

3. PUBLICACIONES

Els primers estudis realitzats en el treball ara exposat foren dirigits a investigar els efectes dels tractaments UHT en la llet de cabra. Però de resultes de la participació del grup investigador, a partir de finals de 1992, en el Projecte Europeu “*AIR-CT 92-0296 Project: High Hydrostatic Pressure Treatment: its impact on spoilage microorganisms, biopolymer activity, functionality and nutrient composition of food systems*” aquest treball fou orientat cap a l'estudi dels tractaments d'alta pressió en la llet de cabra. Així doncs, les primeres proves es realitzaren amb la intenció de valorar l'efecte de l'alta pressió en les fraccions nitrogenades de la llet de cabra. En aquest estat del treball, ens fou concedida una beca de la Generalitat de Catalunya per a la realització d'una estada al Hannah Research Institute (Escòcia), amb el qual començaria una fructífera col·laboració. El treball conjunt amb el Dr. Andrew Law permeté, en primer lloc, utilitzar tècniques analítiques adients per a valorar l'efecte de l'alta pressió en les proteïnes sèriques de la llet de cabra. Així, es comprovà la variabilitat en la composició de la llet de cabra emprada en els primers experiments a la UAB. En diversos tractaments, si s'utilitzaven distintes mostres de llet, les diferències en la composició afegien una variable no controlada que dificultava la valoració dels nivells de desnaturalització de les proteïnes sèriques. Fou necessari, doncs, treballar amb tècniques cromatogràfiques (FPLC) per a conèixer amb més profunditat l'aptitud per a l'agregació de cadascuna de les proteïnes, en funció de la pressió i la temperatura aplicades.

Fruit del treball sobre les proteïnes sèriques n'és exponent la primera publicació presentada amb el títol “*Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk*” (Felipe i col., 1997), en la qual es descriu, per primera vegada, l'efecte de l'alta pressió en les diferents proteïnes sèriques de la llet. Amb sorpresa, s'observà la formació d'agregats intermoleculars de β -lactoglobulina en la llet pressuritzada però no en la llet tractada tèrmicament. Aquest descobriment portà a plantejar una sèrie d'experiments per a esbrinar si la β -lactoglobulina i la κ -caseïna caprina interaccionaven de manera diferent segons el tipus de tractament. Per a aconseguir suficient β -lactoglobulina caprina es posà al punt el mètode preparatiu exposat en la publicació “*Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography*” (Felipe i Law, 1997).

Malauradament, atès que tant la κ -caseïna com la β -lactoglobulina tenen capacitat per a formar agregats, fou impossible determinar mitjançant electroforesi si l'agregació formada es corresponia a una suma d'agregats de les proteïnes o bé era fruit de la interacció de les dues proteïnes, dificultat també observada per López-Fandiño i col. (1997). En aquest punt, es resolgué estudiar els canvis produïts per l'alta pressió en la fase col·loidal de la llet de cabra. D'aquesta part del treball, n'és reflex la publicació amb títol “*Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk*” (Law i col., 1998). La separació de la fase micel·lar en tres sobrenedants per ultracentrifugació va permetre obtenir molta informació, en concordança amb la bibliografia existent. Aquesta tècnica va servir per constatar que existia un efecte no esperat sobre les caseïnes ja que en combinar pressions de 300 i 400 MPa amb

temperatures de 45 °C es formaven estructures de caseïna de gran diàmetre. Per a corroborar els resultats obtinguts i, donades les dificultats que van sorgir en el desenvolupament de la investigació, com ara l'accentuada corba de lactació de les cabres, s'escollí la utilització d'una tècnica complementària, com és la microscòpia electrònica de transmissió, per a demostrar la formació de les “superestructures” caseíniques en les esmentades condicions.

3.1. *Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk (Felipe i col., 1997).*

3.2. *Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography (Felipe i Law, 1997).*

3.3. *Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk (Law i col., 1998).*

4. DISCUSSIÓ

4.1. ESTRUCTURES MACROMOLECULARS

La desnaturalització de les proteïnes s'associa a canvis en la seva estructura però sense comportar necessàriament l'agregació o la pèrdua de solubilitat. Algunes proteïnes, com la α -lactalbúmina, es desnaturalitzen reversiblement a partir de 62,5 °C, mentre que la pèrdua de solubilitat a pH 4,6 és petita en pasteuritzar a 72 °C/5 min (tan sols 7,9 % en la llet de vaca). Altres proteïnes sèriques, com les immunoglobulines, la seralbúmina o la lactoferrina, mostren un patró diferent, a temperatures molt semblants, entre el llindar de la desnaturalització reversible i la irreversible. La β -lactoglobulina manifesta un comportament intermedi entre la α -lactalbúmina i la resta de proteïnes sèriques (Rüegg i col., 1977; Law i col., 1994a; Law 1995b). L'ordre en què les proteïnes sèriques perden la seva solubilitat a pH 4,6 en tractar tèrmicament la llet és el següent: immunoglobulines > seralbúmina > β -lactoglobulina > α -lactalbúmina, mentre que en pressuritzar, hem observat que la sensibilitat a l'agregació de les proteïnes sèriques correspon a: β -lactoglobulina > immunoglobulines > seralbúmina > α -lactalbúmina.

L'elevada aptitud a la desnaturalització i agregació de la β -lactoglobulina per alta pressió ha estat corroborada per diferents autors (Hayashi i col., 1987; Dofour i col., 1994; Zasytkin i col., 1996). Amb tractaments per sobre de 50 MPa aquesta proteïna perd la seva estructura tridimensional original (Tanaka i Kunugi, 1996). En un primer estadi es produeix la dissociació del dímer de β -lactoglobulina amb l'aparició de monòmers i, posteriorment, es produeix una agregació entre aquests monòmers estabilitzada per ponts disulfur (Tanaka i col., 1996). Tal com hem observat, en la llet o en solucions tampó, aquest tipus d'agregació es manifesta amb l'aparició d'agregats solubles de diferent pes molecular. Els agregats formats són de major pes molecular com més gran és la intensitat de pressurització. Quan els tractaments es fan a 25 °C els agregats es formen exclusivament amb molècules de β -lactoglobulina, mentre que quan els tractaments es fan a 50 °C, apareix una interacció amb molècules de α -lactalbúmina. En condicions semblants, Jegouic i col. (1997) observaren igualment la formació de ponts disulfur entre ambdues proteïnes en tractar-les en tampó a pH 8,5.

El patró d'agregació de la β -lactoglobulina observat pels tractaments per alta pressió no coincideix amb els descrits en tractar tèrmicament. En aquest cas, la presència d'agregats solubles no s'observa a la llet, però sí quan es realitzen en solucions tampó o xerigot (Dumay i Cheftel, 1989).

En aplicar tractaments tèrmics, la β -lactoglobulina interacciona amb la κ -caseïna de la superfície micel·lar mitjançant ponts disulfur. Aquesta interacció comporta canvis en les propietats de la llet i dels seus derivats, com ara, en alguns tractaments, una menor velocitat de

coagulació enzimàtica, la incorporació de proteïnes sèriques a la quallada o l'increment de consistència dels gels làctics àcids. De la mateixa manera, en tractar per alta pressió per sobre de 200 MPa, s'observa un efecte alentidor de la coagulació enzimàtica en tractaments en els quals s'agregi la major part de la β -lactoglobulina (López-Fandiño i col., 1997). Aquests mateixos autors han descrit la incorporació de la proteïna sèrica desnaturalitzada a la quallada enzimàtica (López-Fandiño i col., 1996). Aquestes dades ens indiquen que la β -lactoglobulina, tant en forma monomèrica com formant agregats, interacciona amb la κ -caseïna micel·lar. Tanmateix, la presència d'agregats solubles de β -lactoglobulina en la llet pressuritzada ens fa pensar que, almenys en principi, la interacció entre les dues proteïnes segueix patrons diferents per als tractaments tèrmics o per a l'alta pressió, ja que en el segon cas la β -lactoglobulina desnaturalitzada per pressió té més afinitat per a agregar-se inicialment amb altres β -lactoglobulines que no pas amb la κ -caseïna.

L'estudi de les interaccions β -lactoglobulina- κ -caseïna és complex, tal com han comprovat molts autors (Smits i van Brouwershaven, 1980; Haque i Kinsella, 1988; Mottar i col., 1989). Totes dues proteïnes tenen dues cisteïnes lliures per molècula per a formar ponts disulfur i, per tant, tenen capacitat per a formar agregats covalents quan s'aplica energia mitjançant un tractament tèrmic o per alta pressió. És per això, que és molt difícil distingir si l'agregat que es produeix en tractar les dues proteïnes prové de la seva interacció o simplement de la suma de dues agregacions separades (López-Fandiño i col., 1997). Les característiques particulars de la κ -caseïna caprina, que disposa de tres aminoàcids cisteïna lliures, no modifica les propietats dels agregats proteics formats, en tractar la llet tèrmicament o per alta pressió, tal com es comprovà en diferents experiments específics (dades no publicades).

Respecte a la resta de proteïnes sèriques, cal mencionar que la α -lactalbúmina se'ns ha mostrat com una proteïna altament resistent a l'agregació per pressió. De fet, amb 500 MPa, 20 °C i 10 minuts no disminueix la solubilitat a pH 4,6, i cal aplicar-hi tractaments d'alta pressió combinats amb temperatures de 45 °C perquè la proteïna s'agregui irreversiblement.

La seralbúmina és poc sensible a l'agregació per alta pressió d'acord amb Hayakawa i col. (1992), però no segons Galazka i col. (1997), que observaren una forta desnaturalització i agregació de la seralbúmina bovina en solucions a pH neutre en aplicar-hi 400 MPa. A causa de la seva similitud en el pes molecular, la cromatografia en gel (FPLC) no és adequada per a separar aquesta proteïna de la lactoferrina. De totes maneres, la quantificació de l'agregació d'ambdues proteïnes no va ser possible, per l'aparició d'agregats solubles de β -lactoglobulina amb un pes molecular similar. En tot cas, la disminució de l'àrea del pic cromatogràfic corresponent a les proteïnes seralbúmina/lactoferrina en la llet de cabra tractada a 45 °C i 400 MPa indica un important grau d'agregació.

Les immunoglobulines presenten una certa resistència a l'agregació per alta pressió (Tonello i col., 1992). Fins a 200 MPa, les immunoglobulines mantenen la seva estructura original (Howlett i col., 1992). En la llet de cabra, la seva agregació a pH 4,6 no es pot detectar

fins a tractaments de 400 MPa a 25 °C durant 10 min. Amb tot, pressions més elevades o combinacions amb temperatures de 45 °C també causen elevades pèrdues de solubilitat.

L'agregació de les proteïnes sèriques per alta pressió implica modificacions en les propietats de la llet, en especial respecte a la producció de formatge. La ràpida desnaturalització i agregació de la β -lactoglobulina provoca un increment del rendiment formatger i una major capacitat de retenció d'aigua de la quallada (López-Fandiño i col., 1996). Els aspectes negatius que, segons Banks (1989), comporta la retenció de les proteïnes sèriques en les característiques organolèptiques del formatge es poden veure matisats per altres efectes dels tractaments d'alta pressió. Entre aquests efectes destaquem la resistència al tractament de certs lactobacils (Gervilla i col., 1997), que afavorirà la supervivència i el creixement en el formatge de lactobacils no inoculats en els ferments, els quals desenvolupen una important tasca en la generació de substàncies volàtils de baix pes molecular i, per tant, d'aromes característiques del formatge. La no-inactivació dels enzims endògens (Trujillo i col., 1997a) també és una característica dels formatges elaborats a partir de llet crua, que es considera avantatjosa per a una correcta maduració del formatge.

La presència d'agregats solubles de β -lactoglobulina observada en qualsevol dels tractaments que s'han dut a terme pot servir així mateix com a indicador del tractament utilitzat. El pes molecular d'aquests agregats i la relació entre la quantitat de β -lactoglobulina no agregada amb la de α -lactalbúmina depenen de la intensitat del tractament, de manera que es podria obtenir una fórmula normativa per a autenticar els tractaments per alta pressió. La activitat de diferents enzims endògens de la llet, com ara fosfatasa alcalina, plasmina, peroxidasa o lipasa, també és indicativa del tractament utilitzat.

L'efecte de l'alta pressió en les caseïnes és manifestament diferent del de les proteïnes sèriques. Tal com hem vist fins a combinacions de 500 MPa i 45 °C, la seva estructura laxa i elàstica les fa més estables a les modificacions induïdes per l'alta pressió, sense que apareguin canvis en la mobilitat cromatogràfica similars als ocorreguts en tractaments tèrmics d'esterilització (Law i col., 1994b). Tanmateix, es modifica l'estructura de la micel·la de caseïna, com demostren els canvis de terbolesa de la llet (Schmidt i Koops, 1977). En efecte, la pressurització causa la disgregació de la micel·la en fragments més petits, descrits com a cadenes de submicel·les (Shibauchi i col., 1992). La disminució del diàmetre micel·lar està relacionada amb una major transmissió de la llum a través de la llet, amb la conseqüent pèrdua de blancor. La reducció de la mida micel·lar és progressiva, en funció de la pressió i el temps, fins a un màxim de 600 MPa, a partir del qual ja no s'hi observen canvis (Needs, 1998).

Els tractaments per alta pressió afavoreixen la hidratació de les micel·les (Gaucheron i col., 1997), per l'efecte directe del tractament en els components de la micel·la, afavorint la ionització de grups terminals, per canvis en l'exposició dels aminoàcids o per difusió de l'aigua a l'interior de cavitats hidrofòbiques de la micel·la (Johnston i col., 1992; Masson, 1992). Lògicament, l'agregació de la β -lactoglobulina o d'altres proteïnes sèriques sobre la superfície micel·lar també incrementarà la capacitat d'hidratació.

En aquest treball, la disgregació de la micel·la de caseïna caprina per alta pressió a 20 °C s'estudià mitjançant la quantificació de les caseïnes en el sobrenedant de llet ultracentrifugada, i per microscòpia electrònica. En els tractaments a 45 °C, i utilitzant les mateixes tècniques, s'observà una forta agregació de les caseïnes amb la formació d'estructures d'una mida gran, especialment en tractaments de 300 i 400 MPa durant 10 minuts. Aquest efecte d'agregació també ha estat observat per altres autors en condicions similars en la llet de vaca (Buchheim i col., 1996; Gaucheron i col., 1997). Tant la disgregació de l'estructura micel·lar en pressuritzar a 20 °C, com l'agregació en tractar a 300-400 MPa i 45 °C, tenen efectes sobre les propietats de la llet. En el primer cas, la reducció de la mida micel·lar s'associa a un increment de la velocitat de coagulació de la llet, en especial de la fase d'agregació (López-Fandiño i col., 1997). Per altra banda, també cal esmentar que la pressurització de la llet augmenta la rigidesa i disminueix la sinèresi dels gels àcids obtinguts (Johnston i col., 1993). En els tractaments que incrementen la mida micel·lar, l'efecte en les propietats funcionals esmentades és oposat (Martínez-Cuevas, 1998). En aquest cas, es dedueix que tant la disminució de la velocitat de coagulació com la baixa consistència dels gels estarà marcada més per les característiques de les estructures caseíniques formades (amb una proporció molt baixa de κ -caseïna), que no per la variació en el volum micel·lar.

L'anàlisi comparativa de les principals proteïnes làctiques en sobrenedants obtinguts per centrifugació en la llet de cabra tractada tèmicament, i per alta pressió a 20 °C i 45 °C, ens serveix per a estudiar les interaccions entre proteïnes. En els tractaments tèmics, el principal efecte observat es centra en l'agregació de les proteïnes sèriques quan s'incrementa la temperatura. L'agregació de les proteïnes sèriques sobre la superfície de les micel·les, tant en tractaments tèmics com per pressió, provoca una disminució de les caseïnes i estructures caseíniques en els sobrenedants a causa d'un increment de pes, que les fa més fàcilment separables per centrifugació. En el cas de la pressurització a 20 °C, aquest efecte és contrarestat per l'augment de caseïnes i estructures caseíniques no separables per centrifugació, fenomen que té el seu màxim exponent a 300 MPa. En el cas de tractaments a 45 °C, apareix igualment aquest fenomen, però al mateix temps s'observa la separació de β -caseïna, de α_{s1} -caseïna i de α_{s2} -caseïna en els tractaments en què es formen estructures caseíniques de gran diàmetre, mentre que la κ -caseïna se solubilitza o passa a formar part de petits agregats no separables en les condicions assajades.

4.2. ENLLAÇOS MOLECULARS

L'explicació dels fenòmens descrits en aquesta discussió és associada principalment a canvis en l'estructura de les proteïnes i la formació i al trencament d'enllaços entre aquestes molècules. En augmentar la pressió, les modificacions en l'estructura de les proteïnes que provoquen una reducció de volum es veuen afavorides segons el principi de Le Chatelier. Atès que les molècules d'aigua s'organitzen de forma més compacta quan estan en contacte amb zones hidrofòbiques que quan es relacionen amb zones hidrofíliques de la proteïna, l'alta pressió afavoreix l'orientació de parts hidrofòbiques cap a la fase aquosa. De la mateixa manera, la ionització de radicals d'aminoàcids afavoreix la formació d'una zona amb molècules d'aigua alineades de forma més compacta al seu voltant (Mozhaev i col., 1994). La presència de sals o sucres exerceix un efecte protector sobre les proteïnes davant els tractaments per alta pressió, probablement perquè, en lligar aigua, modulen els efectes en l'estructura (Dumay i col., 1998).

En el cas de la principal proteïna sèrica, la β -lactoglobulina, els canvis produïts per l'alta pressió es reflecteixen en un increment de la hidrofobicitat (Pittia i col., 1996) i en la separació del dímer β -lactoglobulina- β -lactoglobulina en formes monomèriques (Iametti i col., 1997). La proteïna modifica la seva estructura de forma irreversible per sobre d'un cert llindar de pressió que l'impedeix tornar a formar el dímer original, fet que afavoreix l'agregació amb altres β -lactoglobulines mitjançant la formació d'enllaços hidrofòbics i ponts disulfur (Funtenerger i col., 1997; Hoffmann i van Mil, 1997). En aquest procés apareixen agregats amb un nombre diferent de molècules (Funtenerger i col., 1995). Com s'ha comprovat en aquest treball, en determinades condicions les molècules de β -lactoglobulina poden interaccionar amb la α -lactalbúmina i, deduïm que probablement, també amb algunes de les caseïnes (κ -caseïna i α_{S2} -caseïna). Encara que en l'estabilitat dels agregats, els enllaços mitjançant ponts disulfur tenen el paper principal, les interaccions hidrofòbiques també hi participen, especialment afavorides per l'increment de zones hidrofòbiques exposades al solvent aquós. La progressiva disminució de la solubilitat de la β -lactoglobulina en funció del temps d'emmagatzematge després del tractament per alta pressió fa pensar, en un primer estadi on les interaccions són de caire hidrofòbic, en la posterior formació d'enllaços més estables, amb ponts disulfur, especialment a pH neutres o bàsics (Funtenerger i col., 1997).

Els fenòmens ocorreguts durant la pressurització d'estructures micel·lars es revelen més complexos. En la micel·la de caseïna els ponts salins amb fosfat càlcic i les interaccions hidrofòbiques actuen com a principals forces en el manteniment de l'estructura micel·lar. L'acidificació o l'addició de substàncies quelants de calci porten a la dissolució del fosfat càlcic micel·lar, amb la posterior desintegració de l'estructura micel·lar. L'addició de detergents o la disminució de temperatura (4 °C) debiliten els enllaços hidrofòbics i afavoreixen la disgregació micel·lar i la solubilització de les caseïnes, en especial de la β -caseïna. Kromkamp i col. (1996)

observaren que l'alta pressió provocava una forta disminució de la terbolesa de la llet (Figura 6). Una vegada disminueix la pressió, la terbolesa tendeix a recuperar-se però sense arribar al nivell inicial; d'això deduïm que després de la desintegració de l'estructura micel·lar, els components micel·lars tomen a organitzar-se de manera diferent de l'original.

Transmissió de la llum [u.a.]

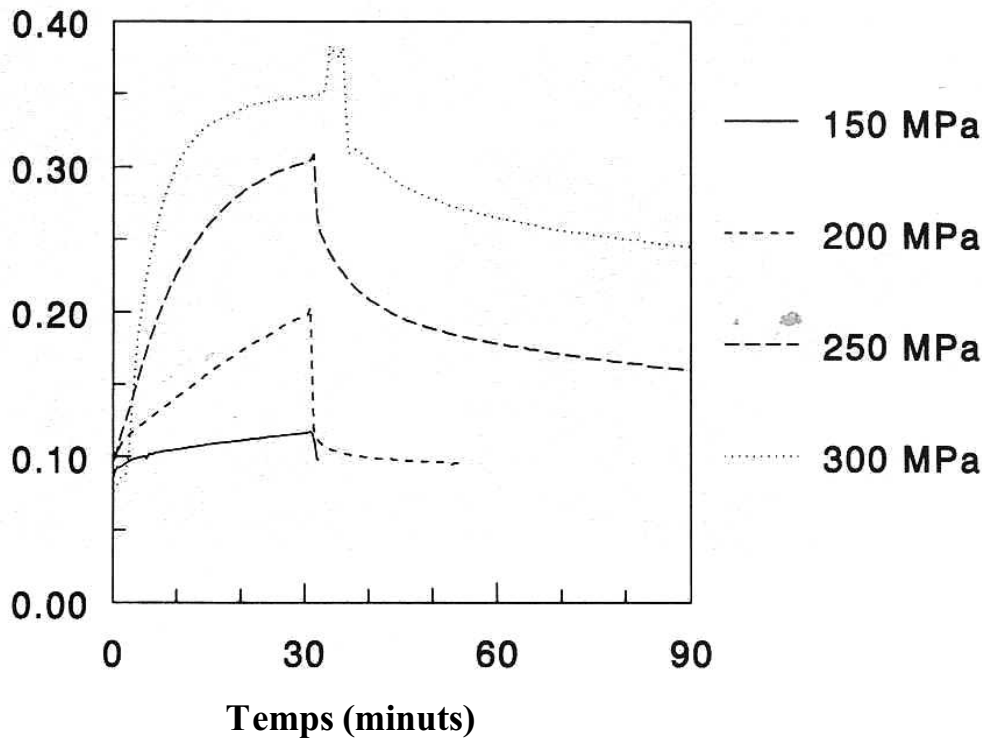


Figura 6. Esquema de disminució de la mida micel·lar en pressuritzar a temperatura ambient, segons Kromkamp i col. (1996).

La disponibilitat de calci en la fase soluble modula d'una manera important l'efecte disgregatiu de la pressió. En efecte, l'absència de calci en la fase soluble comporta una important disminució de la terbolesa d'una solució de caseïnat càlcic, mentre que l'increment de calci soluble neutralitza en part aquest canvi (Lee i col., 1996). En les llets concentrades el canvi de terbolesa produït per la pressurització és mínim. Els nivells de calci iònic de la llet no queden afectats de manera important de resultes de la pressurització (Johnston i col., 1992; Shibauchi i col., 1992), cosa que indica que en cas que es modifiqui l'equilibri existent entre calci iònic i calci col·loïdal, aquest canvi és reversible. El calci total en sobrenedant d'ultracentrifugat augmenta per la pressurització de la llet, però hem d'indicar que és associat a un increment de la quantitat de

caseïnes en el mateix sobrenedant, dada que també podem extreure dels treballs de Desobry-Banon i col. (1994) i Gaucheron i col. (1997). Cal assenyalar que aquestes proteïnes contenen un alt nombre de grups èster (López-Fandiño i col., 1998); per tant, se'n pot deduir una gran capacitat de lligar el calci present a la fase soluble.

La dissociació del fosfat càlcic micel·lar s'ha referit com una causa possible dels canvis de l'estructura micel·lar (Lee i col., 1996; Anema i col., 1997). Però cal assenyalar que, atès que el calci iònic present a la llet no varia substancialment en pressuritzar (de la Fuente i col., 1999), el fosfat càlcic dissolt pel tractament podria tornar a complexar-se en forma micel·lar en produir-se la descompressió, amb un tipus d'estructura diferent de la nativa, i probablement amb una pèrdua de les propietats originals (Famelart i col., 1997).

Les interaccions hidrofòbiques són, en part, responsables dels canvis de l'estructura micel·lar. L'augment de les caseïnes en el sobrenedant d'ultracentrifugat observat per nosaltres i especialment en tractaments amb una baixa desnaturalització de proteïnes sèriques (també descrit per López-Fandiño i col., 1998), ens fa deduir que els canvis a la micel·la es veuen induïts per diferents factors, més que per una simple disgregació de la micel·la per solubilització del fosfat càlcic. En aquest punt és interessant remarcar l'important efecte que té la temperatura de pressurització en la dimensió de la micel·la: a temperatura ambient o de refrigeració, veiem que la pressió actua com a força disgregadora mentre que a 45 °C afavoreix la formació de grans agregats.

Per a explicar els canvis de la dimensió de les micel·les en ser pressuritzades a una temperatura diferent, hem desenvolupat la següent hipòtesi: en tractar per alta pressió a temperatures de refrigeració, els enllaços hidrofòbics són febles i es produeix la disrupció de les interaccions hidrofòbiques i, per tant, de tota l'estructura micel·lar. En disminuir la pressió les caseïnes tendeixen a reorganitzar-se, però ho fan en funció de la facilitat que tenen d'associar-se. En aquestes condicions, la formació d'enllaços hidrofòbics és relativament feble i, encara que la superfície hidrofòbica exposada al solvent aquós està incrementada, l'agregació de les caseïnes segueix patrons semblants als que s'esdevenen a pressió atmosfèrica. En presència de calci iònic l'agregació de les caseïnes té lloc en estructures similars a les micel·les, amb la κ -caseïna com a estabilitzant respecte al calci, però amb una mida més petita que l'original. En canvi, a temperatures de 45 °C, la formació d'enllaços hidrofòbics entre les caseïnes es veu molt afavorida, cosa que provoca la creació de grans agregats de caseïnes amb molt volum i poca superfície de contacte amb la fase soluble. La proporció de κ -caseïna en aquests agregats és molt petita i, per tant, aquests agregats perden les característiques pròpies de la micel·la (estabilitat en el medi aquós).

Segons Gaucheron i col. (1997), la principal causa de l'increment de la mida micel·lar en els tractaments esmentats anteriorment es deu a una agregació de la proteïna sèrica sobre la superfície micel·lar. Hem de comentar, però, que en la llet de cabra la formació de grans agregats de β -caseïna,

α_{s1} -caseïna i α_{s2} -caseïna no està associada a una disminució de les proteïnes sèriques del sobrenedant i, per tant, sembla lògic deduir que no es produeix una agregació de proteïnes sèriques sobre la superfície d'aquestes superestructures caseíniques. En aquest cas, el més probable és que les proteïnes sèriques interaccionin amb la κ -caseïna que roman a la fase soluble.

En tractaments a 45 °C, i si augmenta la pressió de tractament de 300 a 500 MPa, observem noves modificacions en el patró d'agregació de les caseïnes. En aquestes condicions, tomem a observar una disgregació de la micel·la en submicel·les i ja no apareixen superestructures caseíniques. Hem de comentar aquí* l'elevat grau de desnaturalització de la proteïna sèrica, que pot impedir la formació de grans estructures caseíniques observades a pressions de tractament més baixes.

D'acord amb Lee i col. (1996), les forces electrostàtiques també tenen el seu paper en els canvis d'estructura micel·lar observats en els tractaments per pressió. Segons els mateixos autors, en tractar solucions de caseïnat càlcic a pH 6 s'observa un efecte disgregador molt menor que quan el tractament es fa a pH 7. A un pH àcid, les proteïnes perden la càrrega elèctrica i les forces electrostàtiques de repulsió es redueixen. En aquestes condicions, l'agregació de les caseïnes que s'esdevé en la despressurització pot estar modulada per la intensitat de les forces electrostàtiques de repulsió existents: febles a un pH baix, amb la formació d'agregats d'una mida més gran, i fortes a un pH alt, amb la formació d'estructures caseíniques d'una mida més petita.

5. CONCLUSIONS

Primera

La sensibilitat a l'agregació de les proteïnes sèriques caprines, utilitzant cromatografia en gel, és diferent segons si es tracta de processament tèrmic de pasteurització o per alta pressió fins a 500 MPa, amb temperatures de tractament entre 20 i 50 °C. En el primer cas, l'ordre de sensibilitat és: immunoglobulines > seralbúmina > β -lactoglobulina > α -lactalbúmina. En pressuritzar, però, l'ordre és: β -lactoglobulina > immunoglobulines > seralbúmina > α -lactalbúmina.

Segona

El patró d'agregació de la β -lactoglobulina és diferent en sotmetre la llet a alta pressió o a calor. En el primer cas, es descriuen per primera vegada la formació d'agregats solubles, formats únicament per β -lactoglobulina si el tractament es fa a 25 °C, o amb molècules de α -lactalbúmina si es fa a 50 °C. La quantitat i el pes molecular dels agregats depenen de la pressió i temperatura de tractament.

Tercera

Atesa l'elevada quantitat de β -lactoglobulina present a la llet de cabra, la seva desnaturalització irreversible provoca una pèrdua considerable de la solubilitat del conjunt de les proteïnes sèriques a partir de 300 MPa, fins a un màxim del 50 % de la proteïna agregada a 500 MPa i 25 °C durant 10 minuts. L'increment de la pressió o la temperatura de tractament afavoreix l'agregació proteica.

Quarta

Probablement, i a similitud dels tractaments tèrmics, en aplicar tractaments per alta pressió a la llet, es produeix una interacció entre les proteïnes sèriques i les caseïnes amb la formació d'agregats d'alt pes molecular. Així ho indica la observació de que la disminució de les caseïnes del lactoserum i la pèrdua de solubilitat de les proteïnes sèriques segueix el mateix patró.

Cinquena

La pressurització de la llet de cabra provoca la modificació de l'estructura de la micel·la de caseïna. En tractaments a 20 °C, es produeix una disgregació amb la formació posterior de cadenes de submicel·les. La disminució de la mida micel·lar depèn de la pressió de tractament a 20 °C. A 45 °C i 300-400 MPa, apareixen estructures caseíniques de gran diàmetre, amb una proporció molt baixa de κ -caseïna i de proteïnes sèriques. En augmentar la pressió de tractament, aquestes estructures no són observades per microscòpia electrònica.

Sisena

El tipus de complex caseínic resultant de la pressurització de la llet de cabra a 20 o 45 °C depèn d'un equilibri entre la facilitat de formació d'enllaços hidrofòbics, potenciats per l'exposició de grups hidròfobs cap a la fase aquosa, i la presència de calci iònic en la fase soluble de la llet. La intensitat amb què actuen aquests paràmetres depèn de la temperatura de tractament.

Setena

En tots els tractaments assajats, es comprova que les concentracions de fòsfor i calci total en el lactoserum obtingut per ultracentrifugació de la llet pressuritzada estan directament relacionades amb la quantitat de caseïna del mateix lactoserum, per la qual cosa podem assumir que es troben amb algun tipus d'associació.

Vuitena

L'anàlisi per cromatografia en gel de les proteïnes sèriques en lactoserum acidificat a pH 4,6, com que posa en evidència la formació d'agregats de proteïna sèrica específics dels tractaments per alta pressió, es mostra com un mètode vàlid per a detectar el tipus de tractament aplicat a la llet i, per tant, per a ser utilitzat com a indicador dels tractaments per alta pressió.

6. BIBLIOGRAFIA

- Addapa S., K. A. Schmidt i R. Toledo (1997). Funcional properties of skim milk processed with continous high pressure throttlng. *J. Dairy Sci.*, 80, 1941-1948.
- Addeo F. i R. Mauriello (1988). A gel electrophoretic study of caprine casein. *J. Dairy Res.*, 55, 413-421.
- Alichanidis E., J.H.M. Wrathall i A.T. Andrews (1986). Heat plasmin (milk proteinase) and plasminogen. *J. Dairy Sci.*, (69), 259-269.
- Anema S.G., S.K Lee, K. Schrader i W. Buchheim (1997). Effect of pH on the turbidity of pressure-treated calcium caseinate suspensions and skim milk. *Milchwissenschaft*, 52 (3), 141-146.
- Angersbach A. i D. Knorr (1997). High intensity electric field pulses as pretreatment for affecting dehydration characteristics and rehydration properties of potatoe cubes. *Nahrung*, 41, 194-200.
- Angsupanich K. i D.A. Ledward (1998). The effects of high pressure lipid oxidation in fish. *Book of Abstracts of the 35th Meeting on High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry of the EHPRG*, Reading, U.K.,284-288.
- Armstrong J. McD., K.E. Hopper, A. McKenzie i W.H. Murphy (1970). On the column chromatography of bovine whey proteins. *Bioch. Biophy. Acta*, 214, 419-426.
- Bajpai A.K. i M.P. Gupta (1979). Studies on heat induced destabilization of caprine whey proteins. *Indian J. Dairy Sci.*, 32(1), 62-67.
- Banks J.M. (1988). Elimination of the development of bitter flavour in Cheddar chese made from milk containing heat-denatured whey protein. *J. Soc. Dairy Tech.*, 41, 37-41.
- Balny C. i P. Masson (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9(4), 611-628.
- Barsotti L. i J.C. Cheftel (1999). Traitement des aliments par champs électriques pulsés.2.- Aspects biologiques. *Sciences des Aliments*, 19, 3-33.
- Bindith O., J.L. Cordier i R. Jost (1996). Cross-flow microfiltration of skim milk: germ reduction and effect on alkaline phosphatase and serum proteins. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels, 222-231.
- Bivar Roseiro M^a. L. i M. Barbosa (1995). Phosphatase activity levels in pasteurized goat's milk. *J. of the Society of Dairy Tech.*, 48 (1), 9-12.
- Bora K., J. Singh i G.K. Goyal (1989). Effect of pasteurization on some physico-chemical properties of goat's milk. *Egyptian J. Dairy Sci.* 17:53-61.
- Buchheim W., K. Schrader, C.V. Morr, E. Frede i M. Schütt (1996). Effects of high pressure on the protein, lipid and mineral phase of milk. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels. 202-213.
- Capellas M. (1998). Aplicación de la alta presión hidrostática en mató (queso fresco de leche de cabra). *Tesi doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.
- Carretero C., M. Mor-Mur, R. Pla i B. Guamis (1992). SDS-PAGE study of pH 4,6 soluble proteins during ripening of goat milk cheese. *Milchwissenschaft*, 47(5), 292-295.

- Cheah P.B. i D.A. Ledward (1996). High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Sci.*, 43(2), 123-134.
- Cheftel J. C. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. *En: High Pressure and Biotechnology*, 195-210. (Eds.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven.
- Cheftel J.C. (1995). Revisión: Alta-presión, inactivación microbiológica y conservación de alimentos. *Food Sci. and Tech. International*, 1, 75-90.
- Código Alimentario Español y disposiciones complementarias (1997). Leches y derivados. Editorial Tecnos, SA (Madrid). 120-121.
- Cosseddu, A.M. i S. Pisanu (1979). Electrophoretic fractionation of goat whey produced in Sardegna. *Arch. Veterinario Ital.*, 30, 78-81.
- Dagleish D.G., Horne D.S. i A.J.R. Law (1989). Size-related differences in bovine casein micelles. *Bioch. Biophys. Acta*, 991, 383-387.
- Dall'Olio S., R. Davoli i M. Tedeschi (1988). A contribution to the study of goat casein by chromatography. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia*, 39(3), 167-178.
- de Frutos M., A. Cifuentes, L. Amigo, M. Ramos i J.C. Díez-Masa (1992). Rapid analysis of whey proteins from different animal species by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Z. Leben. Unters. Forsch.*, 195, 326-331.
- de Jong P., R. Waalewijn i H.J.L.J. van der Linden (1994). Performance of a steam-infusion plant for heating of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 48, 181-199.
- de la Fuente M.A., A. Olano, V. Casal i M. Juárez (1999). Effects of high pressure and heat treatment on the mineral balance of goat's milk. *J. Dairy Res.*, 66, 65-72.
- Desobry-Banon S., F. Richard i J. Hardy (1994). Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *J. Dairy Sci.*, 77, 3267-3274.
- Dofour E., G. Hui Bon Hoa i T. Haertlé (1994). High-pressure effects on β -lactoglobulin interactions with ligands studied by fluorescence. *Bioch. Biophys. Acta*, 1206, 166-172.
- Dörnenburg H. i D. Knorr (1993). Cellular impermeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotech.*, 7, 35-48.
- Donnelly W.J., G.P. McNeill, W. Buchheim i T.C.A. McGann (1984). A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. *Bioch. Biophys. Acta*, 789, 136-143.
- Dumay E. i J.C. Cheftel (1989). Heat treatment of β -lactoglobulin concentrate at slightly alkaline pHs. Effects on the solubility and the chromatographic behaviour of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. *Sci. Aliments*, 9 (3), 561-582
- Dumay E., M.T. Kalichevsky i J.C. Cheftel (1998). Characteristics of pressure-induced gels of β -lactoglobulin at various times after pressure release. *Leben. -Wiss. u.-Tech.*, 31, 10-19.
- Dunn J., T. Ott i W. Clark (1995). Pulsed-light treatment of food and packaging. *Food Tech.*, 9, 95-98.

- Dunn J. (1996). Pulsed light and Pulsed electric field for foods and eggs. *Poultry Sci.*, 75 (9), 1133-1136.
- Elaamadi L., G. Turcotte i J. Goulet (1996). High-pressure homogenization of skim milk containing *Pseudomonas Fluorescens*. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels. 104-125
- Famelart M.H., F. Gaucheron, F. Mariette, Y. Le Graet, K. Raulot i E. Boyaval (1997). Acidification of pressure-treated milk. *Int. Dairy Journal*, 7, 325-330.
- Felipe Cuyàs X., A.J. Trujillo Mesa, E. Sendra Nadal i B. Guamis López (1994). Utilización de los tratamientos por alta presión en la conservación de alimentos. *Alimentaria*, 256, 35-39.
- Felipe X., M. Capellas i A.J.R. Law (1997). Comparison of the effects of high-pressure treatments and heat pasteurization on the whey proteins in goat's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3), 627-631.
- Felipe X. i A.J.R. Law (1997). Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. *J. Dairy Res.*, 64, 459-464.
- Fox P.F. i M.C.T. Hoynes (1976). Heat stability characteristics of ovine, caprine and equine milks. *J. Dairy Res.*, 43, 433-442.
- Fredsted L.B., G. Rysstad i T. Eie (1996). Pure-lac™: the new milk with protected freshness and extended shelf life. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels. 104-125
- Fryer P. (1995). Electrical resistance heating of foods. *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. 205-235.
- Funtenberger S., E. Dumay i J.C. Cheftel (1995). Pressure-induced aggregation of β -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Leben-Wiss. U.-Tech.*, 28, 410-418.
- Funtenberger S., E. Dumay i J.C. Cheftel (1997). High pressure promotes β -lactoglobulin aggregation through SH/S-S interchange reactions. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 912-921.
- Galazka V., D.A. Ledward, I.G. Sumner i E. Dickinson (1997). Influence of high pressure on bovine serum albumin and its complex with dextran sulfate. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3465-3471.
- Gaucheron F., M.H. Famelart, F. Mariette, K. Raulot, F. Michel i Y. Le Graet (1997). Combined effects of temperature and high pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chem.*, 59(3), 439-447.
- Gay M.F., G. Jaubert i S. Saboureau (1993). Incidence des traitements technologiques sur la qualité hygiénique du lait et des fromages de chèvre à pâte molle. *Lait*, 73, 499-509.
- Gervilla R., X. Felipe, V. Ferragut i B. Guamis (1997). Effect of high hydrostatic pressure of different microorganisms inoculated into ewe's milk. *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, K. Heremans (Ed.). Leuven University Press, Leuven, Belgium. 287-290.
- Gillissen X. i S. Carlson (1952). *Cr. Acad. Sci. Paris*. 234, 1494.
- Glaeser H. (1996). Alternative methods: legal and control aspects. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels. 438-447.

- Grosclaude F, M.F. Mahé, G. Brignon, L. Di Statio i R. Jeunet (1987). A Mendelian polymorphism underlying quantitative variation of goat α_{s1} -casein. *Génét. Sél. Evol.*, 19, 399-412.
- Gross M. i R. Jaenicke (1994). Review. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.*, 221, 617-630.
- Haque Z. i J.E. Kinsella (1988). Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *J. Dairy Res.*, 55, 67-80.
- Hashimoto E.M. i L.A. Forti-Antunes (1992). Effects of thermal treatment in the desnaturation of goat's β -lactoglobulin. *Arq. Biol. Tecnol.* 35(3), 543-556.
- Hayakawa I., J. Kajihara, K. Morikawa, M. Oda i Y. Fujio (1992). Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals. *J. Food Sci.*, 57 (2), 288-292.
- Hayashi R. (1987). Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology. *En: High Pressure and Biotechnology*. C.Balny, R. Hayashi, K. Heremans i P. Masson Eds; Colloques INSERM, John Libbey Eurotext: Montrouge, France, Vol. 224, 185-193.
- Hayashi R., Y. Kawamura i S. Kunugi (1987). Introduction of high pressure to food processing: preferential proteolysis of β -lactoglobulin in milk whey. *J. Food Sci.*, 52, 1107-1108.
- Hill A.R. i Y. Kakuda (1990). Size exclusion chromatography of caprine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 45(4), 207-210.
- Hoffmann M.A.M i P.J.J.M. van Mil (1997). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2942-2948.
- Howlett J.R., A.A. Ismail, D.W. Armstrong i P.T.T. Wong (1992). Pressure-induced conformational changes in an antigen and an antibody and the implications on their use for hyperbaric immunoadsorption. *Bioch. Biophys. Acta*, 1159, 227-236.
- Iametti S., P. Transidico, F. Bonomi, G. Vecchio, P. Pittia, P. Rovere i G. Dall'Aglio (1997). Molecular modifications of β -lactoglobulin upon exposure to high pressure. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 23-29.
- Jannes, R. (1982). Inter-species comparison of milk proteins. *Developments in Dairy Chemistry. I. Proteins*. Fox P.F. ed.; Applied Science Publishers, Londres, U.K., 87-114.
- Jaubert A. i P. Martín (1992). Reverse-phase HPLC analysis of goat caseins. Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. *Lait*, 72, 235-247.
- Jaubert G. i P. Schuck (1996). La poudre de lait de chèvre, une alternative ou report sous forme congelée. *Rev. des ENIL*, 196, 18-21.
- Jegouic M., V.Y. Grinberg, A. Guingant i T. Haertlé (1997). Baric oligomeritacion in α -lactalbumin/ β -lactoglobulin mixtures. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 19-22.
- Jensen J.A. (1996). Recent developments in direct and indirect UHT systems. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels. 44-50.

- Johnston D.E., B.A. Austin i R.J. Murphy (1992). Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft*, 47 (12), 760-763.
- Johnston D.E., B.A. Austin i R.J. Murphy (1993). Properties of acid-set gels prepared from high pressure treated skim milk. *Milchwissenschaft*, 48(4), 206-209.
- Juárez M., M. Ramos i C. Martín-Hernández (1991). *Quesos españoles de leche de cabra*. FESLAC, Madrid.
- Kalichevsky M.T., D. Knorr i P.J. Lillford (1995). Potential food applications of high pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Sci. and Tech.*, 6, 253-259.
- Kastanas P., M.J. Lewis i A.S. Grandison (1996). Comparison of heat exchanger performance for goat and cow milk. *Production and utilization of ewe & goat milk*, IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels, Belgium. 221-230.
- Khandelwal O.P. i M.P. Gupta (1980). Thermal denaturation of goat milk whey proteins. *Indian J. Dairy Sci.*, 33(1), 13-16.
- Kiesner Chr., W. Hoffmann, I. Clawin-Rädecker, U. Krusch, H. Neve i W. Buchheim (1996). Application of direct heating systems for the production of high pasteurized milk. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels, Belgium. 171-201.
- Knorr D., M. Geulen, T. Grahl i W. Sitzmann (1994). Food application of high electric field pulses. *Trends Food Sci. Tech.*, 5, 71-75.
- Kromkamp J., R.M. Moreira, L.P.M. Langeveld i P.J.J.M. Mil (1996). Microorganisms in milk and yoghurt: selective inactivation by high hydrostatic pressure. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels, Belgium. 266-271.
- Kunugi S. (1992). Enzyme reactions under high pressure and their applications. *Annals New York Academy of Sciences/ Enzyme Engineering XI*, 672, 293-304.
- Larkin J.W. i S.H. Spinak (1996). Safety considerations for ohmically heated, aseptically processed, multiphase low-acid food products. *Food Technol.*, 50 (5), 242-245
- Larsen P.H. (1996). Microfiltration for pasteurized milk. *Heat treatments & alternative methods*. IDF. 41, Square Vergote, B-1030 Brussels. 232-239.
- Law A.J.R. (1995a). The composition and properties of bovine, caprine and ovine milk proteins. *Thesis*. Hannah Research Institute, Escócia.
- Law A.J.R. (1995b). Heat denaturation of bovine, caprine and ovine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 50 (7), 384-388.
- Law A.J.R., J. M. Banks, D.S. Horne, J. Leaver i I.G. West (1994a). Denaturation of the whey proteins in heated milk and their incorporation into Cheddar cheese. *Milchwissenschaft*, 49 (2), 63-67.
- Law A.J.R. i J.R. Brown (1994). Compositional changes in caprine whey proteins. *Milchwissenschaft*, 49(12), 674-678.

- Law A.J.R., D.S. Horne, J.M. Banks i J. Leaver (1994b). Heat-induced changes in the whey proteins and caseins. *Milchwissenschaft*, 49 (3), 125-129.
- Law A.J.R., J. Leaver, J.M. Banks i D.S. Horne (1993). Quantitative fractionation of whey proteins by gel permeation FPLC. *Milchwissenschaft*, 48, 663-666.
- Law A.J.R., J. Leaver, X. Felipe, V. Ferragut, R. Pla i B. Guamis (1998). Comparison of the effects of high pressure and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (7), 2523-2530.
- Law A.J.R. i A. Tziboula (1992). Quantitative fractionation of caprine casein by cation-exchange FPLC. *Milchwissenschaft*, 47 (9), 558-562.
- Law A.J.R. i A. Tziboula (1993). Fractionation of caprine κ -casein and examination of polymorphism by FPLC. *Milchwissenschaft*, 48 (2), 68-71.
- Lee S.K., S.G. Anema, K. Schrader i W. Buchheim. (1996). Effect of high hydrostatic pressure on Ca-caseinate systems. *Milchwissenschaft*, 51 (1), 17-21.
- Le Jaouen J.C. i J.A. Kurmann (1995). *Report on food in the year 2000 current trends and current aspects of goat and ewe dairy products*. Bull. of IDF, 304, 50-55.
- Le Mens (1991). Parte III. La leche de Cabra. Propiedades físico-químicas, nutricionales y químicas. *Leche y productos lácteos. I. La leche, de la mama a la lechería*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, 343-360.
- Leistner L. (1995). Principles and applications of hurdle technology. *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. 1-21.
- López M.B., M.J. Botet, P. Hellín, A. Luna i J. Laencina (1995). Effect of thermal treatment on goat clotting time. *Milchwissenschaft*, 50(3), 126-129.
- López-Fandiño R., A.V. Carrascosa i A. Olano (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *J. Dairy Sci.*, 79, 929-936.
- López-Fandiño R., M. Ramos i A. Olano (1997). Rennet coagulation of milk subjected to high pressures. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3233-3237.
- López-Fandiño R. i A. Olano (1998). Cheese-making properties of ovine and caprine milks submitted to high pressures. *Lait*, 78 (3), 341-350.
- López-Fandiño R., M.A. de la Fuente, M. Ramos i A. Olano (1998). Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. *J. Dairy Res.*, 65, 69-78.
- Luquet, F.M. (1985). *Les laits: de la mamelle a la laiterie. Laits et Produits Laitiers, Vache, Brevis, Chèvre*. ed. APRIA, París.
- Manji B., A. Hill, Y. Kakuda i D.M. Irvine (1985). Rapid separation of milk whey proteins by anion exchange chromatography. *J. Dairy Sci.*, 68, 3176-3179.
- Martín-Hernández, M.C., M. Juárez, M. Ramos i P.J. Martín-Alvarez (1988). Composición de la leche de cabras de razas Murciana-Granadina. *Anal. Bromatol.*, 40, 237-248.

- Martínez-Cuevas V. (1998). Contribución al estudio de la funcionalidad de la leche de oveja tratada por altas presiones en la elaboración y características del yogurt. *Treball de recerca*. C.E.R. Planta de Tecnologia dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.
- Masson P. (1992). Pressure denaturation of proteins. *En: High Pressure and Biotechnology*. C.Balny, R. Hayashi, K. Heremans i P. Masson Eds; Colloques INSERM, John Libbey Eurotext: Montrouge, France, 89-100.
- Mertens B. (1993a). Developments in high hydrostatic pressure food processing. *ZFL*, 44 (4), 182-187.
- Mertens B. (1993b). Packing aspects of high-pressure food processing technology. *Packaging Techn. and Sci.*, 6, 31-36.
- Mertens B. (1995). Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. 135-158.
- Mertens B. i G. Deplace (1993). Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. *Food Tech.*, 47(6),164-169.
- Mikkelsen J., P. Højrup i J. Knudsen (1987). Purification of goat's milk casein by reversed-phase high-performance liquid chromatography and identification of α_{s1} -casein. *J. Dairy Res.* 54, 361-367.
- Miyama K., S. Sakakibara i T. Okamoto (1992). High pressure treatment of polished rice for Sake brewing: properties of pressurized rice as a raw material. *En: High Pressure and Biotechnology*, (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson. John Libbery Eurotext, Montrouge. 357-360.
- Montilla A., E. Balcones, A. Olano i M.M. Calvo (1995). Influence of heat treatments on whey protein denaturation and rennet clotting properties of cow's and goat's milk. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1908-1911.
- Montilla A. i M.M. Calvo (1997). Goat's milk stability during heat treatment: effect of pH and phosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 931-934.
- Mora-Gutiérrez A., T.F. Kumosinsky i H.M. Farrell (1991). Quantification of α_{s1} -casein in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds using reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, 74, 3303-3307.
- Morr C.V. (1967). Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated milk skim milk casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 50, 1744-1751.
- Mottar J., A. Bassier, M. Joniau i J. Baert (1989). Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *J. Dairy Sci.*, 72, 2247-2256.
- Mozhaev V.V., K. Heremans, J. Frank, P. Masson i C. Balny (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *TIBTECH*, 12, 493-501.
- Mullin J. (1995). Microwave processing. *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional. Glasgow. 112-134.
- Needs E. (1998). Institute of Food Research, Reading, U.K.. Comunicació personal.

- O'Connor P. i P.F. Fox (1993). Temperature dependent dissociation of casein micelles from the milk of various species. *Neth. Milk Dairy J.* 27: 199-217.
- Olson D.G. (1998). Irradiation of food. *Food Techn.*, 52(1), 56-62.
- Pascual A., M. Gisbert, D. Tomas i N. López (1997a). Aplicación de los ultrasonidos en tecnología de la carne y productos cárnicos. I. *Alimentación, equipos y tecnología*, junio, 75-79.
- Pascual A., M. Gisbert, D. Tomas i N. López (1997b). Aplicación de los ultrasonidos en tecnología de la carne y productos cárnicos. II. *Alimentación, equipos y tecnología*, septiembre, 63-66.
- Pierre A., G. Brule, J. Fauquant i M. Piot (1977). Influence des traitements thermiques sur les propriétés physicochimiques des retentats obtenus par ultrafiltration de lait de vache et de lait de chèvre. I. Denaturation des proteines solubles. *Lait*, 569-570, 646-662.
- Pierre A., F. Michel i Y. Le Graet (1995). Variation in size of goat milk casein micelles related to casein genotype. *Lait*, 75, 489-502.
- Pittia P., P.J. Wilde, F.A. Husband i D.C. Clark (1996). Functional and structural properties of β -lactoglobulin as affected by high pressure treatment. *J. Food Sci.*, 61 (6), 1123-1128.
- Quin B., U.R. Pothakamury, H. Vega, O. Martín, G.V. Barbosa-Cánovas i B.G. Swanson (1995). Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Tech.*, 49 (12), 55-60.
- Recio I., M.L. Pérez-Rodríguez, L. Amigo i M. Ramos (1997). Study of the polymorphism of caprine milk caseins by capillary electrophoresis. *J. Dairy Res.* , 64 (4), 515-523.
- Remeuf F., J. Lenoir i C. Duby (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. *Lait*, 69:499-518.
- Richardson B.C. i L.K. Creamer (1974). Comparative micelle structure. III. The isolation and chemical characterization of caprine b_1 -casein and b_2 -casein. *Bioch. Biophys. Acta*, 365:133-136.
- Robinson R.K. i I. Vlahopoulou (1988). Goat's milk utilisation for fermented milk products. *Dairy Ind. Intern.*, 53(12), 33-35.
- Rüegg M., U. Moor i B. Blanc (1977). A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *J. Dairy Res.*, 44, 509-520.
- Sala F.J., J. Burgos, S. Condón, P. López i J. Raso. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, U.K., 176-204.
- Schmidt D.G. i J. Koops (1977). Properties of artificial casein micelles. 2 Stability towards ethanol, dialysis, pressure. *Neth. Milk Dairy J.*, 31: 342-357.
- Sendra E., M. Capellas, B. Guamis, X. Felipe, M. Mor-Mur i R. Pla (1996). Revisión: irradiación de alimentos.- Aspectos generales. *Food Sci. and Tech. Intern.*, 2, 1-11.
- Shibauchi Y., H. Yamamoto i Y. Segara (1992). Conformational change of casein micelles by high pressure treatment. *En: High Pressure and Biotechnology*, (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson. John Libbery Eurotext, Montrouge. Vol 224, 239-242.

- Sitzmann W. (1995). High-voltage pulse techniques for food preservation. *New methods of food preservation*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, U.K., 236-252.
- Smits P. i J.H. van Brouwershaven (1980). Heat-induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.*, 47, 313-325.
- Storry J.E., A.S. Grandison, D. Millard, A.J. Owen i G.D. Ford (1983). Chemical composition and coagulating properties of rennet milks from different breeds and species of ruminant. *J. Dairy Res.*, 50, 215-229.
- Suzuki K. (1960). Studies on the kinetics of protein denaturation under high pressure. *The Review of Physical Chemistry of Japan*, 29 (2), 49-56.
- Tanaka N. i S. Kunugi (1996). Effect of pressure on the deuterium exchange reaction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macrom.*, 18, 33-39.
- Tanaka N., Y. Tsurui, I. Kobayashi i S. Kunugi (1996). Modification of the single unpaired sulfhydryl group of β -lactoglobulin under high pressure and the role of intermolecular S-S exchange in the pressure denaturation. *Int. J. Biol. Macrom.*, 19, 63-68.
- Tonello C., A. Largeteau, F. Jolibert, A. Deschamps i G. Demazeau (1992). Pressure effect on microorganisms and immunoglobulins of bovine colostrum. *En: High Pressure and Biotechnology*. C.Balny, R. Hayashi, K. Heremans i P. Masson Eds; Colloques INSERM, John Libbey Eurotext: Montrouge, France, Vol. 224, 249-254.
- Trujillo A.J., V. Ferragut, R. Gervilla, M. Capellas i B. Guamis (1997a). High hydrostatic pressure effects on milk and milk products. *Recent Res. Devel. in Agricultural & Food Chem.*, 1. Research Signpost, Trivandrum, India
- Trujillo A.J., B. Guamis i C. Carretero (1997b). Las proteínas mayoritarias de la leche de cabra. *Alimentaria*, 285, 19-28.
- Trujillo A.J., C. Royo, B. Guamis i V. Ferragut (1999). Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft*, 54 (4), 197-199.
- Tsiklis, D. S.(1968). *Handbook of Techniques in High-Pressure Research and Engineering*. Plenum Press, New York.
- Villamiel M., R. López-Fandiño i A. Olano (1997). Microwave pasteurization of milk in a continuous flow unit. Effects on the cheese-making properties of goat's milk. *Milchwissenschaft*, 52(1), 29-32.
- Van Kamp J. (1996). High hydrostatic pressure-induced denaturation, aggregation, and gel formation of food proteins. Tesi Doctoral. Universitat de Gent.
- Visser S., C.J. Slangen, i H.S. Rollema (1991). Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 548, 361-370.
- Walstra P. (1990). On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 73, 1965-1979.
- Wallander J.F., G.F.W. Haenlein i A.M. Swanson (1967). Heat induced protein interactions of goat milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 50(6), 942.

Waugh D.F. i R.W. Noble (1965). Casein micelles. Formation and structure II. *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 2246-2257.

Williams D.J., S.M. Nottingham, M. Fetroff i S.J. Veldhoven (1991). Annual variation of alkaline phosphatase activity in goat's milk and its effect on the detection of unpasteurised milk. *The Australian J. Dairy Techn.*, Novembre, 69-71.

Zadow J.G., F.J. Hardham, H.R. Kocak i J.J. Mayes (1986). The stability of goat's milk to UHT processing. *Australian J. of Dairy Techn.*, March, 20-23.

Zasytkin D.V., E. Dumay i J.C. Cheftel (1996). Pressure-and heat-induced gelation of mixed β -lactoglobulin/xanthan solutions. *Food Hydrocolloids*, 10, 203-211.