencia significativa en los valores entre los medios enriquecido y con factor estresante (TSAYE y TSAYE + NaCl) respectivamente, indicando que los tratamientos de UHPH 300 + 30 MPa causaron pocos, o ningún daño subletal en *L. innocua*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. carnosus* y *S. aureus*. Resultados similares han sido descritos por Wuytack *et al.* (2002), los cuales no observaron daños subletales en cepas de *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus* inoculados en PBS y presurizados entre 100 y 300 MPa. Por otra parte, este mismo grupo de investigación señalaron en otro estudio (Wuytack *et al.*, 2003) que los tratamientos de



UHPH causaron poco, o ningún daño subletal en *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* cuando fue inoculada en PBS y presurizada entre 100 y 200 MPa, con una temperatura de entrada de 25°C. Adicionalmente, los investigadores observaron que el número de lesionados era menor al generado por otras tecnologías entre las que se incluye la HHP, los tratamientos térmicos y otras tecnologías emergentes.

Se ha reportado que la severidad de los daños a nivel de la pared celular aumenta con el nivel de presión y con el número de pases al cual es sometida la matriz inoculada con el microorganismo (Vachon *et al.*, 2002; Vannini *et al.*, 2004), observándose ruptura de la membrana y descargas del contenido citoplasmático de la célula. A presiones de 300 MPa con cinco pases, se observaron muy pocas células intactas y la mayoría aparecieron rotas, con vaciamiento parcial o completo de su contenido, producto de los daños ocasionados a su pared celular (Vachon *et al.*, 2002).

## FACTORES QUE AFECTAN LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS TRATADOS POR UHPH

Dentro de los factores que afectan los tratamientos por UHPH hay que destacar el tipo de microorganismo, la temperatura de entrada de la muestra, el tipo de matriz, el nivel de presión y el número de pases empleados en el tratamiento. Se han realizado algunas investigaciones para aclarar el efecto de estos factores sobre la inactivación microbiana. En diversos estudios (Bríñez *et al.*, 2006a,b,c; 2007), los autores demostraron la capacidad de la UHPH de reducir los recuentos de los diferentes microorganismos estudiados en leche entera y desnatada. La inactivación lograda por estos autores de *L. innocua* ATCC 33090, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, *S. carnosus* CECT 4491 y *S. aureus* ATCC 13565 por tratamientos de UHPH a 300+30 MPa, usando un único pase y temperaturas de entrada de 6 y 20°C en leche entera y desnatada se muestra en las Figuras 3 y 4.

La aplicación de UHPH en leche presentó una reducción aceptable de los recuentos en las muestras presurizadas, que como mínimo varió alrededor 3,0 log<sub>10</sub> UFC/mL en todos los casos, a excepción de *S. carnosus* a 6°C, que resultó ser muy resistente bajo estas condiciones de estudio. En las Figuras 3 y 4 se observa que los tratamientos de UHPH no mostraron la misma eficacia contra todas las cepas probadas, observándose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los valores de letalidad entre las cepas cuando se aplicó el tratamiento en la misma matriz y a la misma temperatura de entrada. En general, las cepas de *E. coli* y *L. innocua* fueron las más sensibles, mientras que *S. carnosus* fue la cepa más resistente a la UHPH, sobre todo cuando el tratamiento se aplicó a una temperatura de entrada de 6°C. Similar compartimiento fue descrito previamente por Wuytack *et al.* (2002) en *S. aureus* inoculado en PBS después de tratamientos de UHPH entre 100 y 300 MPa a 25°C.

En estudios conducidos por Diels *et al.* (2004) utilizando *E. coli* y presurizada mediante UHPH, se observó que el nivel de inactivación bacteriana incrementó con la temperatura de entrada (5, 20, 25, 35, 45 y 50°C). En otros estudios (Bríñez *et al.*, 2006a,b,c; 2007), empleando temperaturas de 6 y 20°C también se observó un comportamiento similar al descrito previamente (Vachon *et al.*, 2002; Diels *et al.*, 2004) con una mayor letalidad cuando se incrementó la temperatura de entrada en la máquina

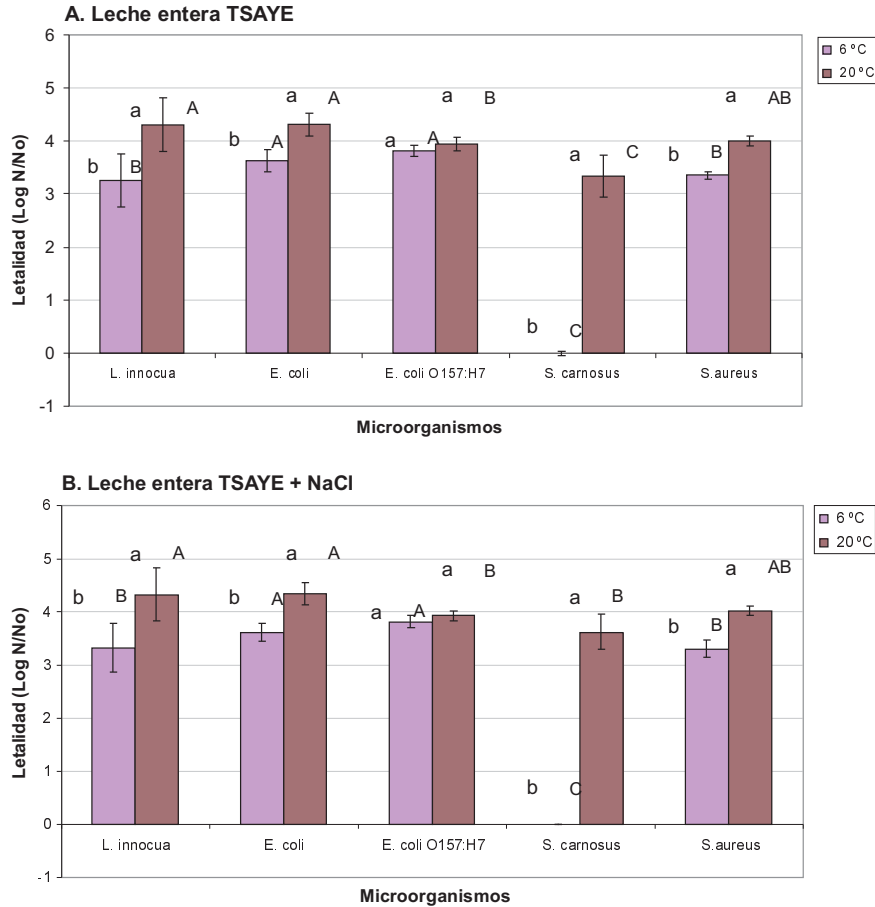


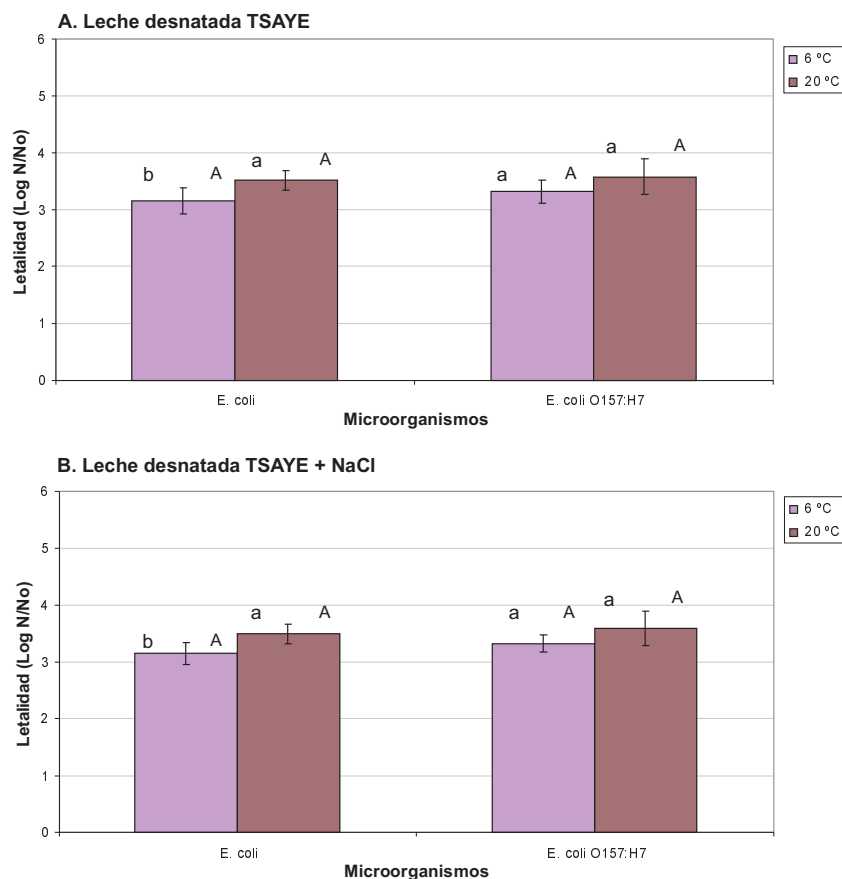
Figura 3. Inactivación de *Listeria innocua* ATCC 33090, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857, *Staphylococcus carnosus* CECT 4491 y *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 en leche entera tratada por UHPH (300 + 30 MPa), usando temperaturas de entrada de 6 y 20°C.

Los sobrevivientes fueron enumerados usando agar triptonsoja con extracto de levadura (TSAYE) y TSA-YE con 20, 30 y 60 g/litro de sal adicionada (TSAYE + NaCl). Barras correspondientes al mismo microorganismo pero con diferentes letras minúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Barras correspondientes a la misma temperatura de entrada pero con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Los datos son presentados como medias de cuatro réplicas  $\pm$  intervalos de confianza.

de UHPH, lo que indica un claro efecto de la temperatura en los valores de letalidad para todas las cepas estudiadas.

Por otra parte, la aplicación de tratamientos de UHPH a temperaturas bajas (6°C), sería interesante para la industria láctea, ya que la leche podría ser procesada inmediatamente después de la descarga, con la misma temperatura de refrigeración que trae de los centros de producción. Sin embargo, 3,0 unidades logarítmicas de reducción podrían no ser suficientes, dependiendo de la calidad microbiológica de la leche, por lo que se requiere mejorar las prestaciones de los equipos de UHPH que permitan





**Figura 4. Inactivación de *Escherichia coli* ATCC 10536 y *Escherichia coli* O157:H7 CCUG 44857 en leche desnatada tratada por UHPH (300 + 30 Mpa), usando temperaturas de entrada de 6 y 20°C.**

Los sobrevivientes fueron enumerados usando agar triptona soja con extracto de levadura (TSAYE) y TSAYE con 20, 30 y 60 g/litro de sal adicionada (TSAYE + NaCl). Barras correspondientes al mismo microorganismo pero con diferentes letras minúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Barras correspondientes a la misma temperatura de entrada pero con diferentes letras mayúsculas difieren significativamente ( $P \leq 0,05$ ). Los datos son presentados como medias de cuatro replicas  $\pm$  intervalos de confianza.

en el futuro lograr mayores reducciones. Otra consideración importante es la inactivación de enzimas, tales como las lipasas, para poder determinar la mejor temperatura de entrada para los tratamientos de UHPH de leche, otros productos lácteos y jugos de frutas.

En los estudios conducidos por Bríñez *et al.* (20006a,b,c; 2007) observaron que el nivel de inactivación en todas las cepas, entre las diferentes matrices estudiadas, fue diferente. La leche desnatada mostró los valores más bajos de letalidad en comparación con la leche entera para las cepas *E. coli* ATCC 10536 y *E. coli* O157:H7 CCUG 44857, presurizadas a 6 y 20°C. En leche entera, se observaron los mayores niveles de

inactivación a 20°C ( $4,30 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>) para las cepas *L. innocua* *E. coli*. Algunas reducciones fueron observadas de aproximadamente 8,0 log UFC/mL en los recuentos de *L. monocytogenes* en PBS y de aproximadamente 6,0 log UFC/mL en leche, tras un tratamiento de UHPH de 5 pases a 300 MPa (Vachon *et al.*, 2002).

## CONCLUSIONES

Los tratamientos por UHPH de leche entera y desnatada a 300 + 30 MPa, con un único pase y temperaturas de entrada de 6 y 20°C permiten alcanzar reducciones superiores a las 3,0 unidades logarítmicas a todos los microorganismos estudiados, a excepción de *Staphylococcus carnosus* que mostró mayor resistencia, mientras que en *Escherichia coli* y *Listeria innocua* se observó una mayor sensibilidad. Por otra parte, se aprecia que los valores de letalidad se incrementan con la temperatura para todos los microorganismos y matrices estudiadas. En leche entera se observan valores de letalidad superiores a los de leche desnatada.

El tratamiento de UHPH no causa daños subletales aparentes a ninguno de los microorganismos estudiados, cuando son tratados en leche entera y leche desnatada. Los resultados de los diferentes estudios con varias matrices y microorganismos sugieren que la tecnología de UHPH, en combinación con un incremento en la temperatura de entrada puede ofrecer una prometedora alternativa a la pasteurización de la leche y de otros alimentos líquidos.

## LITERATURA CITADA

- Altekruse S F, Timbo BB, Mowbray JC, Bean NH, Potter ME. 1998. Cheese-Associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacture practices protect consumer. *J Food Protec* 61(10): 1405-1407.
- Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernandez-Herrero MM, Guamis López B. 2006a. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. *Journal of Food Protection*, 69(1): 86-92.
- Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernandez-Herrero MM, Guamis López B. 2006b. Inactivation by ultrahigh-pressure homogenization of *Escherichia coli* strains inoculated into orange juice. *J Food Protec* 69(5): 984-989.
- Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernandez-Herrero MM, Guamis López B. 2006c. Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh-pressure homogenisation. *Lait* 86: 241-249.
- Briñez WJ, Roig-Sagués AX, Hernandez-Herrero MM, Guamis López B. 2007. Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20°C. *Food Control* 18: 1282-1288.
- Diels AMJ, Callewaert L, Wuytack EY, Masschalck B, Michels CW. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *Intern J Food Microb* 101(3): 281-291.
- Diels AMJ, Callewaert L, Wuytack EY, Masschalck B, Michels CW. 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenisation only through fluid viscosity. *Biotech Prog* 20(5): 1512-1517.

- Diels AMJ, Wuytack EY, Michels CW. 2003. Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. Intern J Food Microb 87(1): 55-62.
- Floury J, Bellestre J, Legrand J, Desrumaux A. 2004a. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part A. study of the flow pattern. Chem Engineering Sci 59(4): 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 re-coalescence phenomena. Chem Engineering Sci 59(5): 1285-1294.
- Gervilla R, Ferragut V, Guamis B. 2000. High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. J Dairy Sci 83(4): 674-682.
- Gervilla R, Felipe X, Ferragut V, Guamis B. 1997. Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas Fluorescens* strains in ovine milk. J Dairy Sci 80(6): 2297-2303.
- Guerzoni ME, Vannini L, Chaves López C, Lanciotti R, Suzzi G, Gianotti A. 1999. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat chesses. J Dairy Sci 82(5): 851-862.
- Hayes MG, Kelly AL. 2003a. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. J Dairy Res 70(3): 297-305.
- Hayes MG, Kelly AL. 2003b. High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. J Dairy Res 70(3): 307-313.
- Hayes MG, Fox PF, Kelly AL. 2005. Potential application high pressure homogenisation in liquid milk. J Dairy Res 72(1): 25-33.
- Johnson JL, Rose BE, Sharar AK, Ramsom GM, Lattuada CP, Mcnamara AM. 1995. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with food-borne disease outbreak. J Food Prot 58(6): 597-603.
- Kheadr EE, Vachon JF, Paquin P, Fliss I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. Intern Dairy J 12(5): 435-446.
- Lanciotti R, Gardini F, Sinigaglia M, Guerzoni ME. 1996. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. Letter Applied Microb 22(3): 165-168.
- Lanciotti R, Gardini F, Sinigaglia M, Guerzoni ME. 1994. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic microorganism. Letters in Applied Microb 18(6): 319-322.
- Lopez-Alonso R, Antolín-Giraldo G. 2004. Envasado y conservación de alimentos. Últimas tendencias. Alimentación Equipos y Tecnología 187(2): 45-52.
- López-Pedemonte T, Bríñez WJ, Roig-Sagués AX, Guamis B. 2006. Fate of *Staphylococcus aureus* in cheese treated by ultrahigh pressure homogenization and high hydrostatic pressure. J Dairy Sci 89: 4536-4544.
- Lucore LA, Shellhammer TH, Yousef AE. 2000. Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. J Food Protect 63(5): 662-664.
- McDonald CJ, Lloyd SW, Vitale MA, Petersson K, Innings E. 2000. Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. J Food Sci 65(6): 984-989.

- Orden JA, Cid D, Ruiz-Santa-Quiteria JA, García S, Martínez S, De la Fuente R. 2002. Verotoxin – producing *Escherichia coli* (VTEC) enteropatogenic *E. coli* (EPEC) and necrotogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *J Applied Microb* 93(1): 29-35.
- Paquin P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Intern Dairy J* 9(3-6): 329-335.
- Popper L, Knorr D. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Techn* 44(7): 84-89.
- Sado PN, Jinneman KC, Busby GJ, Sorg SM, Omiecinski CJ. 1998. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurised apple juice using rapid test kits. *J Food Protec* 61(9): 1199-1202.
- Sparling PH. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks in the United States, 1982-1996. *JAVMA* 213(12): 1733.
- Splittstoesser DF, McLellan MR, Churey JJ. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J Food Protec* 59(3): 226-229.
- Thiebaud M, Dumay E, Picart L, Guiraud JP, Cheftel JC. 2003. High-pressure of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Intern Dairy J* 13(6): 427-439.
- Vachon JF, Kheadr EE, Giasson J, Paquin P, Fliss I. 2002. Inactivation of foodborne in milk using dynamic high pressure. *J Food Protec* 65(2): 345-352.
- Vannini L, Lanciotti R, Baldi D, Guerzoni ME. 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *Intern J Food Microb* 94(2): 123-136.
- Wang G, Zhao T, Doyle MP. 1997. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk. *J Food Protec* 60(6): 610-613.
- Wuytack EY, Diels AMJ, Michels CW. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. *Intern J Food Microb* 77(3): 205-212.
- Wuytack EY, Phuong LDT, Aertsen A, Reyns KMF, Marquenie D, De Ketelaere B, Masschalck B, Van Opstal I, Diels AMJ, Michels CW. 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatments. *J Food Protec* 66(1): 31-37.