

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Efecto de Campos Eléctricos Pulsantes en la vida anaquel de leche
descremada basado en parámetros de calidad higiénica**

Estudiantes

Mariana Beatriz Paredes Rivera

Elisa María Tobar Sandoval

Asesores

Mayra Márquez González, Ph.D.

Luis Fernando Maldonado, Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Anexos.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	12
Localización del Estudio	12
Procesamiento de la Materia Prima, Recolección de Insumos y Definición de Cantidades.....	12
Recibimiento de Materia Prima y Descremado	12
Aplicación de Campos Eléctricos Pulsantes	13
Recolección y Separación de Insumos	14
<i>Análisis Microbiológicos</i>	15
Comparación de la sobrevivencia de microorganismos en la leche descremada entre tratamiento térmico y no térmico.....	15
<i>Análisis Físicoquímicos</i>	15
Medición de la Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL).....	15
Determinación del Tratamiento que Alarga en Mayor Medida la Vida de Anaquel de la Leche Descremada	16
Diseño Experimental.....	18
Análisis Estadístico	19
Resultados y Discusión.....	20
Determinación del Tratamiento que Alarga en Mayor Medida la Vida de Anaquel	20
Monitoreo de Crecimiento de Microorganismos Indicadores Durante Almacenamiento	20
Bacterias Mesófilas Aerobias.....	21

	4
Psicrótrofos	22
Coliformes Totales	24
Enterobacterias.....	26
Escherichia coli.....	27
Efecto de Temperatura Sobre Variables Físicoquímicas.....	28
Comportamiento en el Día Cero de Variables Físicoquímicas Tras la Aplicación de Tratamientos.....	28
Análisis de Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL).....	29
Análisis de Degradación de Proteínas(%)	31
Conclusiones	33
Recomendaciones.....	34
Referencias.....	35
Anexos.....	39

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Descripción de insumos, tiempos y temperaturas de incubación de cada análisis microbiológico.	15
Cuadro 2 Delimitación de valores aceptables de acidez y criterios microbiológicos para determinación de la vida anaquel de la leche pasteurizada.	17
Cuadro 3 Delimitación de valores aceptables microbiológicos para determinar la vida anaquel de la leche cruda.....	17
Cuadro 4 Planteamiento de arreglo factorial 4 × 2.....	18
Cuadro 5 Días de vida de anaquel de leche según tratamiento y temperatura de almacenamiento..	20
Cuadro 6 Conteos iniciales de microorganismos indicadores en leche cruda expresados en Log (UFC/mL) ± D.E. y sus reducciones tras distintos tratamientos aplicados.....	21
Cuadro 7 Recuentos de Bacterias Mesófilas Aerobias en leche durante 15 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.	22
Cuadro 8 Recuentos de Bacterias Psicrótrofas en leche durante 18 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.	24
Cuadro 9 Recuentos de Coliformes Totales en leche durante 12 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.	25
Cuadro 10 Recuentos de Enterobacterias en leche durante 7 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.....	27
Cuadro 11 Recuentos de Escherichia coli en leche durante 7 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.....	28
Cuadro 12 Resultados de ATECAL y degradación de proteínas del día cero, expresado en porcentaje ± D.E.	29

Índice de Figuras

Figura 1 Flujo de proceso de pasteurización en la Planta de Lácteos de Zamorano.	13
Figura 2 Flujo de proceso de aplicación de campos eléctricos a leche cruda.	14
Figura 3 Curva de aumento de acidez durante 18 días de almacenamiento a dos temperaturas distintas de almacenamiento.....	31
Figura 4 Curva de degradación de proteínas durante 18 días de almacenamiento a dos temperaturas distintas de refrigeración.	32

Índice de Anexos

Anexo A Vida de anaquel (VA) expresado en días, basado en variables microbiológicas y fisicoquímicas.	39
Anexo B Probabilidades del análisis de varianza por cada variable dependiente evaluada en la presente investigación.	40
Anexo C Media \pm D.E. de ATECAL expresado en porcentaje (%) para cada tratamiento durante 18 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.....	41
Anexo D Análisis de correlación de conteos microbiológicos y porcentaje de degradación de proteínas comparados con ATECAL en tratamientos almacenados a 4 °C.	42
Anexo E Análisis de correlación de conteos microbiológicos y porcentaje de degradación de proteínas comparados con ATECAL en tratamientos almacenados a 7 °C.	43

Resumen

El estudio se basó en la aplicación de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP) en leche fluida, con el fin de determinar la Vida de Anaquel (VA) en LLeche Cruda (LC), Leche Pasteurizada (LP), Leche con CEP (LCep) y Leche con Pasteurización y CEP (LPCep). Se evaluó el efecto de los tratamientos y dos temperaturas de almacenamiento (4 y 7 °C) en las variables microbiológicas (Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Psicrótrofos (PSI), Enterobacterias (ENT), Coliformes Totales (CT) y *E. coli*), y sobre variables fisicoquímicas (ATECAL y degradación de proteínas). Los muestreos se ejecutaron a los 0, 7, 9, 12, 15 y 18 días. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar, con tres repeticiones. Se analizaron los datos mediante un ANDEVA, una interacción entre tratamiento × temperatura con 95% de significancia y un análisis de correlación. Se determinó que la LP y LPCep extendieron la VA a 11 y 10 días, respectivamente. En cuanto a acidez, la LPCep obtuvo al día 15 una acidez de 0.17 y 0.24% a 4 y 7 °C. La degradación de proteínas con el mismo tratamiento registró al día 12 una degradación de 1.72 y 3.98% a 4 y 7 °C, respectivamente. Se concluyó que los CEP junto a la pasteurización poseen un efecto significativo de inhibición sobre BMA y PSI, mas no en CT, ENT y *E. coli*. La temperatura tiene efecto en la producción de ATECAL y degradación de proteínas. Se recomienda evaluar el efecto de los CEP en para la inactivación de patógenos.

Palabras clave: leche fluida, métodos de conservación, microorganismos deterioradores, tratamiento térmico y no térmico.

Abstract

The study was based on the application of Pulsed Electric Fields (PEF) in fluid milk, in order to determine the Shelf Life (SL) in Raw Milk (RM), Pasteurized Milk (PM), Milk with PEF (MPEF) and Milk with Pasteurization and PEF (MPPEF). The effect of the treatments and two storage temperatures (4 and 7 °C) on microbiological variables (Aerobic Mesophilic Bacteria (AMB), Psychrotrophs (PSY), Enterobacteriaceae (ENT), Total Coliforms (TC) and *E. coli*), and on physicochemical variables (titratable acidity and protein degradation) were evaluated. Sampling was performed at 0, 7, 9, 9, 12, 15 and 18 days. A Randomized Complete Block design was used, with three replicates. Data were analyzed using an ANOVA, a treatment × temperature interaction with 95% significance and a correlation analysis. It was determined that PM and MPPEF extended SL to 11 and 10 days, respectively. As for acidity, MPPEF obtained an acidity of 0.17 and 0.24% at 4 and 7 °C at day 15. Protein degradation with the same treatment recorded at day 12 a degradation of 1.72 and 3.98% at 4 and 7 °C, respectively. It was concluded that PEF together with pasteurization had a significant inhibitory effect on BMA and PSI, but not on CT, ENT and *E. coli*. Temperature influenced titratable acidity production and protein degradation. It is recommended to evaluate the effect of CEP on pathogen inactivation.

Key words: fluid milk, preservation methods, spoilage microorganisms, thermal and non-thermal treatment.

Introducción

La leche es de especial interés porque proporciona los micro y macronutrientes necesarios para una buena nutrición, incluyendo calcio, riboflavina, folato, vitaminas A y B-12, proteínas de alta calidad, ácido linoleico y alfa-linoleico (Miller et al. 2022). A su vez, posee los nueve aminoácidos esenciales (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina). El perfil de las proteínas de la leche se clasifica como proteínas de calidad con el mayor valor biológico, buena digestibilidad (97 a 98%), rápida absorción y utilización en el cuerpo (Rafiq et al. 2016).

En general, casi la mitad de los alimentos frescos del planeta se pierden tras su cosecha o se desperdicia en comercios y hogares (IFCO Systems 2020). Cabe mencionar que, 1.3 mil millones de toneladas de comida son desperdiciadas o desechadas por distintas razones, y referente a los productos lácteos, estos registran pérdidas de hasta un 20% a nivel mundial (FAO 2015). La producción y consumo responsable representado en el Objetivo de Desarrollo Sostenible 12 (ODS) dicta que es importante reducir a la mitad el desperdicio *per cápita* de alimentos en el mundo a nivel de comercio minorista y consumidores para crear cadenas de producción y suministro más eficientes (PNUD 2015). Por lo tanto, la problemática radica en que alimentos altamente perecederos como la leche fluida, son desechados debido su rápido deterioro. Debido a esto, garantizar la inocuidad y calidad durante la vida de anaquel mediante su procesamiento, es un tema de alto calibre.

La Vida Anaquel (VA) se define como el período de tiempo, en condiciones de almacenamiento definidas, en el que un alimento sigue siendo aceptable para el consumo humano en términos de inocuidad, atributos nutricionales y características sensoriales (Corradini 2018). En cuanto a la leche, el principal cambio que sufre es el microbiológico y químico, y la vida anaquel de este líquido se ve limitada por la acidificación de este por parte de la producción de ácido láctico (Fusco et al. 2020).

Esto, conduce a la importancia de la calidad higiénica de la leche y esta se refiere a la cantidad y tipo de bacterias presentes, como consecuencia de su manejo durante el proceso de ordeño, almacenamiento, transporte y procesamiento (Cipolatti y Lazarraga 2016). A su vez, esto puede ser monitoreado mediante los microorganismos indicadores, ya que estos pueden significar la presencia

potencial patógenos, un fallo en las condiciones de higiene exigidas por las de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), o un fallo del proceso. Los microorganismos indicadores más comunes son Bacterias Mesófilas Aerobias, Coliformes Totales, *E.coli* y Enterobacterias (Tortorello 2003b).

El reto de la industria radica en la búsqueda de tecnologías que reduzcan la carga microbiana y así conservar al máximo las características nutricionales y sensoriales de los alimentos (Martinez Giron et al. 2021). En los últimos años, han surgido diferentes tecnologías que no requieren tratamientos térmicos como: la alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados, radiación ionizante, ultrasonido, microondas, entre otras. Este tipo de tratamientos no térmicos son capaces de inactivar microorganismos a temperatura ambiente asegurando la inocuidad y calidad de los productos a tratar (Sabbir Masim et al. 2021).

Los Campos Eléctricos Pulsados (CEP), son considerados un tratamiento no térmico debido al ligero incremento de temperatura que tiene el producto expuesto al mismo y puede utilizarse como alternativa o en complemento con procesos térmicos convencionales como pasteurización para inactivar los microorganismos y enzimas en alimentos líquidos como la leche (Bhat et al. 2020). Esta tecnología de CEP consiste en un tratamiento eléctrico con pulsos de campos eléctricos de alto voltaje durante un corto tiempo (Alirezalu et al. 2020).

En la última década, se han realizado diversos estudios sobre la aplicación de CEP en alimentos líquidos, teniendo un efecto sobre la membrana plasmática permitiendo la conservación de los alimentos. Otro estudio realizado en el 2015, afirma que al utilizar un tratamiento de CEP en leche descremada inactiva *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus brevis* con pulsaciones de 10 kV/cm con un pulso de energías totales de 50-250 kJ/L (Lee GJoon et al. 2015).

Con base a lo anterior, el uso de tecnologías emergentes puede ayudar a reducir el recuento microbiano en alimentos (Bhat et al. 2020). Los propósitos de este estudio fueron: (i) determinar el tratamiento que alarga en mayor medida la vida de anaquel de la leche descremada; (ii) monitorear el crecimiento de microorganismos indicadores en la leche descremada entre tratamiento térmico y no térmico; y (iii) comparar dos temperaturas de almacenamiento en variables fisicoquímicas.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

El estudio se realizó en el laboratorio y zona de procesamiento de la Planta de Lácteos, el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ) y el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ). Todas las locaciones se encuentran ubicadas en el Departamento de Agroindustria Alimentaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Procesamiento de la Materia Prima, Recolección de Insumos y Definición de Cantidades

Recibimiento de Materia Prima y Descremado

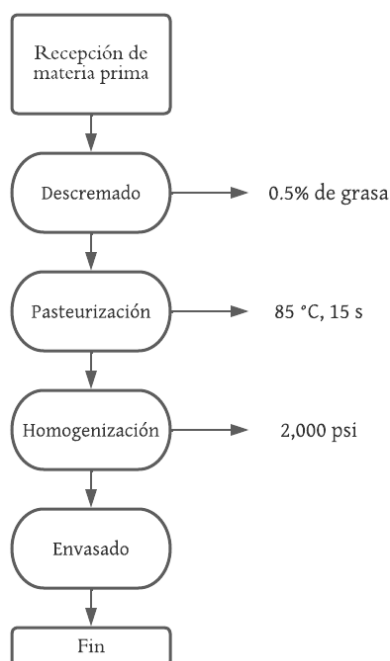
En la sección de recibo de leche dentro de la Planta de Lácteos de Zamorano, se recibió la materia prima cruda a 4 °C proveída por la Unidad de Ganado Lechero de la misma localidad. Esta pasó por una descremadora y mediante la desviación de una tubería, se recolectaron 2.8 L de Leche Cruda descremada (LC) al 0.5%. Como paso seguido, se envasó en un bote con capacidad de 3.78 L y se refrigeró en el Laboratorio de la Planta de Lácteos.

Pasteurización

La leche se sometió a un tratamiento térmico convencional HTST (*high temperature, short time*) de 85 °C durante 15 segundos. Esta siguió su procesamiento tal y como se describe en la Figura 1 con el fin de recolectar 2.8 L de Leche Pasteurizada descremada (LP) al 0.5% de grasa. Posteriormente se envasó en un bote con capacidad de 3.78 L y almacenó a 4 °C en el laboratorio de la Planta de Lácteos de Zamorano.

Figura 1

Flujo de proceso de pasteurización en la Planta de Lácteos de Zamorano.



Aplicación de Campos Eléctricos Pulsantes

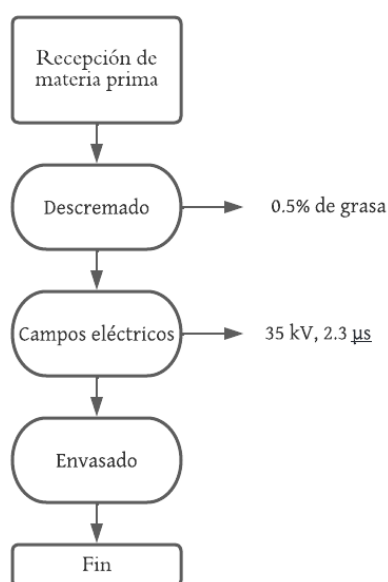
Se utilizó el equipo generador de campos eléctricos pulsantes creado por el Instituto Técnico de Honduras a petición de Casas y Villacrés (2015). La leche fluida se introdujo en una cámara cilíndrica compuesta por un cátodo y un ánodo, en donde el cátodo es un cilindro de acero inoxidable de grado alimenticio, y posee una altura 34 cm y un diámetro externo de 3.8 cm. Este cátodo se inserta dentro del ánodo, el cual corresponde a un cilindro de acero inoxidable de igual altura que se ensambla con el cátodo y tiene un diámetro externo de 5.71 cm. La leche es colocada entre la separación de ambos cilindros, conformando así la cámara del equipo, la cual en las orillas está aislada con teflón para evitar que el potencial eléctrico salga de la cámara. Por las extremidades de cada cilindro sale un cable conductor que se conecta al sistema de creación del choque eléctrico. Toda la cámara se encuentra montada sobre un pedestal para su conveniencia de manejo. El equipo se conecta a la red doméstica con 110-120 V de Corriente Alterna (CA). El transformador tipo Flyback del equipo es el responsable de multiplicar la tensión de entrada para alcanzar el campo eléctrico requerido. En general, el generador de campos trabaja bajo ondas cuadradas monopolares positivas.

Como primer punto, se tomó la mitad de la leche previamente pasteurizada y almacenada, la cual correspondió a 1.4 L. Se aplicaron 35 kV cm^{-1} , con un ancho de pulsos de $2.3 \mu\text{s}$ y una frecuencia de 50 Hz en cuatro ciclos distintos de 330 mL cada uno para obtener un total de 1.32 L de Leche Pasteurizada con Campos Eléctricos Pulsante (LPCep). Cabe resaltar que la capacidad de la cámara de tratamiento de CEP es de 0.45 L y entre cada ciclo de aplicación de campos, se lavó el equipo con agua estéril, alcohol y detergente alcalino. Los 80 mL sobrantes se contemplaron como excedentes y se desecharon al final del proceso.

Por otra parte, se procedió a la aplicación del CEP a la mitad de la leche cruda que se almacenó con anterioridad para obtener la leche con campos eléctricos (LCep) y se realizó exactamente el mismo proceso que se le aplicó a la LPCep (Figura 2). Los tratamientos se realizaron con leche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y fueron ubicados en dos envases rotulados con capacidad de 1.8 L, uno para cada tratamiento con CEP, y trasladados al Laboratorio de Microbiología de Zamorano junto con la LC y LP.

Figura 2

Flujo de proceso de aplicación de campos eléctricos a leche cruda.



Recolección y Separación de Insumos

Cada uno de los cuatro tratamientos contó con 12 frascos plásticos estériles con capacidad de 110 mL de muestra cada uno, siendo seis de ellos destinados a un almacenamiento de $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y los otros

seis, a 7 °C. Estos frascos fueron equivalentes a los seis días de muestreo para cada temperatura, a excepción del día 0, que se contemplaron 4 frascos generando un total de 44 unidades rotuladas.

Análisis Microbiológicos

Comparación de la sobrevivencia de microorganismos en la leche descremada entre tratamiento térmico y no térmico.

Se realizó análisis microbiológicos de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Coliformes Totales (CT), *E. coli*, Enterobacterias (ENT) y Bacterias Psicrótrofas (PSI), tal como se muestran en el Cuadro 1, por medio de la técnica de vaciado en placa, expresando los resultados en Log (UFC/mL). Para realizar dichos análisis, se tomó 1 mL de la muestra para disolverlo en 9 mL de buffer de fosfato, siendo esta la primera dilución (1/10), se realizaron diluciones desde 1/10 hasta 1/10,000,000, dependiendo del tratamiento y la temperatura a evaluar. Esto fue con objetivo monitorear el crecimiento de la microflora y definir el tratamiento aplicado y temperatura de almacenamiento que inhiben en mayor medida la carga microbiana a través del tiempo.

Cuadro 1

Descripción de insumos, tiempos y temperaturas de incubación de cada análisis microbiológico.

Microorganismo	Medio de Cultivo	Incubación
Bacterias Mesófilas Aerobias	Agar Cuenta Estándar	35 ± 1 °C durante 48 horas
Coliformes Totales	ABRV	
<i>Escherichia coli</i>	ABRV + ABRV-MUG	35 ± 1 °C durante 24 horas
Enterobacterias	ABRV Glucosa	
Bacterias psicrótrofas	Agar Cuenta Estándar	7 °C durante 10 días

Nota. ABRV: Agar Bilis Rojo Violeta; MUG: 4-metilumbeliferilβ-D-glucuronido.

Análisis Fisicoquímicos

Medición de la Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL).

Para este análisis se extrajeron 9 mL de leche de cada frasco de los cuatro tratamientos a dos temperaturas con ayuda de una pipeta graduada y un bulbo de succión. Estos fueron depositados dentro de un vaso de precipitado, se añadieron 3 gotas de solución de fenolftaleína (preparada al 2% en etanol al 96%) y se mezcló para su homogenización.

La mezcla se tituló con hidróxido de sodio (NaOH 0.1 N) estandarizado contenido en una bureta y mediante agitación del vaso de precipitado, se añadieron gotas de NaOH y la valoración se estableció al aparecer el primer cambio de color (a rosa) y persistió durante 30 segundos. Posteriormente, se procedió a la lectura del volumen utilizado en la bureta y se anotó.

Para el cálculo de ácido láctico se empleó la Ecuación 1, para expresar el resultado en porcentaje (%) ATECAL. Este análisis se rigió bajo el método IRAM 14005 (Fabro et al. 2006).

$$\% \text{ Ácido Láctico} = 0.9 \times \text{mL NaOH 0.1N} / \text{gramos de muestra} \quad [1]$$

Medición Degradación de Proteínas por Medio de Centrifugación.

Algunos componentes de la leche, como las proteínas y las membranas de los glóbulos de grasa de la leche (MFGM) son susceptibles a cambios después de tratamientos térmicos, cabe recalcar, pocos estudios han demostrado desnaturalización de las proteínas al usar CEP para leche fluida (Sharma, Oey y Everett 2014).

Para medir la degradación, se hizo por medio de una Centrifugadora VWR® symphony™ 4417/R utilizando un rotor de 5/7 por 50 mL, con una capacidad de 6 tubos. Se realizó un llenado de 45 mL de los diferentes tratamientos en los 4 tubos y en los dos restantes, se llenó con agua para mantener el equilibrio del equipo. Se procedió a programar la centrifugadora con 3,219.84 Fuerza *g* (RCF) a 4 °C por 10 minutos. Dicho proceso se realizó por duplicado para ambas temperaturas de almacenamiento, para así obtener un promedio de los resultados. Para expresar dicho valor en porcentaje, se realizó la respectiva diferencia de las repeticiones en cada uno de los tratamientos para cada día de muestreo, luego se dividió entre el peso de la muestra, el cual se obtuvo multiplicando 45 mL por la densidad de la leche (1.036 g/mL) y se multiplicó por 100 cada valor.

Determinación del Tratamiento que Alargue en Mayor Medida la Vida de Anaquel de la Leche Descremada

En los días establecidos para muestreos de las variables de interés (0, 7, 9, 12, 15 y 18 días), los resultados de recuentos microbianos se compararon a través del tiempo con los límites

microbiológicos máximos aceptables de la Norma MINSA (2008) y demás literaturas, respectivamente para la leche descremada pasteurizada (Cuadro 2) y la leche descremada cruda (Cuadro 3). Esto se realizó con el fin de determinar el tratamiento que mantuvo el crecimiento de microorganismos deterioradores por debajo del margen permisible durante más tiempo. El mismo mecanismo se implementó para el monitoreo de porcentaje ATECAL. Al momento de ser alcanzados los límites máximos para cada variable, se establecía el fin de la vida de anaquel. Cabe resaltar que los recuentos de mesófilos aerobios y coliformes totales son los únicos deterioradores contemplados en la norma oficial del MINSA, por lo tanto, estos fueron los principales delimitadores para definir la vida de anaquel en parámetros microbiológicos.

Cuadro 2

Delimitación de valores aceptables de acidez y criterios microbiológicos para determinación de la vida anaquel de la leche pasteurizada.

Variable de interés	Valor aceptable*
% ATECAL	0.14 - 0.18
Bacterias Mesófilas Aerobias	Máximo 5×10^4 UFC/mL
Coliformes Totales	Máximo 10 UFC/mL
<i>E. coli</i>	< 10 UFC/mL
Enterobacterias	Máximo 10 UFC/mL
Bacterias psicrótrofas	< 10^6 UFC/mL

Nota. *Los valores son en referencia a el Acuerdo RTCA (2009) de criterios microbiológicos, al Reglamento (UE) N° 365/2010 (Comisión Europea 2010), a (Novoa y Restrepo 2007), MINSA (2008), y en base a SAG (2001), acuerdo No. 656-01, Food and Drug Administration (2019). ATECAL: acidez titulable.

Cuadro 3

Delimitación de valores aceptables microbiológicos para determinar la vida anaquel de la leche cruda.

Variable de interés	Valor aceptable*
% ATECAL	0.14 - 0.18
Bacterias Mesófilas Aerobias	Máximo 10^6 UFC/mL
Coliformes Totales	< 10^2 UFC/mL
<i>E. coli</i>	< 3×10^4 UFC/mL
Enterobacterias	Máximo 10^2 UFC/mL
Bacterias psicrótrofas	$\leq 10^6$ UFC/mL

Nota. *Los valores son en referencia a MINSA (2008), SAG (2001), acuerdo No. 656-01, Food and Drug Administration (2019), a (Novoa y Restrepo 2007), (National Standard of Iran 2002), y en base a (Adil et al. 2011), 2011. ATECAL: Acidez Titulable.

Según los resultados, se comparó con los parámetros establecidos para cada tratamiento aplicado y se determinó de esa manera el tratamiento que preservó los límites aceptables microbiológicamente por mayor tiempo.

Diseño Experimental

El diseño experimental usado fue un Bloques Completos al Azar (BCA) con un arreglo factorial (4 × 2) tal como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4

Planteamiento de arreglo factorial 4 × 2.

Factores	Tratamiento aplicado a la leche	Temperatura de almacenamiento (°C)
Niveles	Leche Cruda (LC)	4
	Leche Pasteurizada (LP)	
	Leche Cruda con Campos Eléctricos Pulsantes (LCep)	7
	Leche Pasteurizada con Campos Eléctricos Pulsantes (LPCep)	

Como resultado del arreglo factorial, se establecieron ocho tratamientos que corresponden a 4 procesamientos distintos para las leches descremadas y dos temperaturas distintas de almacenamiento. A su vez, los bloques del experimento fueron representados mediante tres repeticiones con toma de datos en seis Medidas Repetidas en el Tiempo (MRT) en cada repetición, siendo los días de muestreo a los 0, 7, 9, 12, 15 y 18 días, generando un total de 144 unidades experimentales, en base a la Ecuación 2.

$$4 \text{ TRT} \times 2 \text{ TEMP} \times 3 \text{ REP} \times 6 \text{ MRT} = 144 \text{ UE [2]}$$

Las variables independientes contempladas en el estudio fueron representadas por los cuatro tratamientos con inclusión de las dos temperaturas. Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la variable dependiente de vida útil y se determinó mediante el monitoreo a través del tiempo del crecimiento de bacterias mesófilas aerobias, bacterias psicrótrofas, enterobacterias, coliformes totales, *E. coli*, acidez titulable y degradación de proteínas mediante centrifugación. Cada parámetro se rigió bajo sus límites aceptables y máximos (Cuadros 2 y 3).

Análisis Estadístico

El efecto de los tratamientos se analizó estadísticamente en el software *Statistical Analysis System* (SAS®), basado en un nivel de significancia ≤ 0.05 . El análisis de varianza se realizó con el fin de obtener las medias del efecto de los tratamientos y la temperatura en la vida útil de la leche. Se realizó un cálculo de medias ajustadas usando el procedimiento de cuadrados mínimos (LSMEANS) para evaluar la interacción entre el tratamiento y temperatura (TRT×TEMP). Correlaciones entre los tratamientos y las poblaciones de microorganismos, acidez titulable y degradación de proteínas se evaluaron con la prueba de Pearson. Esto regido bajo el modelo lineal de la Ecuación 3.

$$\text{Vida útil} = \mu + \text{TRT} + \text{BLK} + \text{TEMP} + \text{TRT} \times \text{TEMP} + \varepsilon \quad [3]$$

Resultados y Discusión

Determinación del Tratamiento que Alarga en Mayor Medida la Vida de Anaquel

Tanto la temperatura de almacenamiento como los tratamientos realizados obtuvieron un efecto sobre los días de vida útil ($P = 0.0224$), siendo el primero de ellos el más influyente ($P = 0.0027$) que el procesamiento de la materia prima ($P = 0.0224$). Los tratamientos LP y LPCep, fueron los que alargaron en mayor medida la vida de anaquel con 11 y 10 días, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5

Días de vida de anaquel de leche según tratamiento y temperatura de almacenamiento.

Tratamiento	Días de vida de anaquel [€]	
	4 °C	7 °C
Leche pasteurizada	11 ± 9.64 ^{a x}	< 7 ^y
Leche pasteurizada con campos eléctricos	10 ± 4.16 ^{a x}	< 7 ^y
Leche con campos eléctricos	< 7 ^x	< 7 ^x
Leche cruda	0 ± 0.00 ^{b x}	0 ± 0.00 ^{a x}
C.V (%)	135.05	

Nota. [€] Vida de anaquel basada en el cumplimiento de MINSa (2008) C.V.: Coeficiente de Variación ^{a-b} letras diferentes en la misma columna

indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). ^{x-y} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre temperaturas ($P < 0.05$); <7: al día 7 sobrepasaron el límite máximo.

Monitoreo de Crecimiento de Microorganismos Indicadores Durante Almacenamiento

De forma general, todos los microorganismos se vieron afectados significativamente por el efecto de los tratamientos ($P < 0.05$), destacando a la leche pasteurizada con campos eléctricos como el tratamiento que redujo en mayor medida la microflora de la leche cruda seguido por la leche pasteurizada (Cuadro 6). Además, los coliformes totales presentaron el mayor porcentaje de reducción al día cero mediante la aplicación de LPCep, siendo esta >3.91 log y representada por un decrecimiento de un 99.99%. Sucesivo a esto, los psicrótrofos mostraron una reducción del 99.9%. Resultados similares se denotan tras la aplicación de pasteurización.

Cuadro 6

Conteos iniciales de microorganismos indicadores en leche cruda expresados en Log (UFC/mL) ± D.E. y sus reducciones tras distintos tratamientos aplicados.

Variable	LC	LCEP	LP	LPCEP	Pr>F
Mesófilos aerobios	7.06 ± 0.73 ^a	4.62 ± 1.77 ^b	2.32 ± 0.18 ^c	2.45 ± 0.15 ^c	0.0014
Enterobacterias	5.10 ± 1.22 ^a	4.64 ± 2.47 ^a	1.13 ± 0.49 ^b	1.42 ± 0.98 ^b	0.0376
Coliformes Totales	4.91 ± 1.11 ^a	4.42 ± 2.45 ^a	1.13 ± 0.49 ^b	<1 ^b	0.0264
<i>E. coli</i>	<2 ^a	<2 ^a	<1 ^b	<1 ^b	<.0001
Psicrótrofos	4.67 ± 0.95 ^a	3.21 ± 1.81 ^a	<1 ^b	<1 ^b	0.004

Nota. D.E.: Desviación Estándar; LC: Leche cruda; LCEP: Leche con Campos Eléctricos Pulsantes; LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada con campos eléctricos pulsantes; ^{a-c} letras diferentes en la misma fila? O columna? indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); Pr>F: valor de la probabilidad (P < 0.05).

Bacterias Mesófilas Aerobias

La carga inicial de mesófilos aerobios en la leche cruda fue de 7.06 ± 0.73 Log UFC/mL. Se registraron reducciones significativas de 2.44 log UFC/mL posterior al tratamiento de CEP de 35 kV durante 2.3 μ s, no obstante, reducciones aún más significativas fueron evidenciadas con 4.6 y 4.74 ciclos logarítmicos luego de los tratamientos de pasteurización en conjunto a campos eléctricos y pasteurización por sí sola, respectivamente (Cuadro 7). Esto, presenta semejanza con el estudio de Fernández-Molina et al. (2005), en el cual se reportó una reducción de 4.2 log en condiciones similares en cuanto a la combinación entre campos eléctricos y un tratamiento HTST. A su vez, Murphy et al. (2016), indicaron que recuentos de BMA bastante altos (>1,000,000 UFC/mL) en la leche cruda, pueden condicionar su estado y causar defectos posteriores a su procesamiento. En suma, la carga inicial previa a su procesamiento pudo verse compuesta por mesófilos Gram positivos como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Lactobacillus spp.* produciendo acidificación por fermentación de lactosa y Gram negativas como *Acinetobacter* (Kornacki 2010). Dentro de este contexto y con un enfoque en almacenamiento a 4 °C y luego de su procesamiento, estos no fueron inactivados en su totalidad debido al alto recuento inicial. Siendo la LPCEP, el tratamiento que controló en mayor medida la proliferación posterior de estos microorganismos finalizando su vida útil el día 15 con 4.29 log, seguido de la LP con 4.69 log para el día 12 (Anexo A). Esto regido bajo la norma del MINSA (2008) que dicta que el límite máximo aceptable es de 4.7 log/mL. Bajo estas condiciones, los *Streptococcus*,

Corynebacterium y *Bacillus* spp. pueden sobrevivir al proceso térmico (Kornacki 2010). Este comportamiento puede ser explicado con que la pasteurización está diseñada para proporcionar una reducción de 5 logs (Özer y Yaman 2014), no obstante, al obtener una carga inicial superior a esta, la pasteurización no logra eliminar en su totalidad la población de mesófilos, requiriendo así, un segundo tratamiento para causar un mayor impacto a lo largo de los días de almacenamiento. Este segundo método de inactivación aplicado, está basado en los conceptos de agotamiento metabólico, y a medida que los microorganismos se enfocan en mecanismos de reparación, para recuperarse de su entorno hostil tras la electroporación, gastan energía y mueren (Rodríguez González 2010), siendo esto un refuerzo sobre la inactivación de la población sobreviviente al tratamiento térmico. Estos resultados se vieron mayormente afectados por la interacción entre la temperatura con distintos tratamientos ($P < 0.0001$).

Cuadro 7

Recuentos de Bacterias Mesófilas Aerobias en leche durante 15 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.

T °C	TRT	Log UFC/mL ± DE				
		Tiempo (días)				
		0	7	9	12	15
7	LC	7.06 ± 0.73 ^{ay}	8.35 ± 0.28 ^{axy}	8.17 ± 0.85 ^{axy}	8.59 ± 0.45 ^{ax}	9.02 ± 0.71 ^{ax}
	LCep	4.62 ± 1.77 ^{bz}	7.09 ± 0.66 ^{ay}	8.09 ± 0.61 ^{axy}	8.19 ± 0.33 ^{axy}	7.72 ± 0.76 ^{abxy}
	LP	2.32 ± 0.18 ^{cz}	5.43 ± 1.11 ^{by}	6.25 ± 0.67 ^{bcy}	8.34 ± 0.66 ^{ax}	8.40 ± 0.26 ^{abx}
	LPCep	2.46 ± 0.15 ^{cz}	5.30 ± 0.94 ^{by}	5.23 ± 1.60 ^{cy}	7.54 ± 0.13 ^{ax}	7.94 ± 0.28 ^{abx}
4	LC		7.46 ± 1.16 ^{axy}	7.26 ± 0.84 ^{aby}	7.89 ± 0.56 ^{axy}	8.58 ± 1.15 ^{abx}
	LCep		7.81 ± 0.46 ^{axy}	6.89 ± 1.38 ^{aby}	7.84 ± 0.40 ^{axy}	7.62 ± 0.56 ^{bxy}
	LP		2.34 ± 0.41 ^{cz}	3.20 ± 0.54 ^{dz}	4.69 ± 0.57 ^{by}	4.78 ± 0.68 ^{cy}
	LPCep		2.83 ± 0.52 ^{cz}	3.31 ± 0.17 ^{dyz}	3.50 ± 0.14 ^{byz}	4.29 ± 0.39 ^{cy}
C.V. (%)		51.77	38.82	33.68	26.10	24.38

Nota. TRT: Tratamiento; T °C: Temperatura de almacenamiento en °C; C.V.: Coeficiente de Variación; D.E.: Desviación Estándar; LC: Leche cruda; LCep: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCep: Leche pasteurizada y campos eléctricos; ^{a-d}letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$); ^{*z}letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre días ($P < 0.05$).

Psicrótrofos

El recuento de psicrótrofos en la leche cruda partió en el muestreo del día cero con 4.67 ± 0.95 Log UFC/mL. Se observó una reducción significativa posterior a la aplicación del tratamiento con CEP de 1.46 log UFC/mL e incluso, un decrecimiento más significativo con recuentos < 1 Log UFC/mL

después del tratamiento de pasteurización, al igual que con la unión del tratamiento HTST y los 35 kV durante 2.3 μ s (Cuadro 8). Datta y Tomasula (2015) y Rodríguez-González et al. (2011), indicaron una reducción de 3.6 y >3.9 log respectivamente de psicrótrofos en condiciones similares.

Del mismo modo, niveles superiores a 5.11 log, son categorizados como suficientemente altos para causar defectos de calidad en la leche cruda (Yuan et al. 2019), siendo la microflora de la leche cruda de este estudio un resultado cercano a ese límite, disminuyendo su calidad higiénica posterior a su recolección. La causa de esta elevada carga inicial pudo ser producto de una contaminación durante manipulación o transporte (Yuan et al. 2019).

En relación con la vida de anaquel, el valor aceptable es de $<10^6$ UFC/mL establecido por K.L. Kohlmann et al. (1991), y nuevamente el tratamiento LPCep almacenado a 4 °C fue el que controló en mayor medida la curva de crecimiento de este parámetro manteniéndose viable aún para el día 18, seguido de la LP a la misma temperatura con 12 días. En caso particular, la interacción TRT \times TEMP fueron los factores que condicionaron estos comportamientos con un valor $P < 0.0001$.

Los resultados de <1 log en LP y LPCep al día cero no descartan la posibilidad de que microorganismos psicrótrofos hayan sobrevivido al proceso térmico y de campos eléctricos, haciéndose presentes en los días posteriores. Estas tendencias de crecimiento pueden ser explicadas con que las esporas producidas por psicrótrofos como *Bacillus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus circulans* les confieren la característica de sobrevivir a procesos térmicos (Techer et al. 2014). Otra causa más frecuente es la contaminación posterior al procesamiento que da paso a la proliferación de bacilos gram negativos, como *Pseudomonas* spp, (Martin et al. 2018) tal como se evidenció en este estudio con la replicación de psicrótrofos después del día cero. Estos microorganismos en la etapa del deterioro, pueden llegar a producir sabores afrutados-fermentados y amargos (Kornacki 2010).

Cuadro 8

Recuentos de Bacterias Psicrótrofas en leche durante 18 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.

T °C	TRT	Log UFC/mL ± DE					
		Tiempo (días)					
		0	7	9	12	15	18
7	LC	4.67 ± 0.95 ^{ay}	8.37 ± 0.46 ^{ax}	7.87 ± 0.15 ^{ax}	8.79 ± 0.14 ^{ax}	8.54 ± 0.55 ^{ax}	8.60 ± 0.79 ^{abx}
	LCep	3.21 ± 1.18 ^{by}	7.67 ± 0.60 ^{ax}	8.07 ± 0.57 ^{ax}	8.26 ± 0.44 ^{ax}	8.33 ± 0.49 ^{ax}	8.47 ± 0.56 ^{abx}
	LP	<1 ^{cy}	8.15 ± 0.22 ^{ax}	8.04 ± 0.31 ^{ax}	8.48 ± 0.80 ^{ax}	8.67 ± 0.73 ^{ax}	9.04 ± 0.40 ^{ax}
	LPCep	<1 ^{cz}	8.07 ± 0.07 ^{ax}	7.92 ± 0.31 ^{ax}	7.88 ± 0.30 ^{ax}	6.63 ± 1.41 ^{by}	7.68 ± 1.92 ^{bxy}
4	LC		8.24 ± 0.64 ^{ax}	7.93 ± 0.32 ^{ax}	8.67 ± 0.59 ^{ax}	8.82 ± 0.36 ^{ax}	8.28 ± 1.03 ^{abx}
	LCep		8.22 ± 0.52 ^{ax}	7.79 ± 0.75 ^{ax}	8.20 ± 0.50 ^{ax}	8.75 ± 0.47 ^{ax}	8.63 ± 0.23 ^{abx}
	LP		1.13 ± 0.49 ^{cz}	3.66 ± 0.78 ^{by}	5.63 ± 1.67 ^{bx}	7.76 ± 0.20 ^{ab}	7.76 ± 0.60 ^{bw}
	LPCep		3.15 ± 0.08 ^{by}	4.20 ± 0.99 ^{bx}	4.14 ± 0.53 ^c	^w 5.23 ± 0.80 ^c	6.34 ± 1.34 ^{cw}
C.V. (%)		74.34	41.14	33.68	26.62	17.13	13.53

Nota. TRT: Tratamiento; T°C: Temperatura de almacenamiento en °C; C.V.: Coeficiente de Variación; D.E.: desviación estándar; LC: Leche cruda; LCep: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCep: Leche pasteurizada y campos eléctricos; ^{a-c} letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); ^{w-z} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre días (P < 0.05).

Coliformes Totales

Para el día cero, como se observa en el Cuadro 9, se encontró un crecimiento logarítmico inicial para coliformes totales de 4.91 ± 1.11 en la leche cruda. Cabe recalcar que la aplicación CEP obtuvo una reducción de 0.49 log, sin embargo, no generó diferencias significativas comparado a la leche cruda (P = 0.0585). Por otro lado, con la aplicación únicamente de calor, se redujo 3.78 log UFC/mL, seguido de 4.06 log UFC/mL para el tratamiento LPCep, siendo ambos categorizados diferentes estadísticamente en referencia al conteo inicial de la leche (P = 0.0264). La interacción entre el tratamiento y la temperatura no condicionaron el comportamiento de las curvas de crecimiento (P = 0.0637), no obstante, individualmente sí presentaron un efecto significativo (P < 0.0001) (Anexo B). Según los resultados, se infiere que los campos eléctricos no tuvieron un efecto sobre los recuentos iniciales, siendo el tratamiento con calor el que los inhibió en mayor proporción su replicación.

Según Cornell University (2008), los recuentos de coliformes en leche cruda deben ser inferior a 50 UFC/mL (1.69 log), no obstante, es un resultado que difiere de la leche cruda de la Unidad de Ordeño de Zamorano, ya que esta supera los 4.5 log. Estos indicadores, denotan que los productos

lácteos pudieron haber estado expuestos a condiciones insalubres. La mayoría de los géneros bacterianos de coliformes en la leche son *Escherichia*, *Klebsiella* y *Serratia* (Martin et al. 2016).

En cuanto a la VA, el MINSA (2008) establece que para la leche pasteurizada el valor aceptable para CT es de máximo 10 UFC/mL, equivalente a 1 log. Los únicos tratamientos que cumplieron con dicho límite, llegando a una VA de 9 días, fueron la LP y la LPCep a 4 °C, posicionándose este segundo tratamiento por debajo de los 9 días (1.05 log), siendo estadísticamente iguales entre tratamientos. Es importante mencionar que este grupo indicador limitó la vida de anaquel de la leche en términos generales, debido a que fue el microorganismo que superó el límite aceptable con mayor rapidez, en comparación a BMA y PSI. La mayoría de coliformes psicrótrofos en leche se identifican como pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Serratia* y *Raoultella* (Masiello et al. 2016), por lo tanto, se infiere que estos pudieron ser los microorganismos que se replicaron durante el almacenamiento, siendo los 7 °C el determinante para un crecimiento logarítmico más acelerado en comparación con 4 °C.

Cuadro 9

Recuentos de Coliformes Totales en leche durante 12 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.

T °C	TRT	Log UFC/mL ± D. E			
		Tiempo (días)			
		0	7	9	12
7	LC	4.91 ± 1.11 ^{ay}	6.76 ± 0.87 ^{axy}	6.41 ± 1.15 ^{axy}	7.38 ± 0.96 ^{ax}
	LCep	4.42 ± 2.45 ^{ay}	5.88 ± 1.34 ^{abxy}	7.06 ± 0.57 ^{ax}	7.38 ± 0.96 ^{ax}
	LP	1.13 ± 0.49 ^{bz}	1.10 ± 0.43 ^{cz}	2.32 ± 1.32 ^{bcyz}	3.92 ± 2.76 ^{cxy}
	LPCep	<1 ^{bz}	4.24 ± 1.34 ^{bxy}	3.30 ± 2.44 ^{by}	5.04 ± 0.86 ^{bcxy}
4	LC		5.43 ± 1.16 ^{abx}	5.92 ± 1.33 ^{ax}	6.15 ± 1.31 ^{abx}
	LCep		5.91 ± 1.55 ^{abxy}	5.53 ± 1.41 ^{axy}	6.55 ± 1.66 ^{abx}
	LP		1.00 ± 0.26 ^{cx}	1.00 ± 0.26 ^{cx}	1.10 ± 0.43 ^{dx}
	LPCep		0.90 ± 0.09 ^{cx}	1.05 ± 0.23 ^{cx}	1.63 ± 0.70 ^{dx}
C.V. (%)		78.02	65.05	63.29	53.48

Nota. TRT: Tratamiento; T°C: Temperatura de almacenamiento en °C; C.V.: Coeficiente de Variación; D.E.: Desviación Estándar; LC: Leche cruda; LCep: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCep: Leche pasteurizada y campos eléctricos; ^{a-d} letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); ^{*z} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre días (P < 0.05).

Enterobacterias

La microflora de enterobacterias comenzó con una población de 5.1 log UFC/mL en la leche fresca. Posterior a la aplicación de CEP, se reportó una reducción no significativa de 0.46 log ($P = 0.6573$), esto difiere de los resultados obtenidos tras la pasteurización y la pasteurización seguida de los campos eléctricos, ya que sí hubo diferencias significativas de reducción ($P < .0001$) con 3.97 y 3.68 log, UFC/mL respectivamente (Cuadro 10). En términos generales para el día cero, los campos eléctricos no generaron diferencias significativas, pero sí el tratamiento de HTST, ya que influyó fuertemente sobre los mismos ($P < 0.0001$).

La vida útil de la leche descremada se mantuvo viable durante 7 días por debajo del límite máximo aceptable de 10 UFC/mL (Moragas et al. 2019) posterior a su pasteurización y almacenamiento a 4 °C, categorizándolo como el tratamiento que limitó durante más tiempo la duplicación e incremento de enterobacterias.

Sobeih et al. (2020), establecieron que una leche cruda con un alto grado de existencia de Enterobacterias indica una baja calidad higiénica en procesos de producción. Es así como la elevada presencia de ellos es un índice que abre paso a la posible presencia de organismos patógenos entéricos asociados, suponiendo así, un riesgo microbiológico para los consumidores (Mladenović et al. 2021).

Luigi et al. (2013), mencionaron que las enterobacterias son capaces de sobrevivir a la pasteurización como *Enterobacter cloacae*. A su vez, las formadoras de esporas como *Bacillus spp.* *Paenibacillus spp.*, sobreviven a este tratamiento térmico y son capaces de crecer a temperaturas refrigeradas para producir enzimas extracelulares que provocan el deterioro de la leche (Techer et al. 2014).

Cuadro 10

Recuentos de Enterobacterias en leche durante 7 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.

T °C	Tratamiento	Log UFC/mL ± D. E	
		Tiempo (días)	
		0	7
7	LC	5.10 ± 1.22 ^{a x}	7.09 ± 1.06 ^{a x}
	LCep	4.64 ± 2.47 ^{a y}	6.40 ± 1.24 ^{a xy}
	LP	1.13 ± 0.48 ^{b z}	2.34 ± 1.72 ^{b yz}
	LPCep	1.42 ± 0.98 ^{b y}	5.10 ± 0.77 ^{a x}
4	LC		6.07 ± 1.49 ^{a x}
	LCep		6.86 ± 1.43 ^{a x}
	LP		<1 ^{b x}
	LPCep		2.13 ± 1.13 ^{b xy}
C.V. (%)		72.39	55.5

Nota. T°C: Temperatura de almacenamiento en °C; C.V.: coeficiente de variación; D.E.: desviación estándar; LC: Leche cruda; LCep: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCep: Leche pasteurizada y campos eléctricos; ^{a-b} letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$); ^{xz} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre días ($P < 0.05$).

Escherichia coli

En el conteo inicial de *E. coli* se registró ausencia <2 log UFC/mL en la leche cruda, por lo tanto, tras la aplicación de la pasteurización y la sinergia de ambos no se contabilizó UFCs debido a su ausencia inicial, siendo categorizados todos como iguales estadísticamente (Cuadro 11). Cabe recalcar que, la leche cruda con campos eléctricos (LCep) presentó un alto recuento a lo largo del almacenamiento, teniendo una vida de anaquel de 11 y 12 días para 4 y 7 °C respectivamente. Dichos resultados difieren de la literatura, mencionando que las bacterias gram negativas, como es el caso de *E. coli*, son menos resistentes a la aplicación de los CEP que las bacterias gram positivas (Sharma y Bremer et al. 2014).

Al aplicar los campos eléctricos en la leche pasteurizada (LPCep), extendió su vida útil 4 días más que la leche cruda (LC), con una reducción de 2.35 log. Lo cual coincide con la literatura, explicando que habrá un mayor incremento en la tasa de inactivación de *E. coli* con un aumento en la intensidad del campo eléctrico (Martín et al. 1997).

Tortorello (2003a). indicó que los grupos coliformes y *E. coli* son los que más se aplican en la industria alimentaria como indicadores de saneamiento e integridad del proceso y para la verificación

del Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP por sus siglas en inglés). Por lo tanto, al reportarse ausencia < 1.85 log en LC en el día 0, se infiere que la materia prima o la aplicación de los tratamientos mantuvieron esas condiciones (Cuadro 11).

Cuadro 11

Recuentos de Escherichia coli en leche durante 7 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.

T °C	TRT	Log UFC/mL ± DE					
		Tiempo (días)					
		0	7	9	12	15	18
7	LC	1.85 ± 0.00 ^{a x}	1.85 ± 0.00 ^{a x}	2.51 ± 1.16 ^{a x}	2.57 ± 1.24 ^{a x}	1.85 ± 0.00 ^{bc x}	1.85 ± 0.00 ^{bcx}
	LCep	1.85 ± 0.00 ^{a y}	1.85 ± 0.00 ^{a y}	3.01 ± 2.01 ^{a xy}	1.85 ± 0.00 ^{ab y}	3.25 ± 2.42 ^{ab xy}	4.29 ± 2.33 ^{ax}
	LP	0.85 ± 0.00 ^{a x}	0.85 ± 0.00 ^{a x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{c x}	0.85 ± 0.00 ^{cx}
	LPCep	0.85 ± 0.00 ^{a x}	0.85 ± 0.00 ^{a x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{c x}	0.85 ± 0.00 ^{cx}
4	LC		2.10 ± 0.43 ^{a x}	3.10 ± 2.05 ^{a x}	2.10 ± 0.43 ^{ab x}	3.2 ± 2.34 ^{ab x}	3.00 ±
	LCep		1.85 ± 0.00 ^{a y}	3.28 ± 1.65 ^{a xy}	1.85 ± 0.00 ^{ab y}	3.45 ± 2.77 ^{a x}	1.03 ^{abx}
	LP		0.85 ± 0.00 ^{a x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{c x}	3.98 ± 2.21 ^{ax}
	LPCep		0.85 ± 0.00 ^{a x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{b x}	0.85 ± 0.00 ^{c x}	0.85 ± 0.00 ^{cx}
							0.85 ± 0.00 ^{cx}
C.V. (%)		37.83	40.76	79.11	52.54	91.41	83.95

Nota. TRT: Tratamiento; T°C: Temperatura de almacenamiento en °C; C.V.: coeficiente de variación; D.E.: desviación estándar; LC: Leche cruda; LCep: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCep: Leche pasteurizada y campos eléctricos; ^{a-c} letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); ^{x-y} letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre días (P < 0.05).

Efecto de Temperatura Sobre Variables Fisicoquímicas

Comportamiento en el Día Cero de Variables Fisicoquímicas Tras la Aplicación de Tratamientos

Para el inicio del análisis de la acidez titulable, se encontraron diferencias significativas (P = 0.0004) en comparación entre la leche cruda y los distintos tipos de procesamiento, siendo los tratamientos con bajo porcentaje de acidez la LP, LPCep y LCep, siendo categorizados como iguales al día cero, sin diferencia significativa entre ellos (P = 0.5227). Se toma en cuenta los valores aceptables de acidez titulable, los cuales oscilan en un rango de 0.14 – 0.18% de ácido láctico (Bylund 2015). Se observó que la leche cruda (LC) obtuvo resultados elevados, con un porcentaje de 0.20 (Cuadro 12) considerándola no apta para el consumo humano, ya que el consumidor la percibirá como ácida. Esto concuerda con (Santoso 2020), en el cual obtuvieron para el día cero, una acidez de 0.21% siendo el menor valor de la investigación, debido a la multiplicación de la acidez láctica por la ausencia de un

tratamiento de conservación, y la calidad microbiana afectando directamente en el impacto en la tasa de fermentación.

En la degradación de proteínas, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos al día cero, siendo estas igualdades representadas por porcentajes bajos a pesar de ello. La leche cruda (LC) presentó el mayor porcentaje para ese día, siendo de 0.62% (Cuadro 12). Esto concuerda con (Bylund 2015), quien mencionó que, al no tener un tratamiento de calor se ven afectadas las proteínas de la leche, en este caso, la caseína presente en ella, ya que la tasa de coagulación aumenta a medida incrementa el ácido láctico.

Cuadro 12

Resultados de ATECAL y degradación de proteínas del día cero, expresado en porcentaje \pm D.E.

Variable	ATECAL	% Degradación de proteínas ^(NS)
LC	0.20 \pm 0.01 ^a	0.62 \pm 0.70
LCEP	0.16 \pm 0.02 ^b	0.18 \pm 0.03
LP	0.14 ^b	0.17 \pm 0.02
LPCEP	0.14 \pm 0.01 ^b	0.14 \pm 0.02
C.V. (%)	5.58	123.92
Pr>F	0.0004	0.3379

Nota. D.E.: Desviación Estándar; LC: Leche cruda; LCEP: Leche con Campos Eléctricos Pulsantes; LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada con campos eléctricos pulsantes; ^{a-b}letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$); ^{NS} no hay diferencia significativa ($P > 0.05$); Pr>F: valor de la probabilidad ($P < 0.05$).

Análisis de Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL)

Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y la temperatura ($P < .0001$). En los resultados de la vida anaquel, se encontró que la leche pasteurizada (LP) y con campos eléctricos (LPCep) a 4 °C obtuvieron una mejor estabilidad (Figura 3). Se extendió tres días más la vida anaquel a 4°C en la leche pasteurizada al aplicar los campos eléctricos, el cual LP obtuvo 0.18 \pm 0.01 de ATECAL al día 12, mientras que LPCep obtuvo un porcentaje de ATECAL de 0.17 \pm 0.01 al día 15 (Anexo C). En la leche cruda (LC), se evidenció un porcentaje de ácido láctico inicial elevado, no pasando del día cero (0.20%), a pesar de ello, al aplicar los CEP (LCEP), extendió su vida anaquel < 7 días, debido a que, en el día 7 ya no se encontraba dentro de los parámetros aceptables, pero para día cero si era aceptable, con un porcentaje 0.16 de ácido láctico.

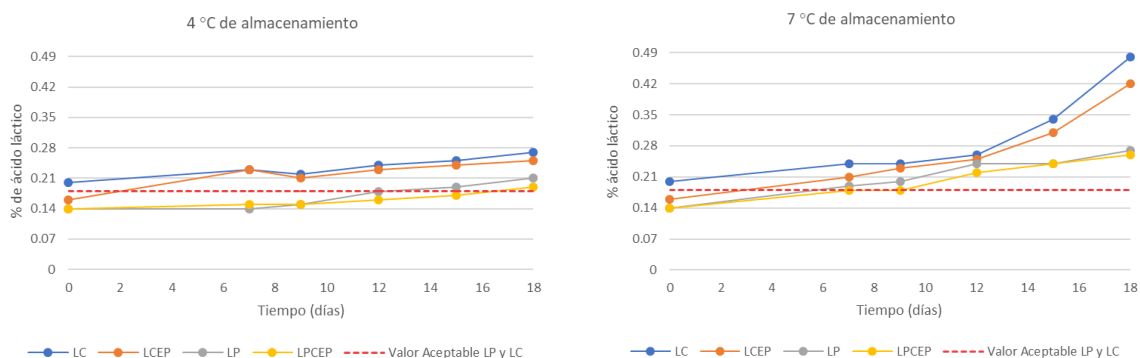
Para ambas temperaturas, se encontró una correlación estadística en los tratamientos con leche pasteurizada (LP) y aplicando los campos eléctricos (LPCep), siendo una correlación positiva alta ≥ 0.80 (Anexo D y E), con una $P < 0.05$, en las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA). Esto último indica que estadísticamente existió un efecto directo del crecimiento de las BMA sobre el incremento del ATECAL. Cabe mencionar que, a 4 °C se encontró una correlación estadística entre los tratamientos de leche cruda con campos eléctricos (LCep), indicando un efecto directo en el aumento en BMA sobre el crecimiento de ATECAL, a su vez, para los tratamientos LCep, LPCep y LP tuvieron un efecto directo del crecimiento de las bacterias psicrótrofas y el aumento de ATECAL, siendo toda una correlación alta positiva (Anexo D).

De acuerdo con Chacón Villalobos (2006), la acidez de la leche, inmediatamente después del ordeño, es generada principalmente por fosfatos, caseínas y dióxido de carbono que son parte de los componentes principales de la leche. Al expresar los resultados de acidez titulable como ácido láctico, involucra una fermentación a partir de lactosa, la cual se puede clasificar como: homofermentativa (produciendo solo ácido láctico), e involucra el desarrollo de *Streptococcus*; y heterofermentativas (produciendo ácido láctico y otras sustancias), la cual involucra el crecimiento de *Lactococcus*. Dichos microorganismos se ven influenciados a través de las condiciones de almacenamiento de los tratamientos.

Se evidenció que, al combinar un tratamiento térmico con un no térmico (LPCep) se obtuvieron mejores resultados para 4 y 7 °C. Asimismo, diferentes factores intervienen en la acidez de la leche, como la precipitación de la proteína y/u otros constituyentes amortiguadores, la precipitación de fosfato de calcio con una disminución concomitante del pH y la disminución del punto final de fenolftaleína (Fernández-Molina et al. 2005).

Figura 3

Curva de aumento de acidez durante 18 días de almacenamiento a dos temperaturas distintas de almacenamiento.



Nota. LC: Leche cruda; LCEP: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada y campos eléctricos.

Análisis de Degradación de Proteínas(%)

Para los análisis de degradación de proteína, se obtuvo una interacción significativa ($P = 0.0161$), por consiguiente, un efecto en conjunto con la temperatura y tratamiento. Se observó una estabilidad mayor para la leche pasteurizada (LP) y con campos eléctricos (LPCEP) a 4 °C (Anexo A). Por otro lado, la leche cruda (LC) y con campos eléctricos (LCEP) a 7 °C, presentaron una vida anaquel < 7 días, debido a que, al séptimo día se encontró con un porcentaje elevado en comparación con los demás tratamientos. Por consiguiente, dichos tratamientos presentaron a lo largo del almacenamiento un elevado porcentaje de degradación de las proteínas (Figura 4). Como se mencionó anteriormente, al no incrementar la temperatura de la leche, aumenta la cantidad de proteína presente en ella (Mejía-López et al. 2017).

Con el paso del tiempo, se observó que la leche pasteurizada con campos eléctricos (LPCEP) obtuvo mejores resultados, siendo este tratamiento el que presentó menor porcentaje de degradación, obteniendo una estabilidad hasta el día 13 y día 11, para 4 y 7 °C, respectivamente (Figura 4). Esto concuerda con Bermúdez-Aguirre et al. (2011), quienes mencionaron que, la disminución de la proteína podría deberse a la electrodeposición de algún material en los electrodos durante el procesamiento de CEP. A su vez, Middendorf et al. (2021), reportaron que al utilizar campos eléctricos de baja intensidad con anchos de pulso corto dan como resultado un aumento en la

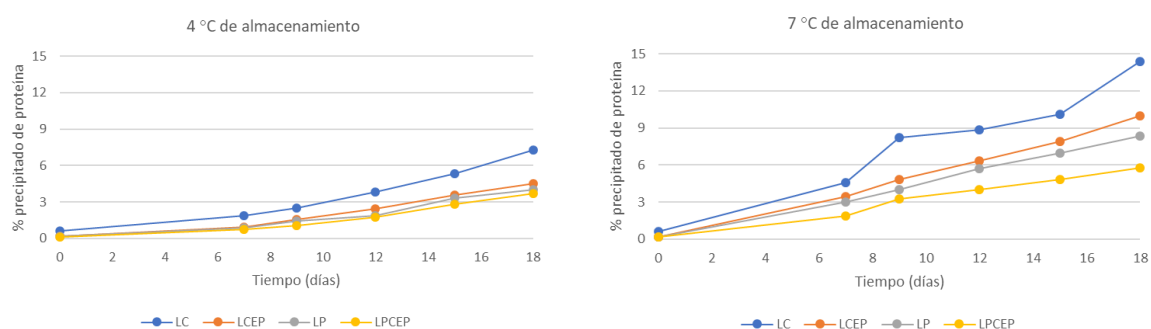
desintegración de las micelas de la caseína, en cambio, a mayor intensidad de los campos y un ancho de pulso largo conducen a una disminución en la formación de aglomerados de micelas.

A 4 °C, se encontró una correlación estadística en los tratamientos con leche pasteurizada (LP), leche pasteurizada con campos pulsantes (LPCEP) y leche cruda (LC), siendo una correlación positiva alta ≥ 0.80 (Anexo D), con una $P < 0.0001$. Lo cual, indica que estadísticamente existió un efecto directo del aumento en degradación de proteínas sobre el crecimiento del ATECAL. Por consiguiente, *Lactobacillus*, perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas y al ser uno de los responsables de la acidificación en la leche (Bermúdez-Aguirre et al. 2009), influye directamente sobre la degradación de las proteínas.

A pesar que, para dicho análisis no se utilizó un método oficial, existen investigaciones en la cual, utilizan centrifugadoras para la obtención de micelas de caseína y fracciones de la proteína del suero, como menciona Martin et al. (2007) y Odriozola-Serrano et al. (2006), respectivamente. La caseína es considerada un componente principal de la leche y constituye alrededor del 80% de la proteína presente en ella, mientras que el resto constituye lactosa y suero. Los componentes principales de la caseína son α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína y κ -caseína (Jabeen et al. 2020).

Figura 4

Curva de degradación de proteínas durante 18 días de almacenamiento a dos temperaturas distintas de refrigeración.



Nota. LC: Leche cruda; LCEP: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada y campos eléctricos.

Conclusiones

En términos generales y basado en la Norma MINSA (2008), se determinó que al combinar los campos eléctricos con un proceso térmico, generan el mismo resultado que la pasteurización con una vida de anaquel de 10 y 11 días respectivamente.

Los tratamientos con adición de calor inhiben en mayor medida todos los microorganismos en comparación al tratamiento no térmico. La LPCep a 4 °C tuvo un efecto significativo sobre BMA y PSI mas no en CT, ENT y *E. coli*.

Las condiciones de 4 °C confirieron mayor estabilidad de ATECAL y menor degradación de proteínas a través del tiempo que los tratamientos almacenados a 7 °C.

Recomendaciones

Tomar en consideración microorganismos patógenos de interés en la leche para determinar el efecto de los campos eléctricos en la inocuidad de esta.

Evaluar la estabilidad y contenido de micronutrientes termosensibles, como la vitamina A, entre los tratamientos de pasteurización y campos eléctricos pulsantes.

Enfocar el estudio del efecto de los campos eléctricos en otros productos agroindustriales perecederos como los jugos de fruta envasados.

Replicar el estudio con leches de distintos porcentajes de grasa.

Referencias

- Adil M, Salman A, Hamad I. 2011. Enumeration and identification of Coliform bacteria from raw milk in Khartoum State, Sudan. *Journal of Cell and Animal Biology*; [consultado el 9 de jul. de 2022]. 5(7):121–128. http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380273340_Salman%20and%20Hamad.pdf.
- Alirezalu K, Munekata PES, Parniakov O, Barba FJ, Witt J, Toepfl S, Wiktor A, Lorenzo JM. 2020. Pulsed electric field and mild heating for milk processing: a review on recent advances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 100(1):16–24. eng. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.9942>. doi:10.1002/jsfa.9942.
- Bermúdez-Aguirre D, Fernández S, Esquivel H, Dunne PC, Barbosa-Cánovas GV. 2011. Milk processed by pulsed electric fields: evaluation of microbial quality, physicochemical characteristics, and selected nutrients at different storage conditions. *J Food Sci*. 76(5):S289-99. eng. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02171.x.
- Bermúdez-Aguirre D, Mawson R, Versteeg K, Barbosa-Cánovas GV. 2009. Composition properties, physicochemical characteristics and shelf life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. *Journal of Food Quality*. 32(3):283–302. doi:10.1111/j.1745-4557.2009.00250.x.
- Bhat M, Shahi NC, Asfaq, Alam I. 2020. Pulsed Electric Field Processing of Milk: A Review. *International Archive of Applied Sciences and Technology*; [consultado el 21 de oct. de 2021]. 11(4):105–113. <http://www.soeagra.com/iaast/iaastdec2020/20.pdf>.
- Bylund G. 2015. *Dairy processing handbook*. 3rd ed., revision 1. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB. 482 p. ISBN: 9789176111321.
- Casas Murillo DE, Villacrés Brazales AS. 2015. Efectos de pretratamientos en la actividad de polifenol oxidasa extraída de manzana (*Malus domestica*). Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 38 p.
- Chacón Villalobos A. 2006. Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agron. Mesoam*. 17(1):55. doi:10.15517/am.v17i1.5066.
- Cipolatti FG, Lazarraga SE. 2016. Análisis de la calidad higiénica y sanitaria de la leche en un tambo de la localidad de Villa Valeria [Tesis]. Argentina: Universidad de Córdoba. 40 p; [consultado el 15 de jul. de 2022]. <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/4762/Cipolatti%20-%20Lizarraga.%20An%C3%A1lisis%20de%20la%20calidad%20higi%C3%A9nica%20y%20sanitaria%20de%20la%20leche.%20%20.pdf?sequence=1>.
- Cornell University. 2008. *Raw Milk Quality Tests*. Ithaca, NY 14853: Department of Food Science; [consultado el 14 de jul. de 2022]. 2 p. <https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Milk-Raw-Tests-Summary-07-08.pdf>.
- Corradini MG. 2018. Shelf Life of Food Products: From Open Labeling to Real-Time Measurements. *Annu Rev Food Sci Technol*. 9:251–269. eng. doi:10.1146/annurev-food-030117-012433.
- Datta N, Tomasula PM, editores. 2015. *Emerging Dairy Processing Technologies*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 9781118560471.
- Fabro MA, Milanésio HV, Robert LM, Speranza JL, Murphy M, Rodríguez G, Castañeda R. 2006. Technical Note: Determination of Acidity in Whole Raw Milk: Comparison of Results Obtained by Two Different Analytical Methods. *J Dairy Sci*; [consultado el 26 de jun. de 2022]. 89(3):859–861.

[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72149-X/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72149-X/pdf).
doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72149-X.

- FAO. 2015. Food loss and waste facts. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado 2021; consultado el 7 de oct. de 2021]. en. <https://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/317265/>.
- Fernández-Molina JJ, Fernández-Gutiérrez SA, ALTUNAKAR B, Bermúdez-Aguirre D, SWANSON BG, BARBOSA-CANOVAS GV. 2005. The combined effect of pulsed electric fields and conventional heating on the microbial quality and shelf life of skim milk. *J Food Processing Preservation*. 29(5-6):390–406. doi:10.1111/j.1745-4549.2005.00036.x.
- FDA Food and Drug Administration. 2019. Pasteurized Milk Ordinance. 42^a ed. Estados Unidos: [sin editorial]; [consultado el 5 de feb. de 2022]. <https://www.fda.gov/media/140394/download>.
- Fusco V, Chieffi D, Fanelli F, Logrieco AF, Cho G-S, Kabisch J, Böhnlein C, Franz CMAP. 2020. Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19(4):2013–2049. eng. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12568>. doi:10.1111/1541-4337.12568.
- IFCO Systems. 2020. Acabemos con el desperdicio y la pérdida de alimentos | IFCO. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 15 de dic. de 2020; consultado el 7 de oct. de 2021]. <https://www.ifco.com/es/acabemos-con-el-desperdicio-y-la-perdida-de-alimentos/>.
- Jabeen M, Anwar M, Fatima W, Saleem A, Rehman K, Masood M, Iqbal N, Anjum S, Madeeha Zafar A, Aslam N. 2020. Quantitative Estimation of Casein in Different Milk Samples. *SJAC*. 8(3):107. doi:10.11648/j.sjac.20200803.13.
- K.L. Kohlmann, S.S. Nielsen, L.R. Steenson, M.R. Ladisch. 1991. Production of Proteases by Psychrotrophic Microorganisms. *J Dairy Sci*; [consultado el 7 de jul. de 2022]. 74(10):3275–3283. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(91\)78513-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(91)78513-5/pdf).
- Kornacki JL. 2010. Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment. New York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4419-5517-3.
- Lee GJ, Han BK, Choi HJ, Kang SH, Baick SC, Lee D-U. 2015. Inactivation of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactobacillus brevis* in Low-fat Milk by Pulsed Electric Field Treatment: A Pilot-scale Study. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 35(6):800–806. eng. doi:10.5851/kosfa.2015.35.6.800.
- Luigi T, Rojas L, Valbuena O. 2013. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expendida en el estado Carabobo, Venezuela. *Salus*. 17(1):1316–7138.
- Martin GJO, Williams RPW, Dunstan DE. 2007. Comparison of casein micelles in raw and reconstituted skim milk. *J Dairy Sci*. 90(10):4543–4551. eng. doi:10.3168/jds.2007-0166.
- Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M. 2018. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *J Dairy Sci*; [consultado el 20 de oct. de 2021]. 101(1):861–870. eng. <https://www.journalofdairyscience.org/action/showPdf?pii=S0022-0302%2817%2930968-2>. doi:10.3168/jds.2017-13339.
- Martin NH, Trmčić A, Hsieh T-H, Boor KJ, Wiedmann M. 2016. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. *Front Microbiol*. 7:1549. eng. doi:10.3389/fmicb.2016.01549.

- Martín O, Qin BL, Chang FJ, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by High Intensity Pulsed Electric Fields. *J Food Process Engineering*. 20(4):317–336. doi:10.1111/j.1745-4530.1997.tb00425.x.
- Martinez Giron J, Figueroa Sepúlveda K, Castillo Robles NZ. 2021. Aplicación de altas presiones y otras tecnologías en frutas como alternativa de tratamientos térmicos convencionales. *Biotechnol. sector agropecuario agroind*. 19(2):271–285. doi:10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1772.
- Masiello SN, Martin NH, Trmčić A, Wiedmann M, Boor KJ. 2016. Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci*. 99(1):130–140. eng. doi:10.3168/jds.2015-9728.
- Mejía-López A, Rodas S, Baño D. 2017. La desnaturalización de las proteínas de la leche y su influencia en el rendimiento del queso fresco. *Enfoque UTE*. 8(2):121–130. doi:10.29019/enfoqueute.v8n2.162.
- Middendorf D, Bindrich U, Siemer C, Töpfl S, Heinz V. 2021. Affecting Casein Micelles by Pulsed Electrical Field (PEF) for Inclusion of Lipophilic Organic Compounds. *Applied Sciences*. 11(10):4611. doi:10.3390/app11104611.
- Miller LC, Neupane S, Joshi N, Lohani M, Sah K, Shrestha B. 2022. Dairy Animal Ownership and Household Milk Production Associated with Better Child and Family Diet in Rural Nepal during the COVID-19 Pandemic. *Nutrients*. 14(10). eng. doi:10.3390/nu14102074.
- MINSA. 2008. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú: Ministerio de Salud. 26 p.
- Mladenović KG, Grujović MŽ, Kiš M, Furmeg S, Tkalec VJ, Stefanović OD, Kocić-Tanackov SD. 2021. Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Appl Microbiol Biotechnol*. 105(23):8615–8627. eng. doi:10.1007/s00253-021-11655-7.
- Moragas M, Valcárcel S, Chirapozu Á, De Pablo B. 2019. Recopilación normas microbiológicas y parámetros físico-químicos relacionados. 20ª ed. Bilbao: [sin editorial]; [consultado el 8 de jul. de 2022]. 63 p. http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/manuales/Normas%20microbiologicas%20de%20los%20alimentos%20Enero%202019.pdf.
- Murphy SC, Martin NH, Barbano DM, Wiedmann M. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J Dairy Sci*. 99(12):10128–10149. eng. doi:10.3168/jds.2016-11172.
- Novoa CF, Restrepo LP. 2007. Influencia de las Bacterias Psicrótrofas en la Actividad Proteolítica de la leche. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 54(1):9–16.
- Odriozola-Serrano I, Bendicho-Porta S, Martín-Belloso O. 2006. Comparative Study on Shelf Life of Whole Milk Processed by High-Intensity Pulsed Electric Field or Heat Treatment. *J Dairy Sci*; [consultado el 3 de jul. de 2022]. 89(3):905–911. [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72155-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72155-5/pdf). doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72155-5.
- Özer B, Yaman H. 2014. Milk and milk products: Microbiology of Liquid Milk. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. [sin lugar]: Elsevier. p. 721–727.
- PNUD. 2015. Objetivo 12: Producción y consumo responsable | PNUD. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado 2021; consultado el 15 de oct. de 2021]. <https://www1.undp.org/content/undp/es/home/sustainable-development-goals/goal-12-responsible-consumption-and-production.html>.

- Rafiq S, Huma N, Pasha I, Sameen A, Mukhtar O, Khan MI. 2016. Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australas J Anim Sci.* 29(7):1022–1028. eng. doi:10.5713/ajas.15.0452.
- Reglamento (UE) N° 365/2010 (2010).
- Rodríguez González O. 2010. Hurdle technologies: microbial inactivation by pulsed electric fields during milk processing [Tesis doctoral]. Canadá: The University of Guelph. 194 p; [consultado el 7 de jul. de 2022]. https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/2445/Thesis-ORG_Complete.pdf;sequence=6.
- Rodríguez-González O, Walkling-Ribeiro M, Jayaram S, Griffiths MW. 2011. Factors affecting the inactivation of the natural microbiota of milk processed by pulsed electric fields and cross-flow microfiltration. *J Dairy Res.* 78(3):270–278. eng. doi:10.1017/S0022029911000367.
- [RTCA] Reglamento Técnico Centroamericano. 2009. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos: 67 04 50 08. [sin lugar]: [sin editorial]. 36 p.
- Sabbir MA, Ahmed H, Maan AA, Rehman A, Afraz MT, Iqbal MW, Khan IM, Amir RM, Ashraf W, Khan MR, et al. 2021. Effect of non-thermal processing techniques on pathogenic and spoilage microorganisms of milk and milk products. *Food Sci. Technol.* 41(2):279–294. doi:10.1590/fst.05820.
- [SAG] Secretaría de Agricultura y Ganadería. 2001. Reglamento para la inspección y certificación sanitaria de la leche y los productos lácteos: Acuerdo No.656-01. Honduras: SAG. 13 p.
- Santoso KA. 2020. The Effects of Milk Age on the Titratable Acidity of Raw Milk. *International Journal of Science and Research (IJSR).* 9(7):1–9.
- Sharma P, Bremer P, Oey I, Everett DW. 2014. Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing. *International Dairy Journal.* 35(1):49–56. doi:10.1016/j.idairyj.2013.10.005.
- Sharma P, Oey I, Everett DW. 2014. Effect of pulsed electric field processing on the functional properties of bovine milk. *Trends in Food Science & Technology.* 35(2):87–101. doi:10.1016/j.tifs.2013.11.004.
- Sobeih A, AL-Hawary I, Khalifa E, Ebied N. 2020. Prevalence of Enterobacteriaceae in raw milk and some dairy products. *Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal.* 18(2):9–13. https://kvmjournals.ekb.eg/article_117851.html. doi:10.21608/kvmj.2020.39992.1009.
- Techer C, Baron F, Jan S. 2014. Spoilage of animal products, microbial Milk Spoilage. En: *Encyclopedia of Food Microbiology.* [sin lugar]: Elsevier. p. 446–452.
- The milk and milk products. Method of colony of bacteri grown at 30°C (2002).
- Tortorello ML. 2003a. Indicator Organisms for Safety and Quality—Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of AOAC International.* 86(6):1208–1217.
- Tortorello ML. 2003b. Indicator Organisms for Safety and Quality—Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of AOAC International.* 86(6):1208–1217. doi:10.1093/jaoac/86.6.1208.
- Yuan L, Sadiq FA, Burmølle M, Wang NI, He G. 2019. Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review. *J Food Prot.* 82(7):1148–1159. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-032.

Anexos

Anexo A

Vida de anaquel (VA) expresado en días, basado en variables microbiológicas y fisicoquímicas.

TRT	T °C	Tiempo (días)						
		BMA	PSI	CT	ENT	<i>E. coli</i>	ATECAL	Degradación de proteínas
LPCep	4	15	17	11	2	18	17	13
LPCep	7	2	0	0	0	18	8	5
LP	4	11	11	11	6	18	11	11
LP	7	2	0	6	2	18	2	2
LCep	4	2	0	0	0	11	0	9
LCep	7	2	0	0	0	12	0	0
LC	4	5	0	0	0	14	0	5
LC	7	0	0	0	0	18	0	0

Nota. ATECAL: Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico; BMA: Bacterias mesófilas aerobias; CT: Coliformes Totales; ENT: Enterobacterias; PSI: Psicrótrofos; LC: Leche cruda; LCEP: Leche con campos eléctricos;

LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada y campos eléctricos; VA: vida de anaquel.

Anexo B

Probabilidades del análisis de varianza por cada variable dependiente evaluada en la presente investigación.

Variable dependiente	Día	Tratamiento	Bloque	Temperatura	Interacción día*tratamiento*temperatura	R ²	% C.V.
BMA	<0.0001	<0.0001	0.9291	<0.0001	<0.0001	0.9146	12.69
PSI	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.9681	9.70
ENT	<0.0001	<0.0001	0.0185	<0.0001	0.6573	0.7283	32.26
CT	<0.0001	<0.0001	0.0041	<0.0001	0.0637	0.8468	28.00
<i>E. coli</i>	0.0212	<0.0001	0.0038	0.4122	0.739	0.6551	54.65
ATECAL	<0.0001	<0.0001	0.4975	<0.0001	<0.0001	0.8836	13.57
Degradación de proteínas	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0161	0.8514	44.20

Nota. ATECAL: Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico; BMA: Bacterias mesófilas aerobias; PSI: Psicrótrofos; ENT: Enterobacterias; CT: Coliformes Totales; C.V.: coeficiente de variación; P valor: valor de la probabilidad (P < 0.05).

Anexo C

Media \pm D.E. de ATECAL expresado en porcentaje (%) para cada tratamiento durante 18 días de almacenamiento a 4 y 7 °C.

TRT	°C	Tiempo (días)					
		0	7	9	12	15	18
LC	7	0.20 \pm 0.01 ^{a (z)}	0.24 \pm 0.01 ^{a (yz)}	0.24 \pm 0.02 ^{a (yz)}	0.26 \pm 0.01 ^{a (y)}	0.34 \pm 0.04 ^{a (x)}	0.48 \pm 0.01 ^{a (w)}
LCEP	7	0.16 \pm 0.02 ^{ab (z)}	0.21 \pm 0.01 ^{abc (y)}	0.23 \pm 0.01 ^{ab (y)}	0.25 \pm 0.04 ^{a (y)}	0.31 \pm 0.07 ^{a (x)}	0.42 \pm 0.13 ^{b (x)}
LP	7	0.14 \pm 0.00 ^{b (y)}	0.19 \pm 0.02 ^{bcd (xy)}	0.20 \pm 0.02 ^{abc (x)}	0.24 \pm 0.01 ^{a (x)}	0.24 \pm 0.01 ^{b (x)}	0.27 \pm 0.07 ^{c (x)}
LPCEP	7	0.14 \pm 0.01 ^{b (z)}	0.18 \pm 0.01 ^{cd (yz)}	0.18 \pm 0.02 ^{bc (xyz)}	0.22 \pm 0.01 ^{ab (xy)}	0.24 \pm 0.01 ^{b (x)}	0.26 \pm 0.05 ^{c (x)}
LC	4	0.20 \pm 0.01 ^{a (y)}	0.23 \pm 0.01 ^{abc (xy)}	0.22 \pm 0.01 ^{ab (xy)}	0.24 \pm 0.01 ^{a (xy)}	0.25 \pm 0.01 ^{b (x)}	0.27 \pm 0.01 ^{c (x)}
LCEP	4	0.16 \pm 0.01 ^{ab (y)}	0.23 \pm 0.01 ^{ab (x)}	0.21 \pm 0.02 ^{ab (x)}	0.23 \pm 0.01 ^{ab (x)}	0.24 \pm 0.02 ^{b (x)}	0.25 \pm 0.01 ^{cd (x)}
LP	4	0.14 \pm 0.00 ^{b (y)}	0.14 \pm 0.01 ^{d (y)}	0.15 \pm 0.01 ^{c (y)}	0.18 \pm 0.01 ^{bc (xy)}	0.19 \pm 0.01 ^{c (xy)}	0.21 \pm 0.02 ^{de (x)}
LPCEP	4	0.14 \pm 0.01 ^{b (x)}	0.15 \pm 0.01 ^{d (x)}	0.15 \pm 0.01 ^{c (x)}	0.16 \pm 0.01 ^{c (x)}	0.17 \pm 0.01 ^{c (x)}	0.19 \pm 0.01 ^{e (x)}
C.V. (%)		16.70	18.82	17.20	16.72	24.72	37.16

Nota. °C: Grados Celsius; ATECAL: Acidez Titulable Expresada Como Ácido Láctico; C.V.: coeficiente de variación; D.E.: desviación estándar; LC: Leche cruda; LCEP: Leche con campos eléctricos; LP: Leche pasteurizada;

LCEP: Leche pasteurizada y campos eléctricos; ^{a-e} letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05); ^{w-z} letras diferentes en la misma fila indican diferencias

significativas entre días (P < 0.05).

Anexo D

Análisis de correlación de conteos microbiológicos y porcentaje de degradación de proteínas comparados con ATECAL en tratamientos almacenados a 4 °C.

	Parámetros					
	BMA	PSI	ENT	<i>E. coli</i>	CT	Degradación
LC						
P valor	0.0001	0.0017	0.1326	0.6983	0.1287	<.0001
Coefficiente de Pearson	0.78864	0.71785	0.36828	0.0982	0.37179	0.84635
LCEP						
P valor	<.0001	<.0001	0.0038	0.6097	0.0161	0.0015
Coefficiente de Pearson	0.91304	0.9607	0.64519	0.12907	0.55817	0.69044
LP						
P valor	<.0001	<.0001	0.041	--*	0.069	<.0001
Coefficiente de Pearson	0.96289	0.88109	0.48569	--*	0.43807	0.86752
LPCEP						
P valor	<.0001	<.0001	0.0607	--*	0.0105	<.0001
Coefficiente de Pearson	0.97671	0.85028	0.45037	--*	0.58649	0.79991

Nota. ATECAL: Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico; BMA: Bacterias mesófilas aerobias; PSI: Psicrótrofos; ENT: Enterobacterias; CT: Coliformes Totales; LC: Leche cruda; LCEP: Leche con campos eléctricos;

LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada y campos eléctricos; P valor: valor de la probabilidad ($P < 0.05$). * Valor microbiológico sin evidencia de crecimiento.

Anexo E

Análisis de correlación de conteos microbiológicos y porcentaje de degradación de proteínas comparados con ATECAL en tratamientos almacenados a 7 °C.

	Parámetros					
	BMA	PSI	ENT	<i>E. coli</i>	CT	Degradación
LC						
P valor	0.2198	0.0738	0.2454	0.6201	0.272	0.0006
Coefficiente de Pearson	0.30413	0.45889	0.28862	-0.12538	0.27355	0.72869
LCEP						
P valor	0.0252	0.0606	0.4368	0.0022	0.1932	0.0055
Coefficiente de Pearson	0.52524	0.4788	0.19552	0.673	0.32156	0.62513
LP						
P valor	<.0001	0.0017	0.1466	--*	0.0347	0.0077
Coefficiente de Pearson	0.85029	0.71842	0.35641	--*	0.49982	0.60608
LPCEP						
P valor	<.0001	0.015	0.0339	--*	0.0162	0.003
Coefficiente de Pearson	0.88544	0.59504	0.50159	--*	0.55774	0.65852

Nota. ATECAL: Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico; BMA: Bacterias mesófilas aerobias; PSI: Psicrótrofos; ENT: Enterobacterias; CT: Coliformes Totales; LC: Leche cruda; LCEP: Leche con campos eléctricos;

LP: Leche pasteurizada; LPCEP: Leche pasteurizada y campos eléctricos; P valor: valor de la probabilidad ($P < 0.05$). * Valor microbiológico sin evidencia de crecimiento.