



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado Industrial

Mejora en la calidad del puré de tomate y gazpacho mediante  
tratamientos con altas presiones hidrostáticas.  
Aprovechamiento integral del subproducto de gazpacho

Autor:

Manuel Ballesta de los Santos

Directores:

Dra. D<sup>a</sup>. María Isabel Fortea Gorbe

Dr. D. Sergio Ariel Streitenberger Jacobi

Dra. D<sup>a</sup>. Adela Abellán Guillén

Murcia, Mayo de 2020





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado Industrial

Mejora en la calidad del puré de tomate y gazpacho mediante  
tratamientos con altas presiones hidrostáticas.  
Aprovechamiento integral del subproducto de gazpacho

**Autor:**

Manuel Ballesta de los Santos

**Directores:**

Dra. D<sup>a</sup>. María Isabel Fortea Gorbe  
Dr. D. Sergio Ariel Streitenberger Jacobi  
Dra. D<sup>a</sup>. Adela Abellán Guillén

Murcia, Mayo de 2020





**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**  
**PARA SU PRESENTACIÓN**

La Dra. D<sup>a</sup>. María Isabel Fortea Gorbe, el Dr. D. Sergio Ariel Streitenberger Jacobi y la Dra. D<sup>a</sup>. Adela Abellán Guillén como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Mejora en la calidad del puré de tomate y gazpacho mediante tratamientos con altas presiones hidrostáticas. Aprovechamiento integral del subproducto de gazpacho” realizada por D. Manuel Ballesta de los Santos en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autorizan su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, en Murcia a 29 de Mayo de 2020.

Dra. D<sup>a</sup>. María Isabel Fortea Gorbe

Dr. D. Sergio Ariel Streitenberger Jacobi

Dra. D<sup>a</sup>. Adela Abellán Guillén



## RESUMEN

Existe una necesidad actual en la industria agroalimentaria de investigar y conocer las actividades enzimáticas en los alimentos y su implicación en el deterioro de los mismos. Por este motivo, en la primera fase de la tesis doctoral, fueron extraídas y caracterizadas las enzimas peroxidasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa de tomate. Una vez caracterizadas, fue escogida la peroxidasa como enzima modelo y se realizaron incubaciones con diferentes temperaturas, combinaciones de temperaturas frente a pH, y combinaciones de temperaturas/pH frente a ciclos de altas presiones hidrostáticas, obteniéndose las mejores condiciones para su inactivación en puré de tomate. En la segunda fase de la tesis doctoral, se desarrollaron estudios de vida útil en puré de tomate y gazpacho aplicando las mejores condiciones de inactivación enzimática encontradas con POD. En la tercera fase de la tesis doctoral, se obtuvieron subproductos de gazpacho que fueron analizados e incorporados en la formulación de grisines.

**Palabras clave:** altas presiones hidrostáticas, biotecnología de alimentos.

## ABSTRACT

There is a real need in the agrifood industry to investigate and understand the enzymatic activities in food and their involvement in the deterioration of food. For this reason, in the first phase of the doctoral thesis, were lengths and characterized the enzymes peroxidase, pectinmethylsterase and tomato polygalacturonase. Once characterized, it was chosen peroxidase as a model enzyme and incubations were performed with different temperatures, combinations of temperatures versus pH, and combinations of temperatures/pH versus cycles of high hydrostatic pressures, obtained for inactivation in tomato puree. In the second phase of the doctoral thesis, life studies in tomato puree and gazpacho were generated applying the best enzymatic inactivation conditions found with POD. In the third phase of the doctoral thesis, gazpacho deer were by-products that analyze those incorporated in the formulation of grisines.

**Key words:** high hydrostatic pressures, food biotechnology.



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Católica de Murcia y AMC INNOVA que hayan confiado tanto en mí durante este tiempo y me hayan facilitado con enorme generosidad y respeto el poder desarrollar esta tesis doctoral.

Me siento profundamente afortunado de haber tenido como directores a Isabel, Sergio y Adela. Es sobrehumana la paciencia y el cariño con el que me habéis tratado (mucho más del que me merezco), sin vuestra dirección, consejos y apoyo no hubiera durado ni un solo día, por ello, de corazón gracias, gracias y gracias.

A Marí Cruz, por su ternura, por su generosidad, por ayudarme tanto, por esa paciencia infinita que le viene del cielo, gracias.

Que puedo decir de Pablo y Teresa, salvo que me habéis rescatado en los momentos más oscuros, vuestro consejo ha sido como un rayo de luz en medio de la oscuridad que me ha animado a seguir. Esto tiene muchísimo de vosotros, sin vosotros me hubiera quedado estancando y sin avanzar; solo puedo daros las gracias. Ojala algún día pueda tratar a alguien con el amor y generosidad con el que me habéis tratado. Simplemente gracias.

A mis compañero/as de la UCAM y AMC, quiero daros las gracias por enseñarme, por tener paciencia, por ayudarme tantísimo, por escucharme. Por los buenos ratos, y los no tan buenos, me han ayudado mucho. A José Manuel y María, habéis sido muy importantes para mí durante este tiempo, ojala podamos seguir en contacto toda la vida. Al resto de mis compañeros, Pellicer, gracias por enseñarme y ayudarme, Juan Cas, Javi, Juan y Elena; María, Gabi, José, gracias y mil gracias.

Quiero dar las gracias a mi familia, por su amor y paciencia durante este tiempo, imagino que no habrá sido fácil aguantarme estos años, pero al final con perseverancia y oración todo se consigue. A mis abuelos, os quiero muchísimo, a mis tíos y primos, a mis hermanicos y a mis padres, por haberme resucitado tantas veces. Ojala algún día pueda ser tan buen padre como lo habéis sido para mí. Os quiero muchísimo.

A mi mujer, lo máspreciado que tengo, tú eres mi verdadera tesis, mi amor y mi vida, gracias cariño.

Señor, tú lo sabes todo, tú sabes que te quiero, esto es por ti, es por tu gloria.

María, tú lo empezaste, en tus manos lo dejo, gracias.



## ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en el siguiente trabajo:

- **Ballesta, M.,** Streitenberger, S., Arcas, M., Pellicer, J., Abellán, A., & Fortea, M. (2019). Kinetic characterization, thermal and pH inactivation study of peroxidase and pectin methylesterase from tomato (*Solanum betaceum*). *Food Science and Technology* (Campinas). Doi: <https://doi.org/10.1590/fst.09419>. (ESTADO ACTUAL: DISPONIBLE EN PRENSA).

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **Manuel Ballesta de los Santos;** Chiachi Woo; María de la Cruz Arcas Miñarro; Sergio Streitenberger Jacobi; María Isabel Fortea Gorbe; Adela Abellán Guillén. *Caracterización Nutricional y Aprovechamiento Integral de Subproductos del Gazpacho para Panificación*. V Jornadas de Investigación y Doctorado: Ciencia sin Fronteras, 2019, Murcia, España.
- **Manuel Ballesta de los Santos;** María de la Cruz Arcas Miñarro; Sergio Streitenberger Jacobi; María Isabel Fortea Gorbe; Adela Abellán Guillén. *Study of Inactivation by Combination of Temperature and pH for Peroxidase (POD) and Pectin methylesterase (PME) from Tomato*. IX Food Brokerage Event y IX Symposium Internacional de la Conserva, 2019, Murcia, España.
- **Manuel Ballesta de los Santos;** María de la Cruz Arcas Miñarro; Sergio Streitenberger Jacobi; María Isabel Fortea Gorbe; Adela Abellán Guillén. *Nuevas técnicas de desactivación enzimática en bebidas. Un aprovechamiento de los subproductos obtenidos en panadería*. III Jornadas de Investigación y Doctorado: Reconocimiento de los Doctores en el Mercado Laboral, 2017, Murcia, España.



## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>21</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>23</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>37</b>
1.1. INDUSTRIA AGROALIMENTARIA .....	37
1.2. ZUMO/PURÉ DE TOMATE Y GAZPACHO .....	38
1.3. CALIDAD EN PURÉ DE TOMATE Y GAZPACHO .....	41
1.3.1. Causas de las alteraciones en la calidad .....	42
1.3.2. Factores inductores en la velocidad degradativa de la calidad .....	43
1.4. CONSERVACIÓN DE ZUMOS/PURÉS Y BEBIDAS VEGETALES MEDIANTE TECNOLOGÍAS TÉRMICAS .....	44
1.4.1. Pasteurización convencional o tratamiento térmico (TT, Thermal treatment) .....	44
1.4.2. Calentamiento por microondas (MH, Microwave Heating) .....	46
1.4.3. Calentamiento óhmico (OH, Ohmic Heating) .....	47
1.4.4. Calentamiento por radiofrecuencia (RH, Radiofrequency Heating) ....	48
1.5. CONSERVACIÓN DE ZUMOS/PURÉS Y BEBIDAS VEGETALES MEDIANTE TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS .....	49
1.5.1. Radiación ultravioleta C (UVC, Ultraviolet Radiation C) .....	50
1.5.2. Campos de pulsos eléctricos (PEF, Pulse Electric Fields) .....	51
1.5.3. Pulsos lumínicos (LP, Light Pulses) .....	52
1.5.4. Plasma frío (CP, Cold Plasma) .....	53
1.5.5. Ultrasonidos (US, Ultrasound) .....	54
1.5.6. Altas presiones hidrostáticas o procesamiento por altas presiones (HPP, High Pressure Processing) .....	56
1.5.6.1. Fundamentos y equipo de tratamiento por altas presiones hidrostáticas .....	56
1.5.6.2. Efecto de altas presiones hidrostáticas en alimentos .....	59
1.5.6.2.1. Efecto de altas presiones hidrostáticas en productos y derivados lácteos .....	59

1.5.6.2.2. Efecto de altas presiones hidrostáticas en productos cárnicos .	60
1.5.6.2.3. Efecto de altas presiones hidrostáticas en pescados y mariscos	60
1.5.6.2.4. Efecto de altas presiones hidrostáticas en ovoproductos .....	61
1.5.6.2.5. Efecto de altas presiones hidrostáticas en zumos/purés y bebidas vegetales .....	61
1.5.6.3. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre microorganismos .....	62
1.5.6.4. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre la composición de alimentos .....	65
1.5.6.4.1. Agua .....	66
1.5.6.4.2. Lípidos .....	66
1.5.6.4.3. Carbohidratos .....	67
1.5.6.4.4. Vitaminas .....	67
1.5.6.4.5. Proteínas .....	68
1.5.6.5. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre enzimas .....	68
1.5.6.5.1. Inhibición enzimática inducida por presión .....	69
1.5.6.5.2. Activación enzimática inducida por presión .....	69
1.5.6.5.3. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre peroxidasa (POD)	70
1.5.6.5.4. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre polifenoloxidasas (PPO) .....	71
1.5.6.5.5. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre lipooxigenasa (LOX) .....	73
1.5.6.5.6. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre pectinmetilesterasa (PME) .....	73
1.5.6.5.7. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre poligalacturonasa (PG) .....	75
1.5.6.5.8. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -GL) .....	76
1.6. APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA .....	77
1.6.1. Aprovechamiento y valoración integral de subproductos .....	77
1.6.2. Importancia nutricional del subproducto de gazpacho .....	78
1.6.2.1. Importancia nutricional del subproducto de tomate .....	80
1.6.2.2. Importancia nutricional del subproducto de pimiento .....	81

1.6.2.3. Importancia nutricional del subproducto de pepino .....	82
1.6.2.4. Importancia nutricional del subproducto de cebolla .....	83
1.6.2.5. Importancia nutricional del subproducto de ajo .....	85
1.6.3. Utilización de subproductos .....	86
1.6.3.1. Aplicación de subproductos en panadería .....	86
<b>CAPITULO II: OBJETIVOS .....</b>	<b>89</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>91</b>
<b>CAPITULO III: MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>93</b>
<b>3. Material y Método .....</b>	<b>95</b>
3.1. PLAN DE TRABAJO .....	95
3.2. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL PURÉ DE TOMATE, GAZPACHO, SUBPRODUCTO DEL GAZPACHO Y GRISINES A BASE DE LOS SUBPRODUCTOS DEL GAZPACHO .....	97
3.2.1. Elaboración del puré de tomate .....	97
3.2.2. Formulación y elaboración del gazpacho .....	98
3.2.3. Elaboración de los subproductos del gazpacho .....	100
3.2.4. Formulación y elaboración de grisines a base de los subproductos del gazpacho .....	101
3.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS Y ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS .....	104
3.3.1. Tratamientos térmicos .....	104
3.3.2. Altas presiones hidrostáticas .....	105
3.4. ANÁLISIS ENZIMÁTICO .....	106
3.4.1. Actividad peroxidasa .....	106
3.4.1.1. Extracción de peroxidasa .....	106
3.4.1.2. Medición de la actividad peroxidasa .....	106
3.4.1.3. pH óptimo de peroxidasa .....	106
3.4.1.4. Caracterización cinética de peroxidasa .....	107
3.4.1.5. Estabilidad térmica de peroxidasa .....	107
3.4.1.6. Efectos del pH y temperatura sobre la actividad peroxidasa .....	107
3.4.1.7. Efectos del pH/temperatura y las altas presiones hidrostáticas sobre la actividad peroxidasa .....	107

---

3.4.2. Actividad pectinmetilesterasa .....	108
3.4.2.1. Extracción de pectinmetilesterasa .....	108
3.4.2.2. Medición de la actividad pectinmetilesterasa .....	108
3.4.2.3. pH óptimo de pectinmetilesterasa .....	109
3.4.2.4. Caracterización cinética de pectinmetilesterasa .....	109
3.4.2.5. Estabilidad térmica de pectinmetilesterasa .....	109
3.4.2.6. Efectos del pH y temperatura sobre la actividad pectinmetilesterasa .....	109
3.4.3. Actividad poligalacturonasa .....	110
3.4.3.1. Extracción de poligalacturonasa .....	110
3.4.3.2. Medición de la actividad poligalacturonasa .....	110
3.4.3.3. Caracterización cinética de poligalacturonasa .....	111
3.5. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO .....	111
3.5.1. pH .....	111
3.5.2. Sólidos solubles totales .....	111
3.5.3. Ácidos titulables totales (acidez) .....	111
3.5.4. Contenido en pulpa .....	112
3.5.5. Parámetros de color .....	112
3.5.6. Azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) .....	113
3.5.7. Nivel de vitamina C .....	113
3.5.8. Determinación de compuestos fenólicos totales .....	114
3.5.9. Determinación de la capacidad antioxidante .....	114
3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	115
3.6.1. Mohos y levaduras .....	115
3.6.2. Bacterias acidófilas .....	115
3.6.3. Coliformes totales .....	116
3.6.4. <i>E. coli</i> .....	116
3.6.5. <i>Salmonella spp.</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	116
3.6.6. Mesófilos aerobios totales .....	117
3.7. ANÁLISIS SENSORIAL .....	117
3.7.1. Análisis instrumental de la textura en los grisines .....	118
3.8. ANÁLISIS NUTRICIONAL .....	119
3.8.1. Humedad .....	119
3.8.2. Grasa .....	119

3.8.3. Carbohidratos .....	120
3.8.4. Proteínas .....	120
3.8.5. Fibra bruta .....	121
3.8.6. Materia seca .....	121
3.8.7. Cenizas .....	121
3.8.8. Valor energético .....	122
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	122
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>125</b>
4.1. “CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y ESTUDIOS ENZIMÁTICOS EN PURÉ DE TOMATE” .....	125
4.1.1. Caracterización cinética de peroxidasa en puré de tomate .....	125
4.1.2. Caracterización cinética de pectinmetilesterasa en puré de tomate .....	127
4.1.3. Caracterización cinética de poligalacturonasa en puré de tomate .....	129
4.1.4. Estabilidad térmica de peroxidasa y pectinmetilesterasa en puré de tomate .....	130
4.1.5. Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad peroxidasa y pectinmetilesterasa en puré de tomate .....	132
4.1.6. Efectos del pH y las altas presiones hidrostáticas sobre la actividad peroxidasa en puré de tomate .....	134
4.1.7. Efectos de la temperatura y las altas presiones hidrostáticas sobre la actividad peroxidasa en puré de tomate .....	137
4.2. “ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN PURÉ DE TOMATE: COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES COMBINACIONES DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS CON TRATAMIENTO TÉRMICO SUAVE, FRENTE A PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL” .....	141
4.2.1. Análisis enzimático del estudio de vida útil en puré de tomate .....	141
4.2.1.1. Actividad peroxidasa .....	141
4.2.1.2. Actividad pectinmetilesterasa .....	143
4.2.1.3. Actividad poligalacturonasa .....	144
4.2.2. Análisis físico-químico del estudio de vida útil en puré de tomate .....	146
4.2.2.1. pH .....	146
4.2.2.2. Sólidos solubles totales .....	147

4.2.2.3. Ácidos titulables totales (acidez) .....	149
4.2.2.4. Contenido en pulpa .....	150
4.2.2.5. Parámetros de color .....	151
4.2.2.6. Azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) .....	155
4.2.2.7. Nivel de vitamina C .....	157
4.2.2.8. Determinación de compuestos fenólicos totales .....	159
4.2.2.9. Determinación de la capacidad antioxidante .....	161
4.2.3. Análisis microbiológico del estudio de vida útil en puré de tomate ..	163
4.2.3.1. Mohos y levaduras .....	163
4.2.3.2. Bacterias acidófilas .....	166
4.2.3.3. Coliformes totales y <i>E. coli</i> .....	167
4.2.3.4. Mesófilos aerobios totales .....	168
4.2.4. Análisis sensorial del estudio de vida útil en puré de tomate .....	170
4.3. "ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN GAZPACHO: COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTO TÉRMICO SUAVE, ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA CON TRATAMIENTO TÉRMICO SUAVE Y PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL" ...	173
4.3.1. Análisis enzimático del estudio de vida útil en gazpacho .....	173
4.3.1.1. Actividad peroxidasa .....	173
4.3.2. Análisis físico-químico del estudio de vida útil en gazpacho .....	175
4.3.2.1. pH .....	175
4.3.2.2. Sólidos solubles totales .....	176
4.3.2.3. Ácidos titulables totales (acidez) .....	177
4.3.2.4. Contenido en pulpa .....	178
4.3.2.5. Parámetros de color .....	179
4.3.2.6. Azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) .....	184
4.3.2.7. Nivel de vitamina C .....	187
4.3.2.8. Determinación de compuestos fenólicos totales .....	189
4.3.2.9. Determinación de la capacidad antioxidante .....	190
4.3.3. Análisis microbiológico del estudio de vida útil en gazpacho .....	193
4.3.3.1. Mohos y levaduras .....	193
4.3.3.2. Bacterias acidófilas .....	195
4.3.3.3. Coliformes totales y <i>E. coli</i> .....	196
4.3.3.4. Mesófilos aerobios totales .....	199

---

4.3.4. Análisis sensorial del estudio de vida útil en gazpacho .....	200
4.4. "CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LOS SUBPRODUCTOS DEL GAZPACHO PARA PANIFICACIÓN" .....	203
4.4.1. Análisis físico-químico de los subproductos del gazpacho .....	203
4.4.1.1. pH .....	203
4.4.1.2. Nivel de vitamina C .....	204
4.4.2. Análisis microbiológico de los subproductos del gazpacho .....	205
4.4.3. Análisis nutricional de los subproductos del gazpacho .....	206
4.4.3.1. Humedad .....	206
4.4.3.2. Grasa .....	207
4.4.3.3. Carbohidratos .....	209
4.4.3.4. Proteínas .....	210
4.4.3.5. Fibra bruta .....	211
4.4.3.6. Materia seca .....	212
4.4.3.7. Cenizas .....	213
4.4.3.8. Valor energético .....	214
4.4.4. Aplicación de los subproductos del gazpacho en panificación (grisines) .....	215
4.4.4.1. Análisis nutricional de los grisines .....	215
4.4.4.2. Análisis de la textura en los grisines .....	218
4.4.4.3. Análisis microbiológico de los grisines .....	220
4.4.4.4. Análisis sensorial de los grisines .....	220
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES .....</b>	<b>223</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>225</b>
<b>CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>227</b>
<b>6. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>229</b>
<b>CAPÍTULO VII: ANEXOS .....</b>	<b>261</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>263</b>



---

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

**ABTS:** 2,2'- azino-bis-3 ethilbenzothiazolina-6-sulfónico.

**AECOSAN:** Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.

**$\beta$ -GL:**  $\beta$ -glucosidasa.

**BOE:** Boletín Oficial del Estado.

**CP:** Plasma frío.

**ETSIAMN:** Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrónoma y del Medio Natural.

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**HPP:** Altas presiones hidrostáticas.

**HMF:** Hidroximetilfurfural.

**IFU:** International Fruit and Vegetables Juice Association.

**ISO:** International Standarization Organization.

**LP:** Pulsos de luz.

**LOX:** Lipooxigenasa.

**MH:** Calentamiento microondas.

**MPa:** Megapascales.

**N:** Newtons.

**OH:** Calentamiento óhmico.

**PEF:** Campos de pulsos eléctricos.

**PG:** Poligalacturonasa.

**PME:** Pectinmetilesterasa.

**POD:** Peroxidasa.

**PPO:** Polifenoloxidasa.

**RH:** Calentamiento por radiofrecuencia.

**SENC:** Sociedad Española de Nutrición Comunitaria.

**TPA:** Análisis del perfil de textura.

**TT:** Tratamiento térmico.

**UE:** Unión Europea.

**US:** Ultrasonidos.

**UVC:** Radiación ultravioleta C.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> <i>Plantación agrícola de tomate (Solanum lycopersicum)</i> .....	38
<b>Figura 1.2.</b> <i>Producción mundial de tomate (toneladas) en el año 2017</i> .....	39
<b>Figura 1.3.</b> <i>Estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en el tomate</i> .....	40
<b>Figura 1.4.</b> <i>Esquema del equipo de pasteurización industrial convencional</i> .....	45
<b>Figura 1.5.</b> <i>Equipo de pasteurización industrial por tecnología MH</i> .....	47
<b>Figura 1.6.</b> <i>Esquema del equipo de pasteurización industrial por tecnología OH</i> .....	48
<b>Figura 1.7.</b> <i>Esquema del equipo de pasteurización industrial por tecnología RH</i> .....	49
<b>Figura 1.8.</b> <i>Esquema del equipo de tratamiento industrial con tecnología UVC</i> .....	50
<b>Figura 1.9.</b> <i>Esquema del equipo de tratamiento industrial con tecnología PEF</i> .....	51
<b>Figura 1.10.</b> <i>Esquema del equipo de tratamiento con tecnología LP</i> .....	53
<b>Figura 1.11.</b> <i>Esquema del equipo de tratamiento con tecnología CP</i> .....	54
<b>Figura 1.12.</b> <i>Esquema del equipo de tratamiento industrial con tecnología US</i> .....	55
<b>Figura 1.13.</b> <i>Equipo de tratamiento industrial con tecnología HPP</i> .....	58
<b>Figura 1.14.</b> <i>Esquema del tratamiento de muestras por HPP</i> .....	58
<b>Figura 1.15.</b> <i>(A) Efecto del HPP sobre los componentes de la célula bacteriana. (B) Gráfica de reversibilidad/irreversibilidad de la célula bacteriana tras sufrir estrés por HPP</i> .....	63
<b>Figura 1.16.</b> <i>Estructuras celulares de E. coli y S. aureus sin tratar (a y b, respectivamente) y con HPP 500 MPa durante 30 min (a' y b', respectivamente)</i> .....	64
<b>Figura 1.17.</b> <i>Estructura 3D de POD de Armoracia rusticana</i> .....	70
<b>Figura 1.18.</b> <i>Estructura 3D de PPO de Solanum quitoense</i> .....	72
<b>Figura 1.19.</b> <i>Estructura 3D de LOX de Glycine max</i> .....	73
<b>Figura 1.20.</b> <i>Estructura 3D de PME de Dickeya dadantii</i> .....	74
<b>Figura 1.21.</b> <i>Estructura 3D de PG de Fusarium moniliforme</i> .....	75
<b>Figura 1.22.</b> <i>Estructura 3D de <math>\beta</math>-GL de Clostridium cellulovorans</i> .....	76
<b>Figura 1.23.</b> <i>Subproducto de gazpacho elaborado en el estudio</i> .....	79
<b>Figura 1.24.</b> <i>Subproducto de tomate elaborado en el estudio</i> .....	81
<b>Figura 1.25.</b> <i>Subproducto de pimiento elaborado en el estudio</i> .....	82
<b>Figura 1.26.</b> <i>Subproducto de pepino elaborado en el estudio</i> .....	83
<b>Figura 1.27.</b> <i>Subproducto de cebolla elaborado en el estudio</i> .....	84
<b>Figura 1.28.</b> <i>Subproducto de ajo elaborado en el estudio</i> .....	85
<b>Figura 3.1.</b> <i>Diagrama de flujo del plan de trabajo</i> .....	96

<b>Figura 3.2.</b> Evolución durante el almacenamiento de los envases con el puré de tomate (ajustado a pH 3,8) tratado según los tratamientos empleados en el <b>Apartado 4.2</b> .....	98
<b>Figura 3.3.</b> Evolución durante el almacenamiento de los envases con el gazpacho (ajustado a pH 4) tratado según los tratamientos empleados en el <b>Apartado 4.3</b> .....	100
<b>Figura 3.4.</b> Subproducto del gazpacho elaborado en el estudio, y subproductos constituyentes del mismo .....	101
<b>Figura 3.5.</b> Grisines elaborados en el estudio .....	104
<b>Figura 3.6.</b> Pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L .....	104
<b>Figura 3.7.</b> Equipo industrial Hiperbaric (Hiperbaric 135, Burgos, España) .....	105
<b>Figura 3.8.</b> Espacio de color CIELAB. Hunterlab Colorflex® (Hunterlab, Reston, Virginia, U.S.A) .....	113
<b>Figura 3.9.</b> Formulario para la evaluación sensorial del puré de tomate y gazpacho ( <b>imagen izquierda</b> ), y grisines ( <b>imagen derecha</b> ) .....	118
<b>Figura 3.10.</b> Sonda TA-PSFS-C utilizada para el análisis de los grisines ( <b>imagen izquierda</b> ). Método test utilizado en el texturómetro ( <b>imagen derecha</b> ) .....	118
<b>Figura 4.1.</b> Efecto del pH para la actividad POD, en presencia de 10 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y 3 mM de ABTS* .....	125
<b>Figura 4.2.</b> Efecto de la concentración del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para la actividad POD .....	126
<b>Figura 4.3.</b> Efecto de la concentración del ABTS* para la actividad POD .....	127
<b>Figura 4.4.</b> Efecto del pH para la actividad PME, en presencia de 10 mM de pectina ..	128
<b>Figura 4.5.</b> Efecto de la concentración de pectina en la actividad PME .....	129
<b>Figura 4.6.</b> Efecto en la concentración del ácido galacturónico para la actividad PG ...	130
<b>Figura 4.7.</b> Inactivación térmica de POD. Actividad residual (Log %) frente al tiempo de calentamiento con diferentes temperaturas (20-90 °C) .....	131
<b>Figura 4.8.</b> Inactivación térmica de PME. Actividad residual (Log %) frente al tiempo de calentamiento con diferentes temperaturas (20-90 °C) .....	132
<b>Figura 4.9.</b> Efecto sinérgico del pH y la temperatura para POD. Actividad residual (%) frente a temperatura con diferentes pH 2,5-4,5 .....	133
<b>Figura 4.10.</b> Efecto sinérgico del pH y la temperatura para PME. Actividad residual (%) frente a temperatura con diferentes pH 3,5-4,5 .....	134
<b>Figura 4.11.</b> Efecto sinérgico del pH y el HPP (1 ciclo) para POD. Actividad residual (%) frente a pH con diferentes HPP 400/500/600 MPa .....	135
<b>Figura 4.12.</b> Efecto sinérgico del pH y el HPP (3 ciclos) para POD. Actividad residual (%) frente a pH con diferentes HPP 400/500/600 MPa .....	136

- Figura 4.13.** Efecto sinérgico de la temperatura y el HPP (1 ciclo) para POD. Actividad residual (%) frente a temperatura con diferentes HPP 400/500/600 MPa ..... 138
- Figura 4.14.** Efecto sinérgico de la temperatura y el HPP (3 ciclos) para POD. Actividad residual (%) frente a temperatura con diferentes HPP 400/500/600 MPa ..... 139
- Figura 4.15.** Evolución de la actividad residual de POD (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 141
- Figura 4.16.** Evolución de la actividad residual de PME (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 143
- Figura 4.17.** Evolución de la actividad residual de PG (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 145
- Figura 4.18.** Evolución del valor de pH para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 147
- Figura 4.19.** Evolución en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 148
- Figura 4.20.** Evolución en el contenido de ácidos titulables totales (g ácido cítrico/100 mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 149

- Figura 4.21.** Evolución en el contenido de pulpa (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 150
- Figura 4.22.** Evolución en el contenido de glucosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 155
- Figura 4.23.** Evolución en el contenido de fructosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 156
- Figura 4.24.** Evolución en el contenido de vitamina C (mg/100 g) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 158
- Figura 4.25.** Evolución en el contenido de compuestos fenólicos totales (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 160
- Figura 4.26.** Evolución en la capacidad antioxidante (mM Trolox/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 162
- Figura 4.27.** Evolución del análisis sensorial para los atributos estudiados en las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado

*durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min ..... 171*

**Figura 4.28.** *Evolución de la actividad residual de POD (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 174*

**Figura 4.29.** *Evolución del pH para las muestras control y bajo tratamiento (ambas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 175*

**Figura 4.30.** *Evolución en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 177*

**Figura 4.31.** *Evolución en el contenido de ácidos titulables totales (g ácido cítrico/100 mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90°C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 178*

**Figura 4.32.** *Evolución en el contenido de pulpa (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 179*

**Figura 4.33.** *Evolución en el contenido de glucosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 185*

- Figura 4.34.** Evolución en el contenido de fructosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 185
- Figura 4.35.** Evolución en el contenido de vitamina C (mg/100 g) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 187
- Figura 4.36.** Evolución en el contenido de compuestos fenólicos totales (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 189
- Figura 4.37.** Evolución en la capacidad antioxidante (mM Trolox/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 191
- Figura 4.38.** Evolución del análisis sensorial para los atributos estudiados en las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min ..... 201
- Figura 4.39.** Valor del pH en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo ..... 203
- Figura 4.40.** Contenido de vitamina C (mg/100 g) en el subproducto de gazpacho y en algunos subproductos constituyentes del mismo ..... 204
- Figura 4.41.** Contenido de humedad (%) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo ..... 207
- Figura 4.42.** Contenido de grasa (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo ..... 208

---

<b>Figura 4.43.</b> <i>Contenido de carbohidratos (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo</i> .....	210
<b>Figura 4.44.</b> <i>Contenido de proteínas (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo</i> .....	211
<b>Figura 4.45.</b> <i>Contenido de fibra bruta (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo</i> .....	212
<b>Figura 4.46.</b> <i>Contenido de materia seca (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo</i> .....	213
<b>Figura 4.47.</b> <i>Contenido de cenizas (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo</i> .....	214
<b>Figura 4.48.</b> <i>Valor energético (KJ/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo</i> .....	215
<b>Figura 4.49.</b> <i>Análisis sensorial para los atributos estudiados en los grisines elaborados en el estudio</i> .....	221
<b>Figura 4.50.</b> <i>Imagen de los diferentes grisines elaborados en el estudio</i> .....	222



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> <i>Formulación del gazpacho elaborado en el estudio</i> .....	99
<b>Tabla 3.2.</b> <i>Formulación de los tres modelos de grisines elaborados en el estudio</i> .....	102
<b>Tabla 4.1.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico L* (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	151
<b>Tabla 4.2.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico a* (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	152
<b>Tabla 4.3.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico b* (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	153
<b>Tabla 4.4.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico <math>\Delta E^*</math> (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	154
<b>Tabla 4.5.</b> <i>Evolución en el contenido de sacarosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	157
<b>Tabla 4.6.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de mohos (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	164
<b>Tabla 4.7.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de levaduras (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	165
<b>Tabla 4.8.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de bacterias acidófilas (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	166
<b>Tabla 4.9.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de coliformes (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	167

<b>Tabla 4.10.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de E. coli (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	168
<b>Tabla 4.11.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de mesófilos aerobios totales (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	169
<b>Tabla 4.12.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico L* (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	180
<b>Tabla 4.13.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico a* (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	181
<b>Tabla 4.14.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico b* (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	182
<b>Tabla 4.15.</b> <i>Evolución del parámetro colorimétrico <math>\Delta E^*</math> (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	183
<b>Tabla 4.16.</b> <i>Evolución en el contenido de sacarosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	186
<b>Tabla 4.17.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de mohos (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	194
<b>Tabla 4.18.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de levaduras (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	194
<b>Tabla 4.19.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de bacterias acidófilas (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	196
<b>Tabla 4.20.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de coliformes (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil .....</i>	197

<b>Tabla 4.21.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de E. coli (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	197
<b>Tabla 4.22.</b> <i>Evolución en el recuento microbiológico de mesófilos aerobios totales (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	199
<b>Tabla 4.23.</b> <i>Recuento microbiológico de patógenos para los subproductos del gazpacho y subproductos constituyentes del mismo</i> .....	205
<b>Tabla 4.24.</b> <i>Composición nutricional de los grisines elaborados en el estudio</i> .....	216
<b>Tabla 4.25.</b> <i>Análisis de la textura para los grisines elaborados en el estudio</i> .....	219
<b>Tabla 4.26.</b> <i>Recuento microbiológico de los grisines elaborados en el estudio</i> .....	220
<b>Tabla 7.1.</b> <i>Evolución en la concentración de maltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	263
<b>Tabla 7.2.</b> <i>Evolución en la concentración de isomaltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	264
<b>Tabla 7.3.</b> <i>Evolución en la concentración de sorbitol (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	265
<b>Tabla 7.4.</b> <i>Evolución en la concentración de maltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	266
<b>Tabla 7.5.</b> <i>Evolución en la concentración de isomaltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	267
<b>Tabla 7.6.</b> <i>Evolución en la concentración de sorbitol (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil</i> .....	268



# **I - INTRODUCCIÓN**



## I - INTRODUCCIÓN

### 1.1. INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Los zumos/purés y bebidas vegetales están constituidos por frutas y verduras, siendo de los grupos de alimentos con mayor importancia en todas las dietas del mundo. Este grupo de alimentos contienen altas cantidades de antioxidantes (flavonoides, antocianinas, carotenoides, licopeno, glucosinolatos y saponinas), vitaminas (A, B1, B2, B3, B6, C, K y E), minerales (potasio, cloro, fósforo, calcio, azufre, magnesio, sodio, hierro, cobre, zinc, yodo, cobalto, manganeso, cromo, níquel y flúor) y ácidos grasos esenciales como los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 que tienen funciones bioactivas ayudando a prevenir enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares y distintos tipos de cánceres. Esta función anticancerígena y antioxidante se debe principalmente al efecto de los carotenoides, el licopeno y el  $\beta$ -caroteno presentes en el puré de tomate y gazpacho, que son capaces de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Nakamura y col., 2017).

En el mercado, existe una preferencia por los zumos/purés y bebidas vegetales frescos cultivados localmente, en temporada y procesados mínimamente (Plaza y col., 2006). El cambio que se está produciendo en los hábitos alimenticios, apostando por los productos sanos y de alta calidad nutricional obligan a la industria agroalimentaria a encontrar mejores formas de preservar las propiedades organolépticas y nutricionales, a la vez de garantizar la vida útil del producto (Mendoza y col., 2018). En el pasado, los sistemas de procesado de estos alimentos se basaban en la pasteurización convencional, utilizando altas temperaturas para eliminar microorganismos patógenos y enzimas indeseables que alteraban las propiedades organolépticas. Sin embargo, las altas temperaturas tienen efectos negativos en su composición, destruyendo los nutrientes que son importantes para la salud y el bienestar humano. Como consecuencia, la mayor parte de las investigaciones realizadas están relacionadas con la aplicación de tecnologías no térmicas que alteran mínimamente las propiedades organolépticas y nutricionales.

Entre las tecnologías no térmicas, destaca el procesamiento por altas presiones hidrostáticas (HPP). La tecnología HPP logra la muerte microbiana por inactivación de enzimas clave involucradas en reacciones bioquímicas y mecanismos genéticos, como la replicación y la transcripción del ADN (Marszałek

y col., 2019). El método HPP es uno de los métodos más comunes recientemente utilizados para el tratamiento a gran escala de zumos a base de frutas y verduras (San Martín, Barbosa-Cánovas, y Swanson, 2002).

Sin embargo, con el uso de esta nueva tecnología surgen algunos inconvenientes puesto que algunas enzimas como las peroxidases, pectinmetilesterasas y poligalacturonasas son altamente resistentes a las altas presiones (hasta 1000 MPa) (Eisenmenger y Reyes-De-Corcuera, 2009). De ahí el esfuerzo reciente de la tecnología de alimentos en comprender mejor las consecuencias a nivel bioquímico y nutricional del uso de estas nuevas tecnologías, para posteriormente optimizar las condiciones de los tratamientos, mejorando los parámetros organolépticos y nutricionales.

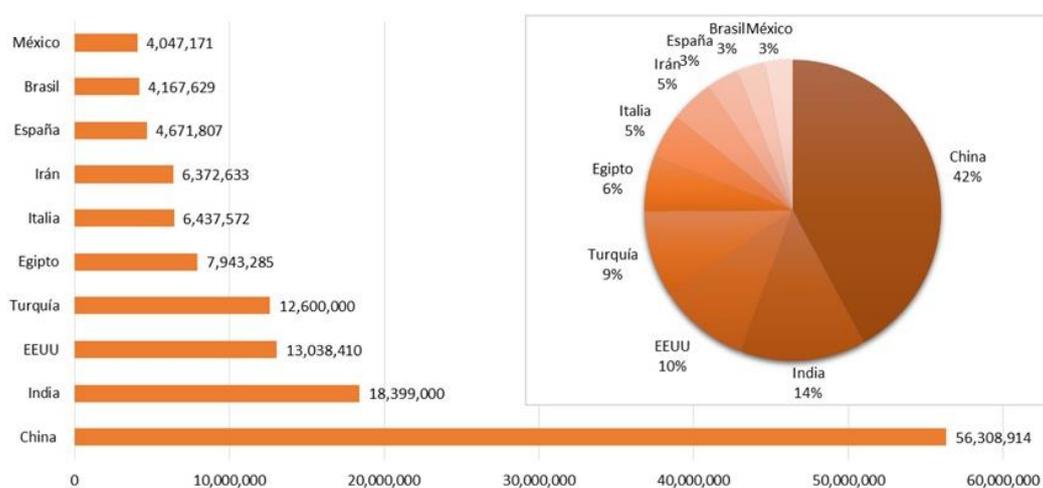
## 1.2. ZUMO/PURÉ DE TOMATE Y GAZPACHO

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las frutas con mayor distribución a nivel mundial y una fuente extraordinaria de azúcares, vitaminas y minerales. Es una especie de planta herbácea del género *Solanum* (familia Solanaceae); nativa de Centro y Sudamérica, y cuyo uso como comida se habría originado en México hace 2.500 años.



**Figura 1.1.** *Plantación agrícola de tomate (*Solanum lycopersicum*).*

En 2017, la producción mundial de tomate fue, según los datos de la FAO, de 177.042 millones de kilos; siendo China es el mayor productor mundial con 56.308 millones de kilos (**Figura 1.2**). La producción española se encuentra muy por debajo, con una producción de 4.671 millones de kilos de tomate, siendo Andalucía (2.300 millones de kilos), Extremadura (2.000 millones de kilos) y Murcia (211 millones de kilos) los mayores productores españoles.

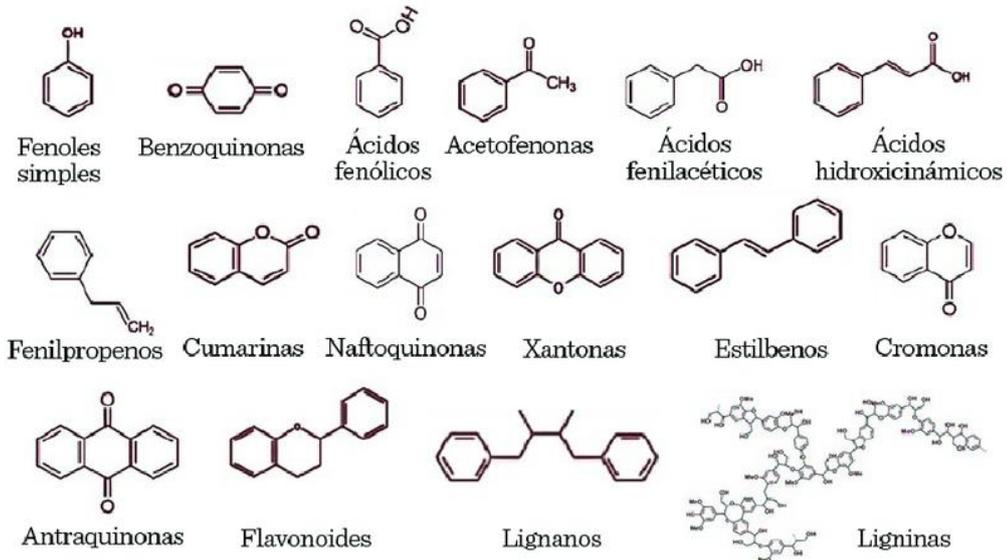


**Figura 1.2.** Producción mundial de tomate (toneladas) en el año 2017

(<http://www.fao.org/home/es/>).

Los principales compuestos antioxidantes en el tomate son los carotenoides, la vitamina C y los compuestos fenólicos. Contiene gran cantidad de carotenoides no provitamínicos, como el licopeno, responsable de su peculiar color y que además, es considerado un anticancerígeno natural frente a numerosos tipos de cáncer debido a sus propiedades antioxidantes (Jurado-Penagos y García-Perdomo, 2015).

La actividad antioxidante general de los tomates varía considerablemente según la variedad genética, la etapa de maduración y las condiciones de crecimiento (Toor y Geoffrey, 2005), y depende de numerosos compuestos polifenólicos presentes en el mismo (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Estructura química de los principales compuestos fenólicos presentes en el tomate.

Los azúcares solubles y los ácidos orgánicos son los principales componentes de los sólidos solubles totales que constituyen la base del tomate junto con las pectinas y fibras. Estos componentes y sus interacciones son importantes para la calidad del tomate y su procesado, puesto que condicionan la dulzura, la acidez y la intensidad del sabor.

Los tomates pueden ser consumidos crudos o procesados, usándose grandes cantidades para producir salsas, zumos y purés; y que proporciona minerales, vitaminas, color y sabor a los alimentos, mejorando el aspecto visual y palatabilidad (Barrett, Beaulieu y Shewfelt, 2010). Dado que son altamente perecederos por la elevada carga microbiana y enzimática que poseen, los productores están obligados a venderlos inmediatamente después de ser cosechados, produciendo una menor ganancia económica. Por ello, para aumentar la rentabilidad económica, el tomate se procesa y se comercializa, principalmente como zumo o puré, manteniendo así un suministro constante de tomates al mercado.

Entre los preparados de tomate elaborados en España encontramos el gazpacho, siendo además uno de los más conocidos. Se trata de un tipo de sopa fría típica de ciertas regiones de España que se consume mayoritariamente durante los meses estivales y en cuya composición abunda el tomate (éste representa alrededor

del 70% de sus componentes) y el 30% restante estaría constituido por pepino, pimiento, cebolla, ajo, aceite de oliva y sal.

Como se puede deducir de su formulación, el gazpacho constituye un alimento con un gran aporte de vitaminas y de variedad de antioxidantes aportados por la fruta y las hortalizas que lo componen. Además, es fuente de fibra dietética que le proporciona propiedades prebióticas derivadas sobre todo de los vegetales e incluye pectinas, gomas, mucílagos y polisacáridos de reserva (Verde-Méndez y col., 2011)

Por otro lado, también presenta una elevada concentración de sales minerales y azúcares, así como compuestos fenólicos y carotenoides que contribuyen al color y al sabor. Los compuestos fenólicos presentes poseen efectos antioxidantes, anticancerígenos y antienvjecimiento. Finalmente, la presencia de ajo entre sus componentes aporta propiedades antibacterianas muy importantes para la salud (Nicastro, Ross y Milner, 2015).

### 1.3. CALIDAD EN PURÉ DE TOMATE Y GAZPACHO

La calidad del puré de tomate o del gazpacho depende fundamentalmente de su frescura, aroma, consistencia y sabor. El auge industrial en los países desarrollados del procesado de estos productos se puede atribuir a un conjunto de actividades interrelacionadas, entre las que destacan el I+D+i, las técnicas de producción más eficientes y un procesado industrial más rápido. Por otro lado, para que la industria agroalimentaria obtenga productos diferenciados tiene que utilizar necesariamente materia prima de alta calidad. Para ello, han sido diseñados un conjunto de métodos analíticos que agilizan la recolección mecánica y optimizan su procesado industrial, a la vez que los hacen seguros para el consumidor. Entre los análisis más importantes que han sido utilizados tradicionalmente en el procesado del puré de tomate y gazpacho para evaluar la calidad, destacan la comprobación del nivel de maduración del fruto, la eliminación del pedúnculo, las características físicas de los frutos (color, firmeza, calibre y peso), y los relacionados con el tiempo y la calidad del almacenamiento en la planta. Además, los análisis físico-químicos (pH, acidez, color, azúcares totales, pulpa y sólidos solubles totales) y los análisis microbiológicos (coliformes y *E. coli*, mesófilos aerobios, bacterias acidófilas, mohos y levaduras) han resultado ser imprescindibles para evaluar las

distintas calidades y el procesado del puré de tomate y gazpacho, y habilitarlos como seguros para el consumidor (Kalamaki, Stoforos y Taoukis, 2006).

En los países desarrollados la innovación, la seguridad alimentaria y la sostenibilidad se han convertido en los principales hitos a cumplir en la industria agroalimentaria. Una forma sostenible de formular y desarrollar alimentos atrae eficazmente a los consumidores, proporciona una diferenciación frente a la competencia y se hace visible a los inversores. Por otro lado, innovar es fundamental para progresar y solventar los problemas que van desencadenándose, siempre que no se descuide la seguridad alimentaria, clave en la producción de alimentos. Se han desarrollado numerosas técnicas de conservación que actualmente siguen evolucionando para satisfacer los estándares actuales de preservación y seguridad, a la vez de satisfacer las demandas del consumidor contemporáneo (Obeng y col., 2018).

### **1.3.1. Causas de las alteraciones en la calidad**

Existen diversidad de factores que afectan negativamente y comprometen la seguridad y calidad de los alimentos. Las enzimas presentes en el puré de tomate y gazpacho frescos producen alteraciones como pardeamientos, alteración de las pectinas (pectinmetilesterasa y poligalacturonasa), alteración del almidón, degradación de vitaminas por oxidasas (vitamina C y vitamina B1) o degradación de pigmentos (peroxidasa). Además, algunos compuestos presentes en los alimentos reaccionan químicamente entre sí produciendo otros compuestos con olor y sabor desagradables, disminuyendo la calidad (Kalamaki, Stoforos y Taoukis, 2006).

Sin embargo, las alteraciones más importantes las producen los microorganismos presentes. De hecho, la alteración microbiológica tiene una importancia particular puesto que puede ser perjudicial para la salud del consumidor pudiendo producir graves infecciones. En la actualidad, el control microbiológico del puré de tomate y gazpacho tiene como objetivo ofrecer productos seguros, nutritivos y palatables, así como una vida útil rentable económicamente y a un coste razonable para el consumidor (Obeng y col., 2018).

### 1.3.2. Factores inductores en la velocidad degradativa de la calidad

El crecimiento microbiológico en el puré de tomate y gazpacho tiene su origen en el alto valor nutricional que presentan sus componentes. Sin embargo, no todos los alimentos resultan ser un buen medio para el desarrollo de microorganismos, puesto que dependen de diversos factores (humedad, pH, temperatura, oxígeno y tiempo) que condicionan su crecimiento (Mossel, Moreno y Struijk, 2005).

El primero de estos factores es la actividad del agua ( $a_w$ ). Este parámetro se refiere a la cantidad de agua libre, disponible para el crecimiento de microorganismos. Además, la actividad del agua condiciona la textura. De hecho, a una mayor actividad del agua, la textura es mucho más jugosa y tierna, sin embargo, el puré de tomate y gazpacho se altera más fácilmente.

Otro factor que determina el crecimiento microbiano es el pH. En general, las bacterias presentan un pH óptimo de crecimiento próximo a la neutralidad, sin embargo, la mayoría de las levaduras tienen un pH óptimo de crecimiento en valores que oscilan entre 3,5-4,5, mientras que los mohos presentan mayor flexibilidad respecto al pH, razón por la cual su crecimiento es tan elevado.

De igual modo, la temperatura es crucial en el crecimiento microbiano y además es el factor más determinante puesto que de ella depende todas las reacciones enzimáticas del metabolismo microbiano. La mayoría de los microorganismos crecen a temperaturas de entre 5-55 °C, aunque cada microorganismo se desarrolla dentro del rango propio de temperatura óptima en la cual su crecimiento es mayor (Jafari y col., 2017).

Otro factor que necesitan los microorganismos es el oxígeno, a pesar de que algunos no lo requieren, la mayoría dependen de él para su metabolismo y, por tanto, crecimiento.

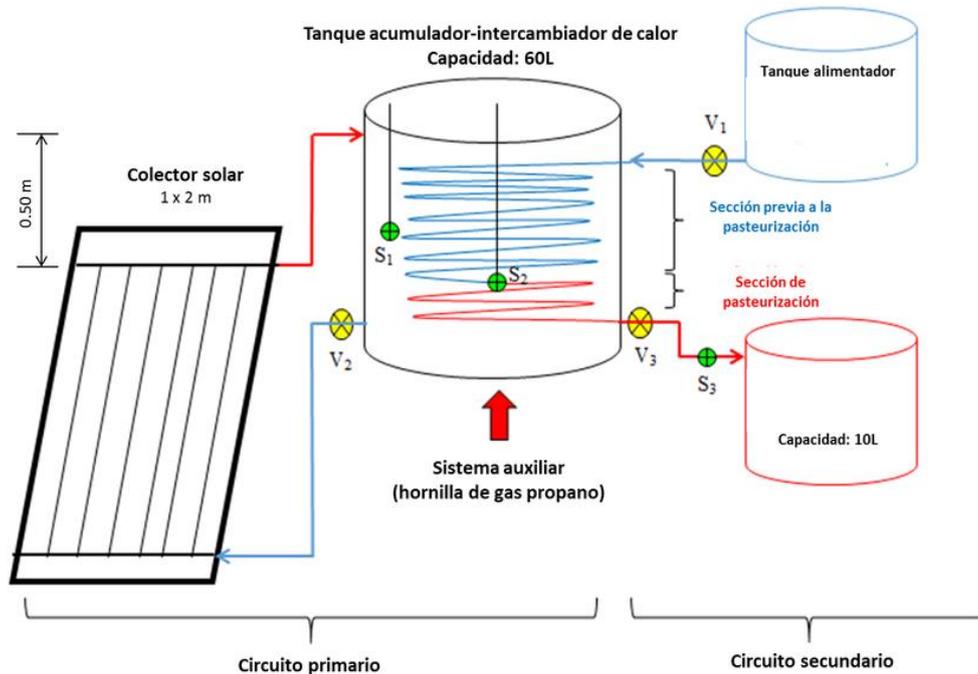
#### 1.4. CONSERVACIÓN DE ZUMOS/PURÉS Y BEBIDAS VEGETALES MEDIANTE TECNOLOGÍAS TÉRMICAS

La industria agroalimentaria tiene como objetivo principal la conservación de los alimentos para minimizar la pérdida cualitativa y asegurar la seguridad para el consumidor. Los microorganismos y las enzimas presentes de manera natural en las frutas y verduras frescas son los principales agentes causantes de la degradación. Por ello, su eliminación, inactivación o ralentización deben ser prioritarios para cualquier técnica de conservación.

Por otro lado, la estacionalidad y el carácter perecedero de frutas y verduras frescas obligan a aplicar técnicas de conservación para extender la vida útil del producto. Los tratamientos de conservación de los zumos/purés y bebidas vegetales tradicionales se basan en la aplicación del calor (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010). Este tipo de tratamiento resulta muy eficaz en la inactivación de microorganismos y enzimas alterantes, sin embargo, provoca cambios bioquímicos en los alimentos produciendo una pérdida nutritiva, organoléptica y funcional (Sánchez-Moreno y col., 2006; Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia y Martín-Belloso, 2008).

##### 1.4.1. Pasteurización convencional o tratamiento térmico (TT, Thermal treatment)

El TT o pasteurización convencional, llevada a cabo por primera vez en 1864 por el químico francés Louis Pasteur, es un proceso térmico aplicado en líquidos con la intención de reducir la presencia de los microorganismos presentes en los mismos hasta valores seguros. A pesar del choque térmico, el producto resultante tiene una vida útil limitada (Cardona-Gálvez, Díaz-Lorenzo y Morejón-Martí, 2008) y en algunos casos necesita un almacenamiento a temperaturas bajas (4 °C) (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4.** Esquema del equipo de pasteurización industrial

(<https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Diagrama-del-pasteurizador-LC-con-los-equipamientos-de-los-fig2290625625>).

El TT busca la eliminación total o por lo menos la reducción a niveles seguros de los microorganismos presentes en los alimentos. Para medir la eficacia del tratamiento y establecer una “curva de supervivencia térmica” de cada microorganismo, se utilizan parámetros como el “valor D” (“el tiempo necesario a una temperatura dada para reducir en un ciclo logarítmico una población bacteriana”) o el “valor Z” (“número de grados de temperatura durante los cuales se reduce en un ciclo logarítmico la carga bacteriana inicial”). Con estos valores se puede calcular y comparar la “letalidad” ( $F_0$ ) del tratamiento que se ha aplicado (Al-Baali, Abdul y Farid, 2006).

Además de los microorganismos, el TT afecta a las enzimas que degradan los alimentos. Sin embargo, las enzimas (polifenoloxidasas, peroxidasas, pectinmetilesterasas y poligalacturonas) presentes en zumos y purés de frutas y verduras son termorresistentes, por lo que el tiempo y la temperatura de exposición térmica tiene que elevarse hasta inactivar total o semitotalmente estas enzimas. Por este motivo, la temperatura de pasteurización de los zumos de naranja se encuentra

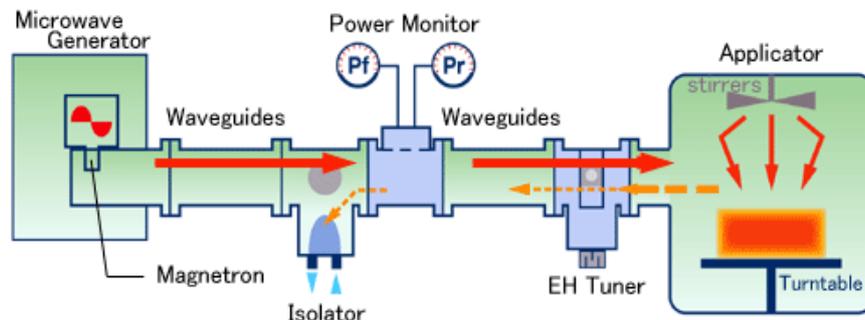
alrededor de 95 °C durante 20 s, a pesar de que tratamientos térmicos más suaves (85 °C durante 20 s) pueden inactivar los microorganismos y hacer seguro el zumo (Sentandreu y col., 2005).

Tradicionalmente, la mayoría de zumos/purés y bebidas vegetales conservados han sido procesados térmicamente a temperaturas elevadas durante pocos segundos. Al mismo tiempo, la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones de pardeamiento no enzimáticas (reacción de Maillard) y, como resultado, se produce una reducción en el valor nutritivo del producto. Por otro lado, los zumos/purés y bebidas vegetales cuando son tratados térmicamente pierden parcialmente las características organolépticas tales como el color, sabor y aroma debido a la pérdida de compuestos como los polifenoles, flavonoides, vitaminas, carotenoides, compuestos antioxidantes, etc. Cuando se pasteuriza, el sabor de la fruta sufre alteraciones debido a la aparición de compuestos tales como el hidroximetilfurfural (HMF) formado por la descomposición térmica de los azúcares (Shapla y col., 2018).

Según el tiempo y la temperatura de exposición térmica los zumos/purés y bebidas vegetales presentan mayor o menor grado de pérdidas nutritivas y organolépticas. Por este motivo, la mayor pérdida de nutrientes se produce durante el tratamiento térmico. No obstante, una vez finalizado el TT, estos alimentos van degradándose progresivamente durante el tiempo de almacenamiento por alteraciones microbiológicas y enzimáticas. Además, el tipo de envase, el pH y la concentración de oxígeno también influirán en la degradación del producto durante el almacenamiento (Ozen y col., 2001; Aganovic y col., 2017).

#### **1.4.2. Calentamiento por microondas (MH, Microwave Heating)**

El MH utiliza ondas electromagnéticas cuya frecuencia oscila entre 30-300 MHz del espectro electromagnético. Esta tecnología presenta un calentamiento que permite al agua y a la grasa (entre otras sustancias) absorber la energía producida por las ondas microondas (**Figura 1.5**). Algunos tipos de moléculas como el agua tienen una estructura que le facilita formar dipolos eléctricos con diferencia de cargas entre sus extremos. Cuando estos dipolos son irradiados con ondas microondas en su intento de alinearse con el campo eléctrico alterno, comienzan a rotar, produciendo la fricción de la molécula que a su vez eleva la temperatura.



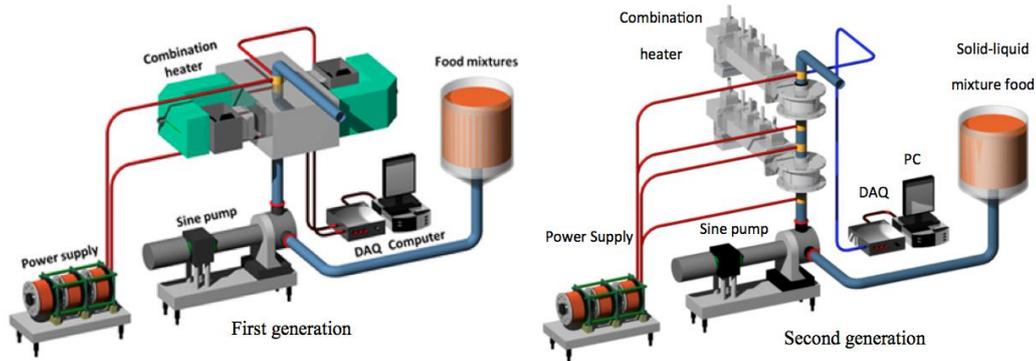
**Figura 1.5.** Esquema del equipo de pasteurización industrial por tecnología MH (<https://www.microdenshi.co.jp/en/device/>).

Se ha comprobado que el MH genera calor desde el interior de la matriz a calentar, demostrando que, a diferencia de cualquier otro método de TT, cuyo calentamiento puede originar pérdidas organolépticas y nutricionales severas (Fu, 2004) es capaz de mejorar la calidad y preservar las características nutricionales de manera más eficaz (Chandrasekaran, Ramanathan, y Basak, 2013). El MH se ha aplicado principalmente en alimentos líquidos, sobre todo en zumos/purés y bebidas vegetales. Así, autores como Salazar-González y col., (2012) comprobaron la eficacia de esta tecnología para inactivar enzimas y microorganismos alterantes. Sin embargo, el MH presenta el inconveniente de que puede comprometer la seguridad del procesamiento al no ser uniforme la distribución de la temperatura (Vadivambal y Jayas, 2010; Zhu, Guo y Wu, 2012; Kumar y col., 2017).

#### 1.4.3. Calentamiento óhmico (OH, Ohmic Heating)

El OH utiliza una corriente eléctrica que atraviesa los materiales que actúan como resistencia y consecuentemente aumenta la temperatura de éstos (Zell y col., 2009). Para que se produzca el calentamiento con esta tecnología, el producto tiene que contener la suficiente cantidad de agua y metabolitos como para permitir la circulación de una corriente eléctrica generadora de calor (**Figura 1.6**). Esta circulación eléctrica provoca la electroporación y rotura de las membranas celulares de las bacterias, resultando muy útil en el procesado de alimentos tales como zumos/purés y bebidas vegetales (Knirsch y col., 2010; Darvishi, Khostaghaza y Najafi, 2013). El OH no transfiere el calor residual tras cesar la corriente ni produce incrustaciones en la superficie de transferencia del calor.

Además, calienta el alimento de forma rápida y homogénea preservando mejor sus nutrientes y sus características organolépticas.

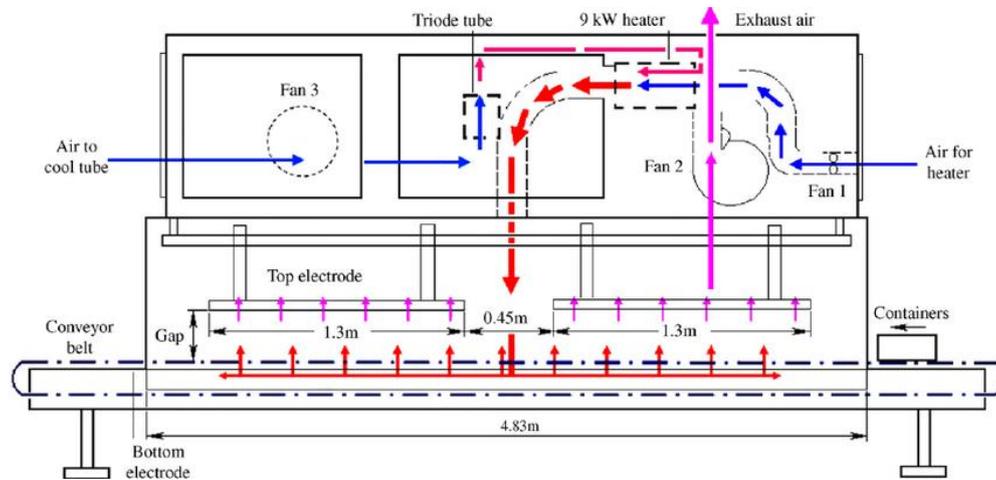


**Figura 1.6.** Esquema del equipo de pasteurización industrial por tecnología OH (<http://www2.hawaii.edu/~soojin/research.htm>).

Sin embargo, el procesado por este tratamiento presenta dificultades de control debido a la necesidad de un estrecho ajuste entre la temperatura y la distribución del campo eléctrico. Actualmente hay numerosos estudios publicados aplicando esta tecnología en alimentos como los zumos/purés y bebidas vegetales (Darvishi, Khostaghaza y Najafi, 2013; Achir y col., 2016).

#### 1.4.4. Calentamiento por radiofrecuencia (RH, Radiofrequency Heating)

El RH utiliza una porción del espectro electromagnético como fuente de energía para calentar los alimentos (Ramaswamy y Tang, 2008) a frecuencias que oscilan entre 13,56-40,68 MHz (Marra, Zhang, y Lyng, 2009) (**Figura 1.7**). Este tratamiento resulta eficaz a la hora de inactivar microorganismos presentes en zumos/purés y bebidas vegetales tales como el zumo de manzana y naranja (Trujillo y Geveke, 2014), o la leche de soja (Uemura, Takahashi, y Kobayashi, 2010). Sin embargo, la falta de uniformidad en la distribución de la temperatura origina diferencias térmicas notables en los alimentos así tratados (Soto-Reyes, Rojas-Laguna y Sosa-Morales, 2012).



**Figura 1.7.** Esquema del equipo de pasteurización industrial por tecnología RH

([https://www.researchgate.net/figure/Schematic-view-of-the-industrial-scale-25-kW-2712-MHz-radio-frequency-RF-unit-showing\\_fig1222660545](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-view-of-the-industrial-scale-25-kW-2712-MHz-radio-frequency-RF-unit-showing_fig1222660545)).

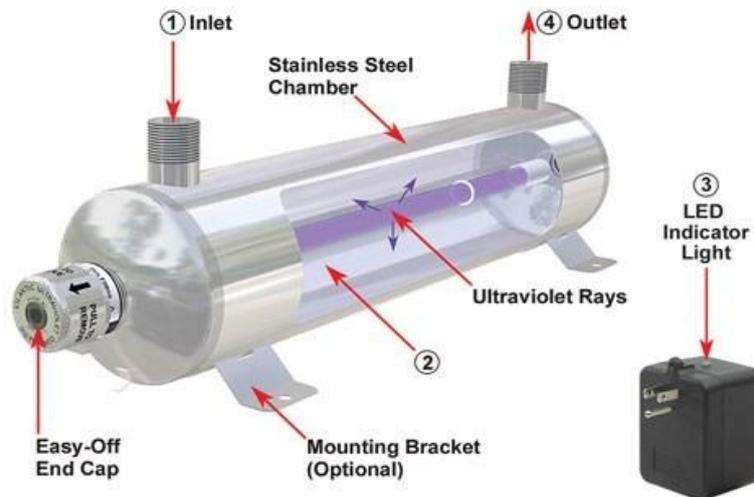
### 1.5. CONSERVACIÓN DE ZUMOS/PURÉS Y BEBIDAS VEGETALES MEDIANTE TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS

El aumento de la demanda de zumos/purés y bebidas vegetales mínimamente procesados por parte del consumidor está impulsando el desarrollo de tecnologías de conservación no térmicas. A pesar de que algunas de estas tecnologías provocan un ligero aumento de temperatura, en ningún caso se aproximan a la temperatura requerida en un tratamiento térmico (Raso y Barbosa, 2003). Las tecnologías de conservación no térmicas se definen como aquellas que inactivan o reducen los microorganismos y enzimas alterantes de zumos/purés y bebidas vegetales a valores seguros, mediante métodos distintos al calentamiento. De este modo, se obtienen alimentos microbiológicamente seguros, con baja actividad enzimática que conservan mejor las propiedades organolépticas y nutricionales, intentando ser similares a las previas al tratamiento.

Las principales tecnologías utilizadas en la industria de zumos/purés y bebidas vegetales son las altas presiones hidrostáticas, los campos de pulsos eléctricos, la radiación ultravioleta C, los pulsos de luz, los ultrasonidos y el plasma frío. Aunque algunas de estas tecnologías son efectivas para inactivar los microorganismos patógenos de los alimentos, están lejos de inactivar las enzimas alterantes.

### 1.5.1. Radiación ultravioleta C (UVC, Ultraviolet Radiation C)

El tratamiento con radiación UVC utiliza las radiaciones de la región ultravioleta del espectro electromagnético para esterilizar o desinfectar superficies y alimentos líquidos (especialmente zumos/purés y bebidas vegetales). Normalmente, el rango del espectro electromagnético de la radiación UV varía de 100-400 nm. A su vez, el rango se puede subdividir en UVC (200-280 nm) considerándose como un rango con propiedades germicidas puesto que resultan eliminados eficazmente los microorganismos expuestos a causa de las mutaciones en las moléculas de ADN. Para conseguir la inactivación microbiana, la exposición de radiación UVC debe tener una energía mínima de 400 J/m<sup>2</sup> y repartirse uniformemente en todas las partes para que la población microbiana adquiera una curva sigmoideal reductiva (**Figura 1.8**).



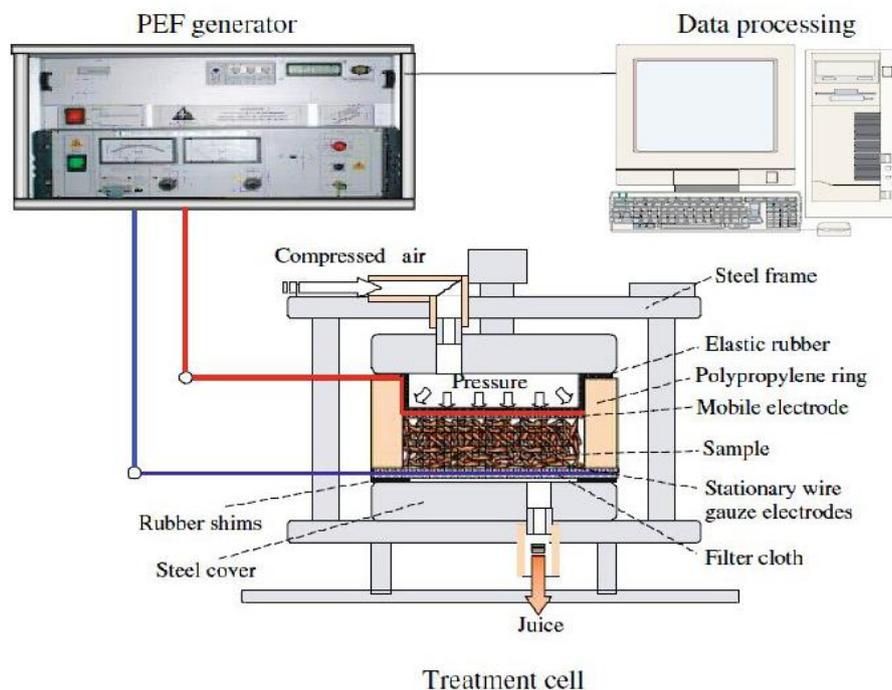
**Figura 1.8.** Esquema del equipo de tratamiento industrial con tecnología UVC (<https://trapandzap.wordpress.com/2008/08/28/hello-world/>).

Por este motivo, la radiación UVC se considera una tecnología eficaz para los zumos/purés y bebidas vegetales, puesto que logra reducir o eliminar los microorganismos causantes de las pérdidas nutricionales y organolépticas. Generalmente, es más eficaz en zumos clarificados (manzana, piña, uva, naranja, tomate, etc) debido a que la pulpa hace que el tratamiento no sea del todo eficiente. Algunos autores han comprobado la eficacia de los tratamientos UVC en los zumos

clarificados reduciendo las poblaciones de bacterias (Gabriel y Nakano, 2009), levaduras y mohos (Gouma y col., 2015) a valores seguros para el consumidor.

### 1.5.2. Campos de pulsos eléctricos (PEF, Pulse Electric Fields)

La tecnología PEF aplica pulsos eléctricos de alta intensidad (1-70 kV/cm) y corta duración (1-300  $\mu$ s) a alimentos ubicados entre dos electrodos, uno de los cuales está conectado a tierra y el otro a alta tensión, provocando un campo eléctrico entre ellos (Asavasanti y col., 2010) (**Figura 1.9**). Los zumos/purés y bebidas vegetales tratados con esta tecnología presentan propiedades organolépticas y nutritivas similares a las del producto fresco, debido a que el tratamiento por PEF mantiene a temperatura ambiente los zumos/purés y bebidas vegetales o en todo caso a temperaturas inferiores a las de pasteurización reduciéndose al mínimo el daño térmico producido (Devlieghere, Vermeiren, y Debevere, 2004).



**Figura 1.9.** Esquema del equipo de tratamiento industrial con tecnología PEF

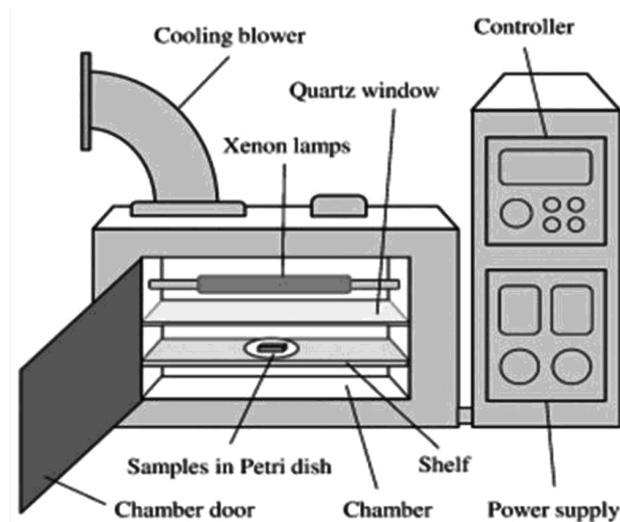
(<https://www.intechopen.com/books/structure-and-function-of-food-engineering/pulsed-electric-fields-for-food-processing-technology>).

La aplicación del tratamiento origina en las membranas de los microorganismos la electroporación (formación de poros), inactivándolos a temperaturas bajas, lo que prolonga la vida útil (Rastogi, 2003). Por este motivo, se obtienen alimentos microbiológicamente seguros y sin daño térmico, conservando las propiedades organolépticas y nutritivas (Odriozola-Serrano y col., 2013).

A pesar de la eficacia de esta tecnología en la reducción de microorganismos, el PEF sólo resulta eficaz para bacterias en la fase vegetativa, pero no en la fase espora. Por otro lado, para que esta tecnología sea eficaz, los zumos/purés y bebidas vegetales no deben contener burbujas de aire, ni deben presentar baja conductividad eléctrica y tienen que comercializarse siempre refrigerados (Góngora-Nieto y col., 2002; Ramaswamy y Marcotte, 2005). Además, en Europa todavía no hay empresas que apliquen esta tecnología en sus productos (Lorente y col., 2011) debido a la falta de datos concluyentes sobre las condiciones del procesado industrial y por la elevada complejidad en el desarrollo de equipos industriales que permitan aplicar este tratamiento (Singh y col., 2012; Kayalvizhi y Antony, 2014).

### **1.5.3. Pulsos lumínicos (LP, Light Pulses)**

El LP es una tecnología que aplica pulsos de tiempo corto (100–400  $\mu$ s) y amplio espectro (100-1100 nm) para desinfectar zumos/purés y bebidas vegetales (Pellicer y col., 2019). El LP utilizado habitualmente para tratar alimentos emite de 1 a 20 flases por segundo, y cada flash contiene una cantidad de energía que oscila de 0,01 a 50 J/cm<sup>2</sup>. Esta tecnología utiliza una lámpara de gas Xenón que libera muy rápidamente la energía eléctrica en forma de luz a la superficie del alimento (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10.** Esquema del equipo de tratamiento con tecnología LP

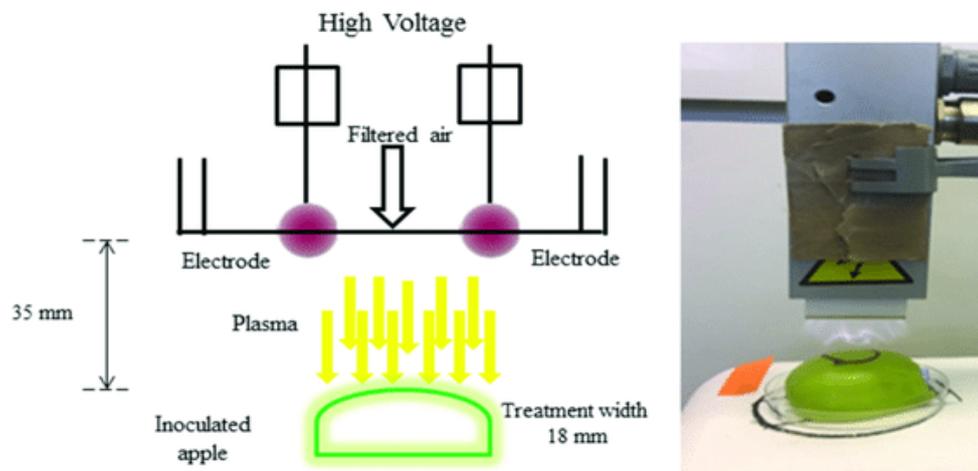
(<https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-intense-pulsed-light-IPL-system-Cheigh-et-al-2013-fig3319094531>).

La luz emitida por esta tecnología contiene componentes de UVC que son capaces de dañar el DNA de los microorganismos, alterar la estructura proteica y provocar roturas en las membranas celulares. Numerosos estudios han comprobado la efectividad de este tratamiento en la inactivación de bacterias en fase vegetativa y fase espora (Choi y col., 2015). El daño efectuado en los microorganismos depende de la frecuencia y tiempo de los pulsos de luz, la longitud de onda de la luz y de la claridad del líquido tratado. A pesar de ello, todavía es necesario seguir investigando sobre la cinética de inactivación microbiana y enzimática debido a la gran cantidad de variables representativas de los zumos/purés y bebidas vegetales (Preetha y col., 2015).

#### 1.5.4. Plasma frío (CP, Cold Plasma)

El CP se caracteriza por la ausencia de equilibrio termodinámico entre electrones, átomos y moléculas gaseosas (Kovačević y col., 2016), resultando a temperaturas bajas ( $< 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en un sistema adiabático con gran cantidad de energía cinética (Schluter y col., 2013) (**Figura 1.11**). Al someter un gas a un potente campo eléctrico se produce la ionización parcial del gas generando el plasma frío (Garofulic y col., 2015).

Además, genera especies altamente energéticas que rompen los enlaces covalentes inactivando a los microorganismos (Keener, 2008). Esto hace que el CP resulte de interés al no usar sustancias tóxicas ni necesitar de elevadas radiaciones. Sin embargo, debido al elevado coste, esta tecnología resulta poco común en los sistemas actualmente comercializados (Ehlbeck y col., 2011).

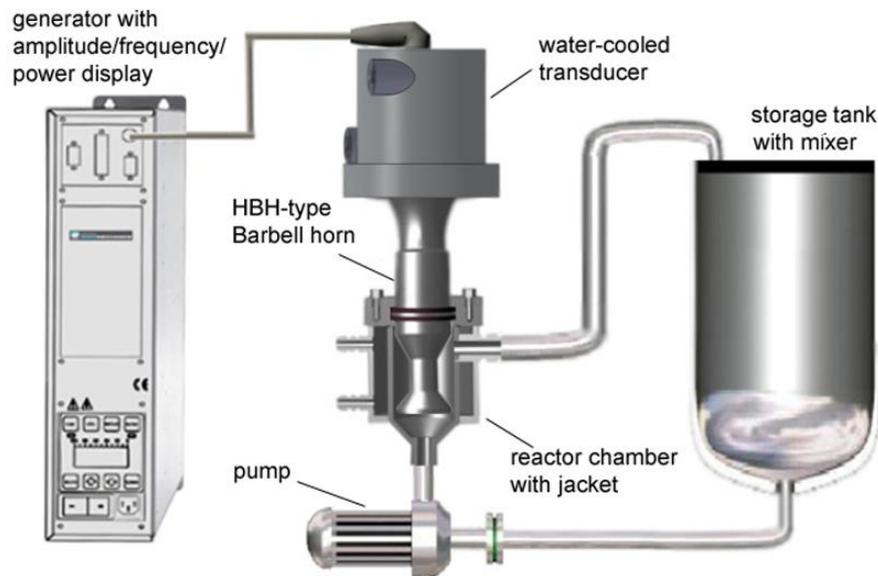


**Figura 1.11.** Esquema del equipo de tratamiento con tecnología CP

(<https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-atmospheric-cold-plasma-system-fig1329559904>).

### 1.5.5. Ultrasonidos (US, Ultrasound)

La tecnología de US fue descubierta durante la primera guerra mundial para la detección de los submarinos y actualmente se aplica en tratamientos para la industria agroalimentaria. Las condiciones de trabajo oscilan entre 20-100 kHz, con intensidades de entre 10-1000 W/cm<sup>2</sup> (**Figura 1.12**).



**Figura 1.12.** Esquema del equipo de tratamiento industrial con tecnología US ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic\\_of\\_bench\\_and\\_industrial-scale\\_ultrasonic\\_liquid\\_processors\\_produced\\_by\\_Industrial\\_Sonomechanics,\\_LLC.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schematic_of_bench_and_industrial-scale_ultrasonic_liquid_processors_produced_by_Industrial_Sonomechanics,_LLC.jpg)).

El US produce cavitaciones en las membranas de los microorganismos provocando su debilitamiento y posterior ruptura (López-Malo y col., 2005). Durante el proceso de cavitación se originan radicales libres como el peróxido de hidrógeno que oxidan a los microorganismos (Kadkhodae y Povey, 2008; Oyane y col., 2009). Por ello, el procesamiento por US, solo o en combinación con temperatura y/o altas presiones hidrostáticas, resulta eficaz para inactivar microorganismos y conservar los compuestos bioactivos de zumos/purés y bebidas vegetales (Valero y col., 2007; O'Donnell y col., 2010).

A pesar del efecto del US sobre los microorganismos, las enzimas alterantes presentes en purés/zumos y bebidas vegetales no son inactivadas eficazmente por esta tecnología, por lo que la mayoría de las investigaciones han focalizado sus esfuerzos en la combinación de ultrasonidos con calor (termosonicación), presión (manosonicación) o ambos (manotermosonicación), encontrándose un efecto sinérgico notable. Sin embargo, ciertos atributos como el sabor y el color pueden verse negativamente afectados por el efecto oxidativo y la cavitación (Petrier, Combet y Mason, 2007). Actualmente, la principal aplicación de esta tecnología se centra en zumos, purés y leche (Rojas, Miano y Augusto, 2017).

### **1.5.6. Altas presiones hidrostáticas o procesamiento por altas presiones (HPP, High Pressure Processing)**

Las temperaturas elevadas tienen efectos negativos sobre los parámetros nutricionales y organolépticos. Además, recientemente ha aumentado en los consumidores de países industrializados la demanda de productos mínimamente procesados y conservados sin aditivos (Torres y Velázquez, 2008). Como consecuencia se han desarrollado tecnologías no térmicas como el procesamiento por HPP.

Esta tecnología funciona a bajas temperaturas ( $\pm 4$  °C), inactiva los microorganismos patógenos, y altera mínimamente las propiedades nutricionales y organolépticas (Chien y col., 2018).

A principios del siglo XX, algunos estudios demostraron la alteración por altas presiones de las proteínas en clara de huevo. A pesar de ello, estas primeras investigaciones encontraron la ineficacia del HPP para inactivar las enzimas que degradan los alimentos.

Hoy en día existe un gran número de empresas que comercializan alimentos tratados mediante esta tecnología, especialmente en el sector de zumos/purés y bebidas vegetales, de hecho, en España son varias las empresas que han implementado estos tratamientos en su producción diaria.

#### *1.5.6.1. Fundamentos y equipo de tratamiento por altas presiones hidrostáticas*

El HPP es una tecnología emergente utilizada en la preservación de alimentos gracias a la aplicación de presiones entre 100 y 1000 MPa durante 1 y 30 min. La presión atmosférica media a nivel del mar es de 1,03 bar = 0,1 MPa = 1 atm, sin embargo, cuando a los alimentos les aplican presiones de 600 MPa se consigue el mismo efecto que si se le sumergieran a 60 Km por debajo del nivel del mar.

Este método de conservación de alimentos presenta como ventaja la reducción de microorganismos presentes en los alimentos a valores seguros, a la vez de minimizar la pérdida de parámetros nutricionales y organolépticos.

Sin embargo, no destruye las esporas bacterianas por lo que es recomendable para alimentos con pH bajo y mantenidos en condiciones de refrigeración ([www.hiperbaric.com/es/aplicaciones](http://www.hiperbaric.com/es/aplicaciones)).

El HPP se basa en dos principios físicos fundamentales:

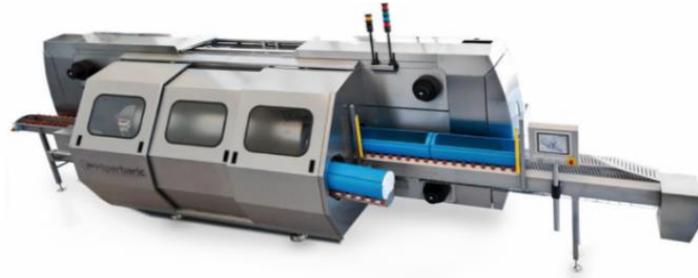
- Principio Le Chatelier: “si se presenta una perturbación externa sobre un sistema en equilibrio, el sistema se ajustará de tal manera que se cancele parcialmente dicha perturbación en la medida que el sistema alcanza una nueva posición de equilibrio”.
- Principio Isostático: “la presión es instantánea y uniformemente transmitida al alimento, ya sea que la muestra permanezca en contacto directo con el medio de presurización o en un envase sellado herméticamente que transmita la presión, independientemente del tamaño o la geometría del alimento”.

El HPP está constituido por una cámara de presurización (cámara que presenta en su interior agua potable y puede llevar un sistema regulador térmico durante el tratamiento), un generador de presión (constituido por dos bombas hidráulicas) y un sistema de control de temperatura (**Figura 1.13**).

En primer lugar, se carga el producto ya envasado dentro de la cámara de presurización. Una vez realizada la carga, dos bombas hidráulicas introducen agua dentro del cilindro hasta alcanzar la presión programada; que se mantiene durante el tiempo establecido, para pasar finalmente a la descompresión.

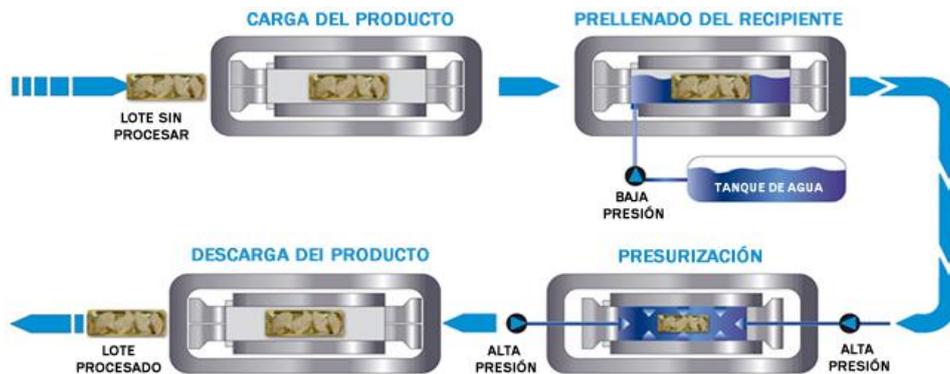
Los envases utilizados deben ser de plástico tipo PET 1 por su mayor flexibilidad. Cuando se envasa el producto es importante que ocupe todo el envase para evitar la presencia de burbujas de aire en las cuales la presión es diferente al resto del producto y resta eficacia al tratamiento.

Además, es habitual aplicar dos cámaras funcionando intermitentemente para optimizar el rendimiento económico del tratamiento ([www.hiperbaric.com/es/aplicaciones](http://www.hiperbaric.com/es/aplicaciones)).



**Figura 1.13.** Equipo de tratamiento industrial con tecnología HPP ([www.hiperbaric.com/es/aplicaciones](http://www.hiperbaric.com/es/aplicaciones)).

La temperatura no es un parámetro crítico porque en todos los casos la temperatura máxima alcanzada durante el proceso no supera los 35 °C y el producto puede seguir considerándose como no térmico. La compresión adiabática del agua aumenta la temperatura de la muestra entre 2-3 °C por cada 100 MPa, aumento al que hay que sumar la temperatura inicial del agua que habitualmente se sitúa alrededor de 4 °C (Cheftel y Culioli, 1997). Los aspectos del proceso a tener en cuenta y que pueden modificar el efecto de la presión en el producto son el número de ciclos, el tiempo de cada ciclo, la presión aplicada, la temperatura y el tipo de alimento.



**Figura 1.14.** Esquema del tratamiento de muestras por HPP ([www.hiperbaric.com/es/aplicaciones](http://www.hiperbaric.com/es/aplicaciones)).

El procesamiento por HPP (**Figura 1.14**) se realiza en tres etapas:

1º. Rampa de presión: tiempo requerido en incrementar la presión de la muestra hasta la presión programada. El tiempo depende de la compresión, la transmisión de presión del fluido y la potencia de las bombas.

2º. Holding time: tiempo de tratamiento con la presión programada. Tiene un efecto económico importante. Un proceso menor de 5 min resulta económicamente rentable (Balasubramaniam y col., 2007).

3º. Descompresión: tiempo en el que la presión desciende hasta volver a la presión atmosférica.

Los efectos del tratamiento por HPP según la presión aplicada son:

- Hasta 200 MPa: leve influencia sobre la cinética enzimática, modificación de las propiedades físicas de las proteínas y alteración de la membrana de los microorganismos.
- Hasta 300 MPa: inactivación enzimática reversible y comienzo de la muerte de los microorganismos.
- Hasta 400 MPa: gelificación de los almidones y desnaturalización de las proteínas.
- Hasta 500-600 MPa: muerte de las esporas bacterianas e inactivación enzimática irreversible de algunas enzimas.

#### 1.5.6.2. Efecto de altas presiones hidrostáticas en alimentos

El HPP en alimentos aumenta el tiempo de vida útil del producto, mantiene la calidad organoléptica mejor que otros tratamientos de conservación y obtiene un producto seguro mediante la eliminación de patógenos como, por ejemplo, *Salmonella* en ovoproductos, *Listeria* en carnes y *Vibrio* en moluscos.

##### 1.5.6.2.1. Efecto de altas presiones hidrostáticas en productos y derivados lácteos

Actualmente hay numerosos estudios relacionados con el tratamiento de la leche con HPP. En algunos estudios se ha comprobado que el tratamiento con esta nueva tecnología presenta una eficacia similar a una pasteurización suave retrasando la acidificación en la leche y reduciendo la población de microorganismos patógenos (Lee y Koo, 2019).

En la industria de los quesos el HPP ha demostrado tener gran aplicabilidad y aceptabilidad. El uso de esta tecnología en quesos no solo consigue alargar la vida útil del producto, sino que mejora las propiedades organolépticas, produciendo la

aceleración del proceso de maduración, rentabilizando los costes de producción principalmente por el ahorro provocado al eliminar el almacenamiento en refrigerado (Saldo, Sendra y Guamis, 2000).

#### *1.5.6.2.2. Efecto de altas presiones hidrostáticas en productos cárnicos*

El HPP aplicado en carnes y derivados cárnicos proporciona al producto la ventaja de prolongar la vida útil en refrigeración. Esta tecnología rompe orgánulos celulares tales como lisosomas, liberando las proteasas al citoplasma celular, y produciendo la ruptura de las proteínas citoplasmáticas. Sin embargo, la desnaturalización de las proteínas a causa de la presión tiene lugar sin que su valor biológico se vea afectado negativamente. Este proceso bioquímico inducido por HPP puede influir mejorando el aroma y el sabor de la carne (Suzuki y col., 1994). Por el contrario, la carne y los productos cárnicos no curados, cuando se tratan con HPP pierden su coloración, volviéndose más blanquecinos (Sun y Holley, 2010).

Además, en carnes reestructuradas y picadas la aplicación del HPP presenta numerosas ventajas. A pesar de que este tipo de carne es muy nutritiva y palatable contiene una gran carga microbiana, la aplicación de esta tecnología consigue reducir la carga microbiana a valores seguros para el consumidor (Chien y col., 2019). Otra ventaja que presenta el HPP en las carnes reestructuradas es el aumento de la cohesión entre partículas en productos picados o emulsiones cárnicas, reduciendo considerablemente la cantidad necesaria de sal y de polifosfatos.

#### *1.5.6.2.3. Efecto de altas presiones hidrostáticas en pescados y mariscos*

La aplicación de HPP sobre el pescado y marisco consigue la reducción de su carga microbiana a valores seguros para el consumidor, y alarga su vida útil, puesto que este tipo de tratamiento conserva la calidad y los atributos saludables del pescado y marisco. Por este motivo, el HPP podría ayudar a la industria pesquera, garantizando una materia prima de más calidad, que junto con el ahorro de energía, en comparación con los tratamientos térmicos tradicionales, hace que el HPP sea un tratamiento de conservación muy adecuado y eficiente (Briones-Labarca y col., 2012; Alba y col., 2019).

Por otro lado, el Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, establece que el nematodo anisakis debe eliminarse con un proceso de congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Sin embargo, Brutti y col., (2010) confirmaron la alternativa existente con el HPP, puesto que el nematodo anisakis también puede eliminarse con un tratamiento muy suave con HPP de entre 100-300 MPa durante 5 min, presentándose como alternativa viable para la seguridad alimentaria y con un considerable ahorro de tiempo y energía frente al procesado tradicional por congelación.

#### *1.5.6.2.4. Efecto de altas presiones hidrostáticas en ovoproductos*

El HPP se presenta como una alternativa viable para el tratamiento del huevo líquido y geles de huevo frente a la pasteurización convencional. La aplicación de ciclos de HPP (450 MPa/3 ciclos de 5 min) en combinación con nisina (5 mg/L) resulta eficaz para extender la vida útil del huevo líquido refrigerado a 30 días, puesto que destruye los microorganismos patógenos y alterantes del producto. El tratamiento del huevo líquido utilizando HPP permite aumentar la temperatura del tratamiento sin desnaturalizar las proteínas del huevo, a la vez de asegurar la calidad microbiológica (Naderi y col., 2017).

#### *1.5.6.2.5. Efecto de altas presiones hidrostáticas en zumos/purés y bebidas vegetales*

En la actualidad se han realizado numerosos estudios de estabilización con presurizaciones mayores o iguales a 300 MPa y sin tratamiento térmico (Daher, Le Gourrierc y Pérez-Lamela, 2017; Ganessingh, Sahibdeen y Maharaj, 2018) de productos a base de frutas y verduras.

Pokhrel y col., (2019) mostraron, en zumo de zanahoria, un efecto sinérgico sobre la inactivación de *L. innocua* y *E. coli* tras la aplicación combinada de HPP, nisina y temperaturas suaves. Al reemplazar la pasteurización tradicional por estas combinaciones, permitió el uso de presiones reducidas durante períodos de tiempo cortos, reduciendo los requisitos de energía y aumentando el rendimiento y la frescura del zumo.

A pesar de que el HPP estabiliza microbiológicamente el producto, afectando levemente a las características físico-químicas y nutricionales, las enzimas no son inactivadas totalmente, siendo recomendable un tratamiento térmico suave combinado con el HPP.

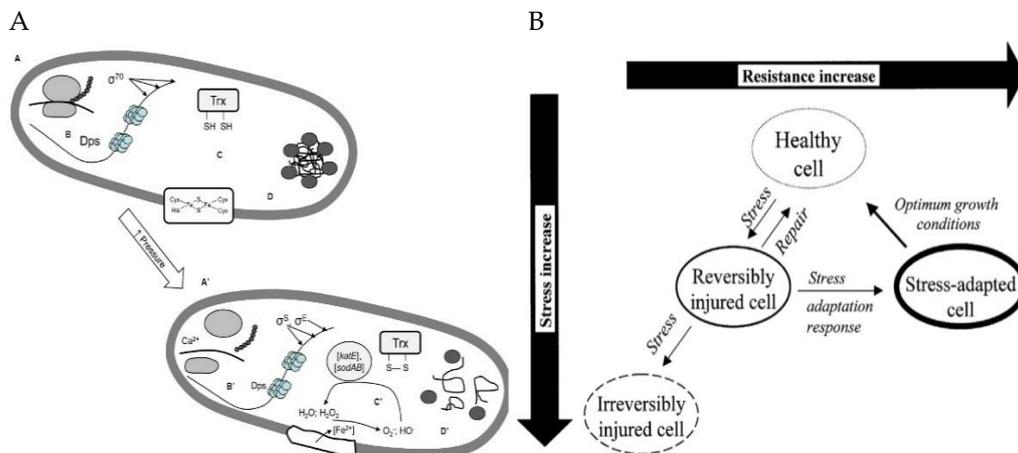
Stinco y col., (2019) evaluaron el efecto del HPP en la estabilidad enzimática del zumo de zanahoria, observando que la mayor inactivación de POD (31%) y PPO (57%) se logró con 600 MPa y 300 MPa aplicados en tres ciclos, respectivamente. Bajo estos resultados afirmaron que estas enzimas alterantes de zumos pueden ser inhibidas parcialmente con el tratamiento por HPP, lo que a su vez puede repercutir positivamente en la calidad global del zumo.

#### *1.5.6.3. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre microorganismos*

Tradicionalmente en la industria agroalimentaria han sido utilizados los tratamientos térmicos para estabilizar microbiológicamente los alimentos. Sin embargo, a pesar de la alta efectividad de estos métodos convencionales y de la rentabilidad económica que presentan, muchas veces las temperaturas elevadas que aplican tienen efectos negativos sobre la calidad nutricional del alimento. Además, cada vez más se está aumentando la demanda en los países desarrollados de productos mínimamente procesados y conservados sin aditivos (Torres y Velázquez, 2005). Por esta razón, el procesamiento por HPP se encuentra en auge comercial (Huang y col., 2014).

Tal es su eficacia en la inactivación de microorganismos patógenos, que un simple ciclo con HPP causa hasta cinco reducciones logarítmicas en patógenos de alimentos (Evelyn, Filipa y Silva, 2019).

A pesar de ello, los alimentos tratados con HPP necesitan algunos requerimientos especiales como mantenerse en refrigeración durante su vida útil, presentar una actividad acuosa reducida y ajustarse a un pH bajo para prevenir la germinación de las esporas bacterianas, puesto que no son inactivadas por HPP.

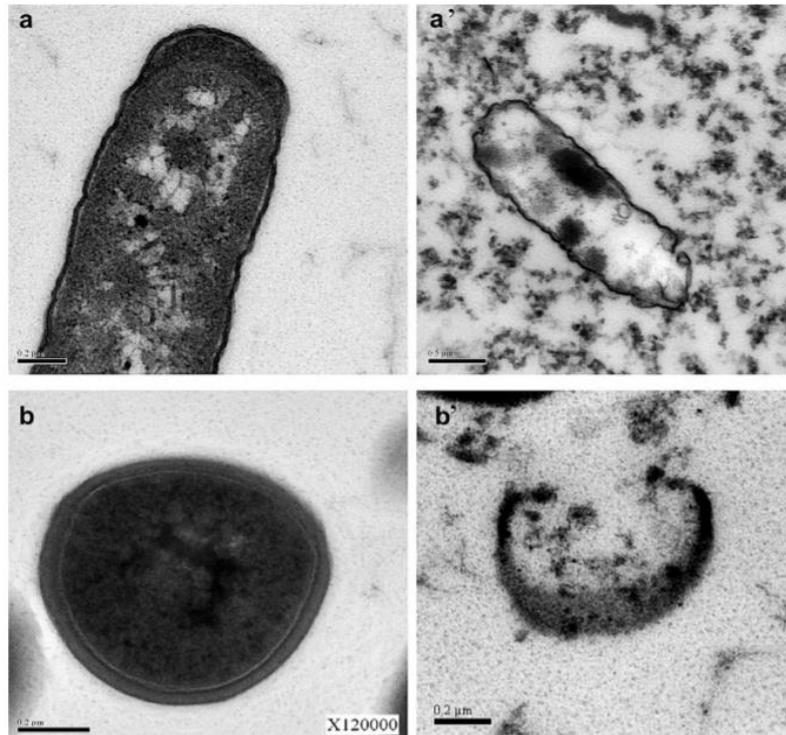


**Figura 1.15.** (A) Efecto del HPP sobre los componentes de la célula bacteriana. (B) Gráfica de reversibilidad/irreversibilidad de la célula bacteriana tras sufrir estrés por HPP.

El HPP presenta como principal ventaja que durante el tratamiento no se aplican temperaturas o estas son muy suaves. Esta tecnología consigue inactivar los microorganismos alterando las funciones fisiológicas responsables de la reproducción y supervivencia de la célula bacteriana (**Figura 1.15**).

Según Huang y col., (2014) el principal daño producido por HPP en las células bacterianas es la alteración de las membranas celulares bacterianas, afectando de esta manera a procesos de transporte celular relacionados con la nutrición y la excreción celular. Esto se debe principalmente a la perforación de la pared celular lo que causa la liberación del citoplasma al exterior celular tal y como se aprecia en la **Figura 1.16**.

Las mediciones de exclusión con colorantes utilizadas para detectar este defecto producido por la presurización pueden ser usadas para confirmar la inactivación microbiana (Ulmer, Gaenzle y Vogel, 2000).



**Figura 1.16.** Estructuras celulares de *E. coli* y *S. aureus* sin tratar (a y b, respectivamente) y con HPP 500 MPa durante 30 min (a' y b', respectivamente) (Huang y col., 2014).

Malone, Shellhammer y Courtney (2002) con *Lactococcus lactis* comprobaron que la pérdida de viabilidad celular, los cambios de forma y el aumento de la actividad de la hidrolasa en la pared celular causados por la presurización producían la lisis de las células bacterianas. De hecho, a través de microscopía electrónica de transmisión observaron que las presurizaciones de 300 MPa lisan las células vegetativas de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 y SK11.

Kalchayanand y col., (2002) observaron que las células de *Leuconostoc mesenteroides* tratadas con HPP a 345 MPa durante 5 min fueron alteradas modificando la permeabilidad de las membranas celulares. Esto se tradujo en una reducción del potencial de gradiente de la membrana celular bacteriana, limitando la síntesis de ATP, lo cual activó la autólisis de las paredes celulares bacterianas.

Tholozan y col., (2000) en cepas de *S. typhimurium* demostraron que los cambios en la morfología celular provocados por la alta presión están relacionados con una disminución progresiva del diferencial de pH (pH interno – pH externo), del potasio intracelular y de la concentración de ATP.

Gaenzle y Vogel (2001) aplicaron técnicas de fluorescencia a *E. coli* para comprobar la hipótesis del posible daño causado por presurización a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, comprobando que el daño reversible a la membrana externa ocurre rápidamente en *E. coli*, según las condiciones de presión, mientras que el daño irreversible ocurre dependiendo del tiempo expuesto a la presurización.

Otro factor determinante en la inactivación de las células bacterianas es la velocidad de descompresión. Noma y col., (2004) inocularon con *E. coli* O157:H7 a zumos de manzana y naranja, y seguidamente los trataron con HPP. Posteriormente, los zumos se descomprimieron de forma lenta ( $\pm 30$  s) y rápida ( $\pm 2$  ms), comprobando que la descompresión rápida produjo una mayor inactivación que la descompresión lenta.

Las bacterias en la fase espora son más difíciles de inactivar puesto que son más baroresistentes que en la fase vegetativa (Pokhrel y col., 2019). Esto se debe a que las esporas contienen en su interior el ADN muy protegido frente a daños físico-químicos por un grupo de proteínas ligadas. Estas proteínas se denominan proteínas solubles en ácido (SASP) y representan alrededor del 15% del contenido proteico de una espora. Recientemente se ha concluido que para inactivar esporas hay que aumentar los ciclos de presión o combinar la presión con temperaturas altas, aunque a la vez inferiores a las utilizadas en la pasteurización convencional para alterar mínimamente los parámetros organolépticos y nutricionales de zumos/purés y bebidas vegetales (Varela-Santos y col., 2012).

#### 1.5.6.4. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre la composición de alimentos

El HPP se ha convertido en un método alternativo al tratamiento térmico convencional, por ello, se han estudiado sus efectos en los componentes de los alimentos (carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas, etc) para determinar su valor nutricional. El efecto del HPP (hasta 400 MPa) sobre los enlaces covalentes es leve o nulo, sin embargo, los enlaces iónicos, los enlaces por puentes de hidrógeno y en general los enlaces hidrófobos presentan mayor fragilidad que los enlaces covalentes (Alpas, Alma y Bozoğlu, 2003).

#### 1.5.6.4.1. Agua

El HPP altera las propiedades del agua. Por cada aumento de 100 MPa, el volumen del agua disminuye un 4% a una temperatura fija de 22 °C (Cheftel, 1992). Los alimentos con alta humedad y poco gas disuelto se comprimen de manera similar al agua. Cuando disminuye el volumen del alimento aumenta la densidad del mismo y en consecuencia los coeficientes de difusión de los solutos también disminuyen.

Por cada 100 MPa que aumente la presión del alimento, se origina una compresión adiabática del agua contenida en su interior, que causa un aumento térmico del agua de  $\pm 2,5$  °C (Cheftel, 1995).

Sin embargo, este cambio es reversible, puesto que cuando se descomprime la muestra la temperatura disminuye a su estado inicial (Cheftel y Culioli, 1997).

Por otro lado, las presiones mayores de 1000 MPa (a temperatura ambiente) provocan la formación de cristales de hielo. El pH del agua también experimenta cambios relacionados con la presión, disminuyendo de 7 a 6,27 cuando la presión aumenta de 0,1 a 1000 MPa.

#### 1.5.6.4.2. Lípidos

Los lípidos en estado líquido a temperatura ambiente pueden cristalizar bajo presión debido a que la temperatura de fusión aumenta con la presión reversiblemente en más de 10 °C por cada 100 MPa. El HPP causa la formación de cristales densos con alta temperatura de fusión, siendo una de las causas de destrucción de los microorganismos por los cambios cristalinos en los fosfolípidos de la membrana celular (Cheftel, 1995).

Bou y col., (2019) comprobaron que el aumento de la presión puede producir un aumento de la oxidación en lípidos. Además, los alimentos con alto contenido proteico como la carne y pescado aumentan la oxidación lipídica. Beltrán y col., (2003) concluyeron que este incremento oxidativo está relacionado con la desnaturalización proteica originada por la presión, liberan iones metálicos que catalizan la oxidación lipídica.

#### 1.5.6.4.3. Carbohidratos

Existen pocos estudios sobre el efecto del HPP en los hidratos de carbono, sin embargo, algunos autores han comprobado que los azúcares simples apenas se ven alterados por esta tecnología (Bansal y col., 2018). Por su parte, Sangronis y col., (1997) afirmaron que las reacciones de condensación de Maillard fueron inhibidas por HPP de entre 50 y 200 MPa, por lo que no se producen las alteraciones organolépticas y del color comunes en esta reacción. Algunas investigaciones han confirmado la hipótesis de que la alta presión afecta a la transición sólido-gel de los polisacáridos, originando geles diferentes a los obtenidos por tratamientos térmicos (Mozahev y col., 1994).

#### 1.5.6.4.4. Vitaminas

Recientemente, Kieling, Barbosa-Cánovas y Prudencio (2018) han estudiado el efecto del HPP sobre la estabilidad de las vitaminas presentes en bebidas vegetales, observando una leve destrucción vitamínica.

Suárez-Jacobo y col., (2011) observaron que para el zumo de manzana, no existieron diferencias en el contenido de la vitamina C, entre los zumos tratados con HPP 100, 200, 300 MPa a 20 °C y el zumo control, por el contrario, el zumo pasteurizado conservó alrededor del 10 % de vitamina C tras el tratamiento.

En puré de fresa, los tratamientos térmicos también provocaron una gran disminución de la vitamina C (Patras y col., 2009). De manera similar, Nuñez-Mancilla y col., (2013) observaron una pérdida del contenido de vitamina C, también en fresa, tras el tratamiento con HPP 300 MPa durante 10 min.

Barba, Esteve y Frigola, (2013), en zumo de arándano, obtuvieron resultados similares en el contenido de vitamina C, tras el tratamiento de las muestras con HPP 400-600 MPa durante 5-15 min, siendo significativamente inferiores (92 %) al zumo sin tratamiento.

En un smoothie a base de vegetales, se conservó el 91 % de la vitamina C tras el tratamiento con HPP 100-400 MPa durante 2-9 min a 30 °C, y el 89 % tras la pasteurización a 98 °C durante 20 s (Barba y col., 2010).

#### 1.5.6.4.5. *Proteínas*

Numerosas investigaciones han comprobado el efecto del HPP sobre la estructura proteica (Villamonte y col., 2013; He y col., 2013), concluyendo que las modificaciones de las proteínas causada por la presurización producen alteraciones intra e intermoleculares entre grupos funcionales de los aminoácidos.

El tratamiento con HPP de 100 a 200 MPa, a temperatura ambiente, induce al despliegue y desnaturalización de estructuras proteicas, debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares. Funtenberger, Dumay y Cheftel (1995) observaron que los grupos sulfhidrilo se oxidaban produciendo puentes disulfuro en presencia del oxígeno.

#### 1.5.6.5. *Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre enzimas*

En los zumos/purés y bebidas vegetales se ha descubierto el efecto negativo producido por las reacciones que catalizan numerosas enzimas presentes de manera natural. Estas enzimas se clasifican en dos grandes grupos: oxidorreductasas e hidrolasas. Las oxidorreductasas como la polifenoloxidasas, peroxidasa y lipoxigenasa, producen graves alteraciones organolépticas y nutricionales (Liavoga y Matella, 2012; Silva y col., 2019). De hecho, la peroxidasa participa en la catalización de la oxidación de ácidos cinámicos y proteínas de la pared celular produciendo gran cantidad de productos oxidados, alterando drásticamente el sabor y el color (Van Buggenhout y col., 2009). Las hidrolasas como la pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y  $\beta$ -glucosidasa producen la precipitación de la pectina, reduciendo la estabilidad, alterando el color y otras propiedades organolépticas (Giovane y col., 2004). Además, el efecto sinérgico de la pectinmetilesterasa y poligalacturonasa produce graves modificaciones de la pectina, que a su vez altera drásticamente la textura (Duvetter y col., 2009).

Cuando las enzimas son tratadas con HPP sufren cambios conformacionales y cinéticos que alteran la velocidad de las reacciones que catalizan. Según la enzima, la cantidad de presión, el tiempo de presurización, la temperatura o el pH del medio, las cinéticas enzimáticas se ven alteradas de manera parcial/total o reversible/irreversible (Wibowo y col., 2019).

Debido a la elevada barorresistencia que presentan las enzimas de frutas y verduras, en muchas no se han conseguido inactivaciones eficientes. Por este motivo, actualmente existe la necesidad de incrementar los ciclos de presión; puesto que aplicaciones sucesivas con HPP pueden provocar una mayor inactivación enzimática disminuyendo su actividad residual (Basak, Ramaswamy y Simpson, 2001).

#### *1.5.6.5.1. Inhibición enzimática inducida por presión*

La inactivación enzimática provocada por HPP se produce por alteraciones en las interacciones de los aminoácidos que constituyen las enzimas (Sreedevi, Jayachandran y Rao, 2019). Cuando las enzimas son tratadas con HPP, al igual que ocurre con otras proteínas, su estructura comienza a desnaturalizarse. Según la cantidad de presión y el tiempo de exposición, pueden ocurrir cambios reversibles o irreversibles, provocando un despliegue parcial o completo de la estructura nativa de la enzima (Ludikhuyze y col., 2001). Balny y Masson (1993) observaron que las presiones > 200 MPa provocan un despliegue irreversible de la estructura de las enzimas. Para que una enzima tratada con HPP vuelva a ser viable cinéticamente, la extensión de su inactivación debe de estar dentro de un valor de recomprimibilidad. Este valor depende de la naturaleza de la enzima y de las condiciones del medio.

#### *1.5.6.5.2. Activación enzimática inducida por presión*

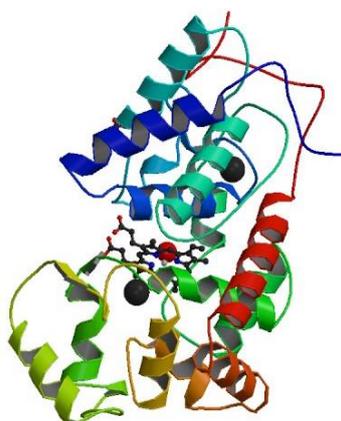
Las alteraciones producidas por HPP en las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas son consecuencia de cambios en la estructura de la enzima, cambios en los mecanismos de reacción y cambios en las propiedades físicas del sustrato o del disolvente donde tengan lugar estas reacciones (por ejemplo: pH, densidad, viscosidad, fase acuosa, etc).

El aumento de la polaridad del disolvente orgánico donde se encuentren disueltas las enzimas incrementa la flexibilidad de algunas de ellas (Trodler y Pleis, 2008). Por este motivo, el HPP puede aumentar la flexibilidad conformacional, optimizando la velocidad de reacción, produciendo la activación enzimática.

Algunos autores han comprobado que las enzimas disueltas en solventes orgánicos conservan su estructura nativa tras la transferencia del agua (ligada a la enzima) al solvente orgánico. Por el contrario, las enzimas que no contienen agua ligada a su estructura se inactivan con HPP más fácilmente.

#### 1.5.6.5.3. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre peroxidasa (POD)

La peroxidasa (POD, E.C. 1.11.1.7) es una oxidoreductasa ampliamente distribuida en frutas y verduras, que produce junto con la PPO el pardeamiento enzimático. Es responsable de las oxidaciones en las que el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor de electrones y el dador de electrones es el segundo sustrato (Fortea y col., 2009). La POD presenta como grupo prostético un grupo hemo unido a la parte proteica por una cadena lateral con un aminoácido en la quinta posición de coordinación del hierro (Pellicer y col., 2016) (**Figura 1.17**).



**Figura 1.17.** Estructura de POD de *Armoracia rusticana*  
([https://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish\\_peroxidase](https://en.wikipedia.org/wiki/Horseradish_peroxidase)).

La POD se encuentra de forma soluble o ligada a membrana (Šukalović y col., 2015), en vacuolas, citoplasma y en la pared celular, realizando numerosas funciones fisiológicas. De hecho, está implicada en la regulación hormonal, defensa celular, eliminación del ácido indolacético durante la maduración, senescencia vegetal y en la resistencia a microorganismos a través de procesos de lignificación o de producción de fenoles oxidados.

A causa de las múltiples funciones que desempeña, la POD dispone de diferentes isoformas en los vegetales (Serrano-Martínez y col., 2008).

Esta enzima presenta una elevada afinidad por el sustrato peróxido, siendo el peróxido de hidrógeno el más conocido; sin embargo, la especificidad respecto al sustrato donador de electrones es muy baja. Cuando el medio de reacción presenta una elevada concentración de peróxido de hidrógeno, consigue oxidar a un amplio rango de sustratos tales como: guayacol, pirogalol, ácido clorogénico, catequina y catecol (Onsa y col., 2004). A causa de su actividad oxidativa, la POD está asociada con alteraciones indeseables del color, sabor y valor nutricional de zumos/purés y bebidas vegetales (Etzbach y col., 2019). También se relaciona con el procesamiento de alimentos debido a su alta termoestabilidad y baroestabilidad. De hecho, se utiliza como indicador de la correcta realización de tratamientos térmicos en zumos/purés y bebidas vegetales (Dahili, Kelemen-Horváth y Feczko, 2015).

A causa del rol negativo en la industria agroalimentaria, se han realizado numerosas investigaciones con el fin de estabilizar su actividad mediante el uso del HPP. En un estudio realizado con la POD de puré de fresa, cuando se aplicaron presiones de 400 MPa durante 5 y 10 min, aumentó la actividad de la POD un 13 y 1%, respectivamente (García-Palazón y col., 2004). Otro estudio, observó que esta misma enzima de hierba mate tratada con CO<sub>2</sub> comprimido a 30 °C y 7 MPa, aumentó su actividad un 25%, atribuyéndose a los efectos opuestos de la presión y la temperatura sobre la capacidad de los grupos funcionales de la proteína para interactuar con el agua (Primo y col., 2007).

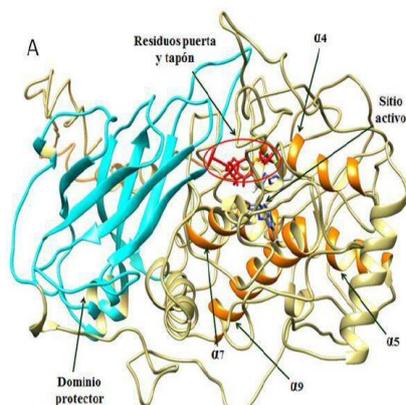
#### *1.5.6.5.4. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre polifenoloxidasas (PPO)*

La polifenoloxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) es una enzima tetramérica con cuatro átomos de cobre, que presenta centros activos para compuestos aromáticos y oxígeno (**Figura 1.18**). Esta enzima cataliza la *O*-hidroxilación de monofenoles (fenoles en los cuales el anillo bencénico contiene un único sustituyente hidroxilo) en *O*-difenoles (fenoles con dos sustituyentes hidroxilo), para posteriormente catalizar la oxidación de los *O*-difenoles en *O*-quinonas; que son moléculas muy reactivas que atacan los componentes celulares.

La rápida polimerización de las *O*-quinonas produce pigmentos de color negro o marrón oscuro, provocando el pardeamiento enzimático de frutas y verduras con lesiones físicas. Como consecuencia del cambio de coloración a marrón oscuro se producen pérdidas en las propiedades organolépticas de zumos/purés y bebidas vegetales (Samborska y col., 2019).

Las actividades de PPO y POD tienen un gran impacto en el sabor y aroma de frutas y verduras ya que los compuestos fenólicos que degradan juegan un papel importante en el sabor amargo, dulce, picante o astringente de dichos productos (Tomas-Barberan y Espin, 2001).

Por ello, la PPO junto con la POD son dos de las oxidoreductasas más conocidas por sus daños, y que a la vez presentan mayor termorresistencia y barorresistencia, de ahí que sean dos focos activos en investigaciones con HPP.



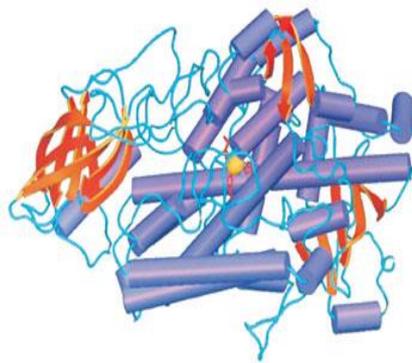
**Figura 1.18.** Estructura de PPO de *Solanum quitoense*  
(<file:///C:/Users/mballesta/Downloads/323654031001.pdf>).

García-Palazón y col., (2004) comprobaron la elevada barorresistencia de esta enzima en puré de fresa, afirmando que solo con HPP 800 MPa a 25 °C se produce una inactivación total.

No obstante, han sido observadas algunas activaciones de PPO en fresa con HPP 690 MPa a 25 °C (Terefe y col., 2010), en zumo de manzana con HPP 450 MPa (Bayindirli y col., 2006) y en puré de mora con HPP 400 MPa durante 5 min (García-Palazón y col., 2004).

#### 1.5.6.5.5. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre lipooxigenasa (LOX)

La lipooxigenasa (LOX, EC 1.13.1.13) es una oxidorreductasa dioxigenasa que contiene hierro en su sitio activo y se encuentra en todo el reino vegetal, especialmente en la familia de las leguminosas (Pellicer y col., 2019) (**Figura 1.19**). Produce la destrucción de la clorofila y provoca alteraciones organolépticas negativas en vegetales congelados, convirtiéndose en un objetivo de inactivación.



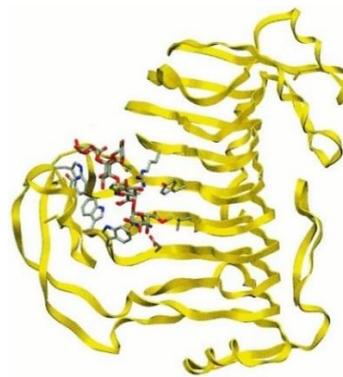
**Figura 1.19.** Estructura de LOX de *Glycine max*  
(<https://www.caymanchem.com/news/lipoxigenases>).

La LOX de guisante tratada con temperaturas  $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y presiones  $< 200\text{ MPa}$ , demostró una elevada resistencia a la inactivación (Indrawati y col., 2001). De manera similar, la LOX de soja tratada a  $200\text{ MPa}$  y  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 min mostró un aumento de su actividad un 120% en comparación con la actividad enzimática residual a  $0,1\text{ MPa}$  (Tedjo, Eshtiaghi y Knorr, 2000). Aunque la LOX generalmente se considera una enzima perjudicial en alimentos, la inactivación inducida por la presión proporciona una evidencia adicional de la función del HPP en la estabilización enzimática.

#### 1.5.6.5.6. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre pectinmetilesterasa (PME)

La pectinmetilesterasa (PME, EC 3.1.1.11) actúa sobre los grupos metoxiester de las pectinas produciendo la desesterificación (Murad y Azzaz, 2011) del enlace metiléster en la posición  $\alpha$ -1,4 de la subunidad galacturonosil, liberando pectato y metanol (Sharma, Rathore y Sharma, 2012) .

La PME en vegetales presenta un tamaño molecular que oscila entre 30-50 kDa (Jolie y col., 2010), una temperatura óptima que oscila entre 40-60 °C, y un pH óptimo que oscila entre 4-8 (Sharma y col., 2011). Se pueden clasificar en Tipo I y Tipo II, según presente o no el dominio PRO (extensión N-terminal). La Tipo I (500-900 aa y 52-105 kDa) presenta de 1 a 3 dominios PRO y 2 ó 3 intrones, mientras que la Tipo II (250-400 aa y 27-45 kDa) no presenta el dominio PRO (Tian y col., 2006) (**Figura 1.20**).



**Figura 1.20.** Estructura de PME de *Erwinia chrysanthemi*  
(<https://www.pnas.org/content/97/16/8762>).

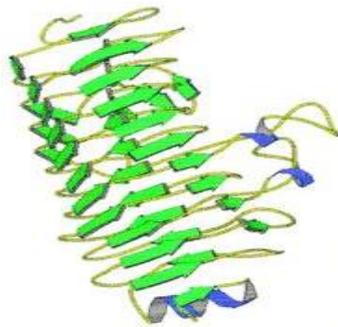
Esta enzima se localiza en todos los órganos de las plantas vasculares, especialmente en los frutos. Y, al estar ligada a la pared celular por medio de enlaces iónicos, se pueden liberar de la misma si se modifican las condiciones del pH o se aplica una alta carga eléctrica. La PME junto con la PG actúa de manera sinérgica produciendo las pérdidas de estabilidad y viscosidad de las pectinas, provocando su precipitación y, por tanto, originando pérdidas en la calidad organoléptica de zumos/purés y bebidas vegetales.

Tradicionalmente la PME se ha inhibido total o parcialmente por pasteurización convencional, sin embargo, el efecto de la temperatura provoca graves alteraciones de los parámetros organolépticos y nutricionales (Deshaware y col., 2019). Actualmente, se está investigando el efecto del HPP sobre la actividad enzimática de la PME en zumos de frutas y verduras, debido a que esta tecnología causa alteraciones mínimas en su calidad (Al-Jammaas, Sultan y Mahmood, 2019).

En smoothies vegetales tratados con HPP 400 MPa durante 5 min, PME apenas se inhibió, por lo que hubo que aumentar la presión hasta 600 MPa durante 3 min para conseguir reducir la actividad residual de PME hasta el 60% (Hurtado y col., 2015). Otros estudios también consiguieron inhibir esta enzima en zumo de naranja tratado con HPP 450 MPa durante 30 min a 50 °C (Bayindirli y col., 2006) y en puré de plátano tratado con HPP 600 MPa durante 2 min (Ly-Nguyen y col., 2002a). En tomate, la PME presenta una elevada barorresistencia (Jayathunge y col., 2019). Sin embargo, también en puré de tomate, Crelier y col., (2001) observaron que esta es menos resistente a la presión en presencia de iones de calcio o con pH ácidos del orden de 3,5 a 4,5. En algunos casos, dependiendo de la temperatura, la presión y la matriz donde se encuentre la enzima, se produce una activación. Así a presiones de entre 100 y 400 MPa con temperaturas suaves (60 °C), se produce la activación de la PME de puré de tomate.

#### 1.5.6.5.7. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre poligalacturonasa (PG)

La poligalacturonasa (PG, EC 3.2.1.15) es una hidrolasa endo o exoglucanasa que hidroliza los enlaces del O-glicosílico de la pectina transformándola en  $\alpha$ -1,4-poligalacturónicos. Las láminas  $\beta$  de esta enzima presentan motivos helicoidales denominados  $\beta$ -hélices. Esta estructura es altamente estable gracias a los numerosos puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro entre las hélices, siendo una característica común de las enzimas involucradas en la degradación de la pectina (D'Ovidio y col., 2004). Su tasa de hidrólisis depende de la longitud de la cadena de polisacáridos (**Figura 1.21**).



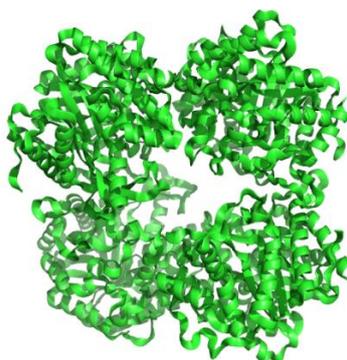
**Figura 1.21.** Estructura de PG de *Fusarium moniliforme* (<https://en.wikipedia.org/wiki/Polygalacturonase>).

La PG se localiza en el reino vegetal especialmente en frutas como el tomate, y su actividad está relacionada con la maduración de la fruta debido a que causa la rotura de la lámina media de las paredes celulares, ablandando los tejidos y, por tanto, alterando la textura de las frutas. Esta despolimerización conduce a una disminución drástica en la viscosidad que se traduce en una pérdida de calidad organoléptica en zumos a base de frutas.

Al contrario de lo que ocurre (ocasionalmente) con la PME, el aumento de la presión y temperatura produce la inactivación de la PG (Illera y col., 2018). Sin embargo, hay autores que observaron que una isoforma de la PG de tomate fue resistente a la presurización prolongada de hasta 600 MPa a 50 °C (Fachin y col., 2002). De hecho, independientemente de la temperatura, la actividad de la PG de puré de tomate aumenta con presiones del orden de 100 y 200 MPa (Verlent y col., 2007). Además, estos autores encontraron que a 50 °C la hidrólisis de la pectina catalizada por PG de puré de tomate (en presencia de PME) permaneció constante cuando aumentó la presión.

#### 1.5.6.5.8. Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -GL)

La  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -GL, EC 3.2.1.21) es una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de aril y alquil  $\beta$ -D-glucósidos relacionados con el metabolismo y el crecimiento de las plantas (Orruno, Apenten y Zabetakis, 2001) (**Figura 1.22**). Esta enzima provoca la liberación de agliconas volátiles de glucósidos no volátiles potenciando el sabor (García-Palazón y col., 2004).



**Figura 1.22.** Estructura de  $\beta$ -GL de *Clostridium cellulovorans* (<https://es.wikipedia.org/wiki/%CE%92-gluco%20sidasa>).

La tecnología HPP resulta útil en zumos de fresas y frambuesas pudiendo (según la cantidad de presión ejercida) inactivar algunas enzimas alterantes de las propiedades nutricionales y organolépticas, a la vez de activar otras enzimas que potencian el sabor.

En zumos de fresas tratadas con HPP a 400 MPa, la actividad de la  $\beta$ -GL aumentó un 76%, mientras que en zumos de frambuesas tratadas con HPP a 400 MPa solo aumentó un 2% (García-Palazón y col., 2004).

Por otro lado, la  $\beta$ -GL de *Sulfolobus solfataricus* también se activó a presiones de entre 0,1 y 250 MPa, alcanzando su pico de actividad con 125 MPa.

## 1.6. APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

### 1.6.1. Aprovechamiento y valoración integral de subproductos

La diferenciación del concepto de subproducto y residuo se hace necesaria dada la frecuencia con la que se tiende a confundir ambos términos.

La Directiva (UE) 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre los residuos por la que se derogan determinadas Directivas, define en el apartado 1 de su artículo 3 el término de residuo como “cualquier sustancia u objeto del cual su poseedor se desprenda o tenga la intención o la obligación de desprenderse” y el de subproducto como “sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto”, debiendo reunir este las siguientes características:

- La sustancia u objeto va a ser utilizada posteriormente.
- No necesita una transformación posterior distinta a la práctica industrial.
- La sustancia u objeto es el resultado de un proceso de producción.
- El uso de este está sujeto a la legalidad vigente, cumpliendo todos los requisitos pertinentes (dos Santos y col., 2012).

Dentro de la industria agroalimentaria, el sector de los transformados vegetales es uno de los más dinámicos. La actividad de estas industrias se centra en el procesamiento de materia prima vegetal mediante técnicas de conservación e incluyen las industrias dedicadas a la conserva de hortalizas y verduras, fabricación de zumos, concentrados, néctares de frutas y hortalizas, y congelados de frutas y hortalizas (Majerskaa , Michalskab y Figiela, 2019).

Todas estas actividades de procesamiento de materia prima vegetal generan grandes cantidades de subproductos orgánicos, que hasta ahora se han estado utilizando únicamente en la industria energética como fuentes alternativas de energía (biogás, bioetanol, biohidrógeno, etc) y en la industria agraria, donde se usan como enmienda orgánica de suelos o como sustrato para los cultivos. También han resultado de aplicación en alimentación animal, cuyos aspectos legales quedan reflejados en la Directiva (UE) 2018/850 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018 (Galanakis, 2013).

Sin embargo, estudios recientes han destacado que el valor añadido de algunos componentes de estos subproductos los hace de gran utilidad para la industria alimentaria humana, farmacéutica, cosmética y química. Algunos ejemplos de ellos son compuestos bioactivos tales como polifenoles, fitoestrógenos, isoprenoides, ácidos grasos vegetales, compuestos organosulfurados y monoterpenos, compuestos antimicrobianos, compuestos aromáticos, vitaminas, pectinas, aromas, sabores, ácidos, compuestos grasos, etc (Ahmed y col., 2015).

### **1.6.2. Importancia nutricional del subproducto de gazpacho**

Tal y como se ha mencionado, la posibilidad de que los subproductos del procesamiento de vegetales puedan ser aprovechados en diversas industrias por las propiedades nutricionales y tecnológicas que poseen (Roda y Lambri, 2019), genera oportunidades de negocio y nichos de mercado potenciales.

Dentro del sector de la industria del procesamiento de vegetales destaca, por su nivel de comercialización, el gazpacho. Así, debido a su elevado volumen de producción, resulta especialmente interesante el aprovechamiento industrial de los subproductos vegetales derivados de su elaboración (**Figura 1.23**).

En este contexto, conviene describir las características funcionales de cada uno de los ingredientes que lo constituyen (tomate, pepino, pimiento, cebolla y ajo) desde el punto de vista nutricional.



**Figura 1.23.** *Subproducto de gazpacho elaborado en el estudio.*

Todos los ingredientes utilizados en su elaboración contienen cantidades elevadas de fibra, antioxidantes y polifenoles, por lo que resulta de interés describir las características funcionales de los mismos. Respecto a la fibra dietética, su falta se ha relacionado con la presencia de enfermedades como constipación, diverticulosis, hemorroides, cáncer de colon, diabetes, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Nicoletti, 2012; Bigliardi y Galati, 2013). La definición del concepto de fibra no resulta sencilla, pues no es una entidad homogénea, ni tampoco existe una forma de medir analíticamente todos sus componentes bioactivos. Aun así, algunos autores la han definido como «un conjunto de macromoléculas de origen vegetal no digeribles por las enzimas digestivas del hombre» (Valenzuela y col., 2014). Por otra parte, se ha descrito con un concepto que hace referencia a diversos carbohidratos y a la lignina, que resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas, pero que pueden ser fermentadas por la microflora del colon dando lugar a  $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$  y ácidos grasos de cadena corta (Rodríguez, Megías y Baena, 2003).

En términos generales, la importancia nutricional de la fibra dietética radica en que ejerce un efecto preventivo para distintas enfermedades y contribuye al mantenimiento de la salud. Según la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), la cantidad máxima de fibra ingerida al día no debe superar los 5 g, siendo esta cantidad de entre 25-30 g a partir de los 18 años siempre que su aporte no provenga de suplementos alimenticios. Igualmente, la proporción fibra insoluble/fibra soluble deber ser de 3/1 (75% insoluble por cada 25% soluble).

Esta proporción cambia en personas mayores, en las que se recomienda una relación del orden de 1/1. Asimismo, el valor calórico de la fibra es de 2 Kcal/g pues “se considera fermentable el 70% de la fibra alimentaria en alimentos tradicionales”, y deber ser incluido en el etiquetado de los alimentos por recomendación de la FAO, estando también presente esta recomendación en la normativa más actual sobre etiquetado nutricional (Real Decreto 1669/2009) y en la correspondiente Directiva 2008/100/CE de la Comisión, de 28 de Marzo de 2008 (López-Alarcón y Denicola, 2013).

Por su parte, los antioxidantes también son interesantes desde el punto de vista industrial. Éstos se definen como sustancias químicas capaces de prevenir o retardar la oxidación de cualquier otro sustrato biológico oxidable cuya concentración es mucho más elevada. Éstos reaccionan con los radicales libres, que pierden su reactividad y los antioxidantes se oxidan como consecuencia de la reacción, ganando estabilidad química.

Por último, los polifenoles quedan definidos químicamente como sustancias que poseen un anillo aromático que contiene uno o más grupos hidroxilo, constituyendo uno de los principales grupos de metabolitos secundarios de las plantas. Entre ellos destacan, por su presencia más común en los alimentos, los ácidos fenólicos, las cumarinas, los flavonoides y los taninos (muchos de los cuales poseen una marcada actividad antioxidante) (Ruíz-Moreno y col., 2015).

#### *1.6.2.1. Importancia nutricional del subproducto de tomate*

El proceso de transformación del tomate genera algunos residuos como pueden ser la piel y las semillas, los cuales representan de un 3 a un 5% del peso seco (Ahmed y col., 2015). Varios estudios han avalado su uso como subproductos dadas sus cualidades nutricionales. El uso principal de los subproductos del tomate, siendo importante en la economía rural, es la alimentación del ganado. En este aspecto, cada vez son más los estudios que resaltan las cualidades beneficiosas del uso de estos subproductos; que se suelen usar secos y molidos para reducir al máximo el porcentaje de humedad y alargar así su perdurabilidad (**Figura 1.24**). Concretamente, en el sector de la avicultura tienen una gran utilidad en la pigmentación de la yema del huevo, en la grasa subcutánea y en la piel de las aves para su comercialización (Passo-Tsamo y col., 2015).

Sin embargo, otros estudios observan la actividad antioxidante y antiproliferativa de los carotenoides y antioxidantes de la piel del tomate en cultivos celulares, corroborando su uso como recurso nutracéutico y como alimento funcional (Lavelli y col., 2014).

En esta misma línea, también se demostró que la cantidad de polifenoles totales, así como su actividad antioxidante era similar tanto en pieles y semillas de tomates procesados como de los no procesados (Tseng y Zhao, 2013).

Otros estudios más innovadores centrados en el método de la microencapsulación mediante ciclodextrinas y por fluidos supercríticos del licopeno (Sharma y col., 2015; Xu y col., 2015), resultan de gran interés al presentar las ventajas de tener una mayor estabilidad del núcleo frente a factores ambientales, una menor velocidad de transferencia del material encapsulado al exterior, un control sobre la liberación del núcleo y la posibilidad de enmascarar el sabor del mismo.



**Figura 1.24.** Subproducto de tomate elaborado en el estudio.

#### 1.6.2.2. Importancia nutricional del subproducto de pimienta

Los principales subproductos generados a partir del pimienta son el corazón o pericarpio, la piel y las semillas (**Figura 1.25**); siendo también objeto de numerosos estudios (Ahmed y col., 2015).

Melo-Sabogal y col., (2015) han demostrado que el uso de los subproductos del pimiento en combinación con purines de cerdo aumentó en un 44% la producción de metano respecto del uso únicamente de purines de cerdo, siendo de interés en la generación de fuentes de energía alternativas.

Otro estudio, consistió en la realización de la prueba de Ames sobre cepas de *Salmonella spp.* para comprobar la antimutagenicidad de los extractos de metanol derivados del pericarpio del pimiento rojo demostrando su capacidad antimutagénica y antioxidante.



**Figura 1.25.** Subproducto de pimiento elaborado en el estudio.

Por otro lado, también se está estudiando la posibilidad de utilizar el aceite de semilla de pimiento en frituras. Así, trabajos realizados acerca de la estabilidad térmica oxidativa de dicho aceite a 140 °C (para estudiar su rancidez) revelan que esta estabilidad térmica se encuentra asociada a la presencia de los compuestos capsaicina y tocoferol.

#### 1.6.2.3. Importancia nutricional del subproducto de pepino

Una de las aplicaciones de los subproductos del pepino es el de la producción de biomasa en cultivos de levaduras. Así, un estudio, demostrando que

la adición de piel de pepino y de naranja a cultivos de *S. cerevisiae* derivó en un incremento del rendimiento de la producción de proteínas por fermentación sumergida de los mismos (Stajčić y col., 2015).



**Figura 1.26.** *Subproducto de pepino elaborado en el estudio.*

También en la ganadería caprina, los subproductos del pepino y del tomate tienen una importante aplicación, pues se ha probado que la complementación de estos al forraje, sustento básico de estos animales, supone, por un lado, una economización del gasto y una alimentación de mayor calidad.

Esta alimentación suplementaria es especialmente útil cuando existe una baja disponibilidad y/o calidad de los pastos o cuando los animales en producción requieren de mayores demandas nutritivas; ya que se ha comprobado que la concentración de lactosa en la leche producida por el ganado caprino disminuye cuando la relación forraje/subproducto presente en la dieta es baja (Poojary y Passamonti, 2015).

#### *1.6.2.4. Importancia nutricional del subproducto de cebolla*

Sus principales aplicaciones están relacionadas con su contenido en fibra dietética, útil en alimentación humana, y con sus cualidades como nutracéutico, debido a la imposibilidad de su uso en alimentación animal (por sus propiedades organolépticas incompatibles) y en agricultura.

Para ello, se suelen usar cebollas excedentes que no se comercializan (por tener un pequeño tamaño, leves imperfecciones o por la ausencia de la túnica exterior, quemaduras en las capas exteriores o presencia de brotes (**Figura 1.27**)) y subproductos que son, de forma general, la túnica y las dos primeras capas de la cebolla (Abid y col., 2017).



**Figura 1.27.** Subproducto de cebolla elaborado en el estudio.

Desde el punto de vista nutracéutico, la cebolla posee fuertes propiedades antiinflamatorias y antiinfecciosas, en parte asociadas a la presencia de ciertos compuestos azufrados denominados tiosulfonatos. Además, posee marcados efectos antifúngicos y antibacterianos. Estas características resultan de interés para la obtención de geles a base de extractos de cebolla que, con una pureza del 50%, tienen la capacidad de aliviar y cicatrizar quemaduras superficiales de primer y segundo grado en humanos, aliviando el ardor, evitando la aparición de ampollas y contribuyendo a la cicatrización (Abid y col., 2017).

Desde el punto de vista industrial, resulta interesante la caracterización de estos subproductos para conocer como resultan afectadas sus propiedades funcionales y organolépticas por los frecuentes procesos de conservación y estabilización que se realizan para su comercialización, como la congelación, la pasteurización y la esterilización. En concreto, un estudio encontró que el uso de estos subproductos para la obtención de alimentos funcionales enriquecidos en fibra como pasta y bagazo ofrecía resultados satisfactorios por mantener de forma

considerable algunas o todas las propiedades específicas de esta hortaliza. Con respecto a la pasta, se comprobó que esta conservaba todas las características específicas de la cebolla, incluyendo el aroma. El bagazo, por su parte, contenía gran cantidad de fibra alimentaria y mantenía ciertas características específicas como el efecto prebiótico y la presencia de compuestos azufrados (Abid y col., 2017).

Investigaciones más recientes han demostrado la aplicación de las capas externas de la cebolla blanca y morada, junto con la raíz de remolacha en el sector de la industria textil. En concreto, resultan de utilidad para la obtención de colorantes naturales como alternativa a la utilización de los colorantes sintéticos, que han sido relacionados con diversos efectos tóxicos o perjudiciales para la salud, así como con efectos ambientales contaminantes. Para este fin, es necesaria su complementación con mordientes como sulfato de hierro heptahidratado y limón para la cebolla blanca y sulfato de cobre pentahidratado y limón para la cebolla morada, los cuales permiten obtener una fijación del color homogénea tras el lavado (Ruiz-Cano y col., 2014).

#### *1.6.2.5. Importancia nutricional del subproducto de ajo*

Dentro de los subproductos del ajo, los procedentes del bulbo y las pieles son los más comúnmente utilizados en la industria por lo beneficios nutricionales que aporta (**Figura 1.28**), como se ha demostrado en numerosos estudios.



**Figura 1.28.** Subproducto de ajo elaborado en el estudio.

En lo que respecta a las propiedades funcionales, poseen compuestos bioactivos de gran valor con marcada actividad antioxidante, es decir, contribuyen al equilibrio oxidativo celular tanto por el incremento de la actividad antioxidante de las enzimas intracelulares como por la protección del ADN frente a radicales libres (Belloir y col., 2006), además de actuar como agente quelante de iones  $\text{Cu}^{2+}$  y de proteger a moléculas como el LDL de la oxidación (Dillon y col., 2003).

El ajo ha sido empleado en el tratamiento de procesos infecciosos provocados por distintos agentes patógenos. Tanto la alicina como distintos extractos de ajo se muestran activos "*in vitro*" frente a un amplio espectro de bacterias (Ross y col., 2001).

Dikasso y col., (2002) estudiaron la actividad antibacteriana de extractos crudos de ajo contra bacterias causantes de la neumonía, observando que a concentraciones de 7,8 mg/mL se inhibía el crecimiento de los cultivos de estreptococos, mientras que el *Klebsiella pneumoniae* fue menos sensible, necesitándose concentraciones de 24,38 mg/mL de extracto.

### **1.6.3. Utilización de subproductos**

#### *1.6.3.1. Aplicación de subproductos en panadería*

En la industria panadera la complementación nutritiva persigue dos objetivos que responden a necesidades diferentes. En el caso de los países en vías de desarrollo se pretende combatir la desnutrición mediante la aportación de mayor valor proteico a los productos de panadería, teniendo en cuenta que éstos constituyen su principal fuente de alimento.

Por otro lado, en los países desarrollados el objetivo se centra en la búsqueda de productos con valor añadido que resulten atractivos al consumidor. En este contexto, las ventajas de la utilización de los subproductos vegetales son entre otras: contribución a la disminución de los niveles de contaminación, su rentabilidad económica y que amplía el abanico de alimentos destinados a colectivos especiales como celíacos o vegetarianos.

Hay estudios que utilizan harinas vegetales para elaborar productos de panadería y pastelería. En un trabajo, se elaboraron grisines a partir de harina de espárrago blanco, concluyendo en los análisis que la concentración máxima de harina aceptable era del 20% debido a que la harina de espárrago presenta un ligero amargor (Capriles y Arêas, 2014).

Otro estudio utilizó la okara (subproducto de la elaboración de tofu o leche de soja) para la fabricación de galletas dulces, el cual contiene un 50% de fibra dietética, un 25% de proteína y un 10% de lípidos y otros nutrientes. El resultado fue la obtención de un alimento saludable que ejercía un efecto preventivo sobre enfermedades como la diabetes, la obesidad y la hiperlipidemia (Frankel y col., 2013; Górnas, 2015).



## **II – OBJETIVOS**



## II – OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es mejorar las propiedades organolépticas y nutricionales del puré de tomate y gazpacho procesándolos con altas presiones hidrostáticas. Para la consecución de este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar cinéticamente las principales enzimas vegetales que alteran la calidad en puré de tomate (POD, PME y PG), estudiando el efecto combinado de altas presiones hidrostáticas con diferentes pH y temperaturas.

2. Realizar un estudio de vida útil en puré de tomate y gazpacho procesados con diferentes temperaturas y altas presiones hidrostáticas, aplicando las mejores condiciones de inactivación enzimática obtenidas, para determinar la efectividad del mismo.

3. Aprovechar íntegramente los subproductos generados en la producción del gazpacho, incorporándolos en la formulación de una nueva receta comercial de productos de panadería.



## **III – MATERIAL Y MÉTODO**



### III – MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1. PLAN DE TRABAJO

Esta tesis doctoral se ha centrado en la aplicación de tecnologías emergentes del procesado de alimentos (HPP), actualmente disponibles en la industria, para inactivar parcial o totalmente las enzimas implicadas en el deterioro de purés/zumos y bebidas vegetales, a la vez de rebajar la carga microbiológica a valores seguros y minimizar las pérdidas cualitativas de los parámetros organolépticos y nutricionales. Se escogió el puré de tomate debido a la elevada actividad enzimática y carga microbiológica que poseen, y porque constituye la base del gazpacho, una de las bebidas vegetales de mayor comercialización en España.

Al iniciar el estudio, se extrajeron y caracterizaron cinéticamente tres de las principales enzimas implicadas en la degradación de zumos y bebidas vegetales (POD, PME y PG) en puré de tomate.

Una vez caracterizadas y obtenidas las condiciones óptimas para su cuantificación, se escogió POD como enzima modelo por su elevada actividad en tomate frente a las dos anteriores y se realizaron incubaciones a distintas temperaturas, combinaciones de temperaturas frente a pH, y combinaciones de temperaturas/pH frente a ciclos de altas presiones hidrostáticas, obteniéndose las mejores condiciones para su inactivación en puré de tomate.

Posteriormente, se desarrollaron estudios de vida útil en puré de tomate aplicando las mejores condiciones de inactivación enzimática encontradas en los estudios anteriores.

Seguidamente, tras seleccionar las mejores condiciones de tratamiento en el estudio de vida de puré de tomate, se realizó otro estudio de vida útil para gazpacho.

Como resultado de las producciones del gazpacho se obtuvieron subproductos que fueron analizados e incorporados en la formulación de grisines.

En la **Figura 3.1** se muestra el diagrama de flujo del plan de trabajo llevado a cabo.

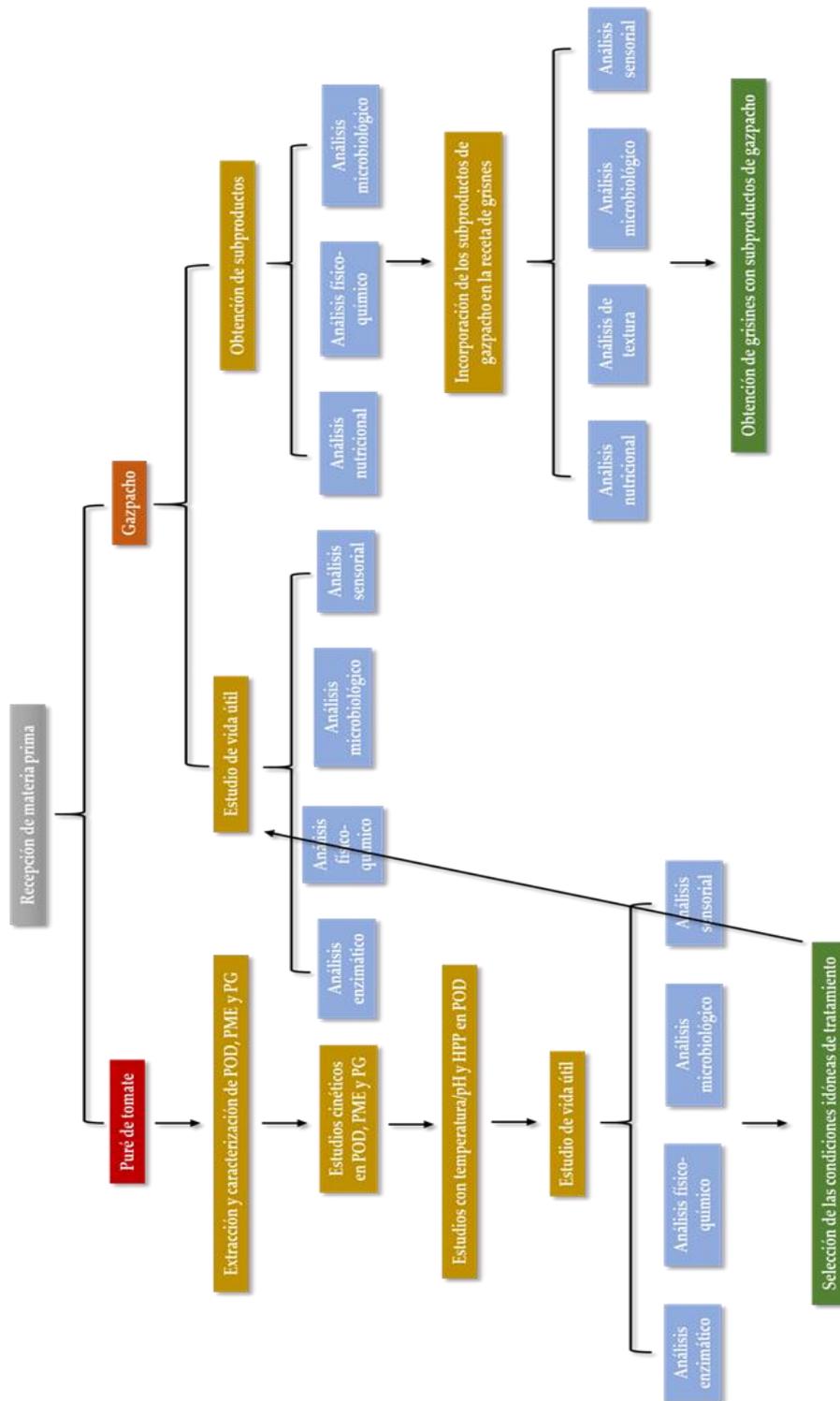


Figura 3.1. Diagrama de flujo del plan de trabajo.

### 3.2. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL PURÉ DE TOMATE, GAZPACHO, SUBPRODUCTO DEL GAZPACHO Y GRISINES A BASE DE LOS SUBPRODUCTOS DEL GAZPACHO

Los tres ingredientes utilizados en esta tesis doctoral como materia prima, puré de tomate, gazpacho y subproductos del gazpacho, fueron suministrados por AMC INNOVA S.L. (Espinardo, Murcia).

#### 3.2.1. Elaboración del puré de tomate

Para la preparación del puré de tomate, los tomates se seleccionaron, pesaron (45 Kg) y lavaron en una lavadora de vegetales (FMA, 2010). Seguidamente, se procedió al pelado y cortado de los tomates en una cortadora URSHEL® (GKA DICER, 2006). Posteriormente, se trituraron utilizando una trituradora industrial (SAMMIC, 2008), e inmediatamente se tamizaron en un tamiz con luz de malla de 1,6 mm (FMA, 2005), obteniendo finalmente el puré.

El puré obtenido tuvo 6,11 °Brix, pH 4,5 y una acidez de 0,65 g de ácido cítrico/100 mL de muestra.

Una vez elaborado el puré, para realizar la caracterización cinética y los estudios enzimáticos (mostrados en el **Apartado 4.1**) fue tratado con diferentes tratamientos: TT 20-90 °C durante 5-30 min, respectivamente; TT 20-90 °C durante 5 min, y pH 2,5-4,5, respectivamente; pH 2,5-4,5, y HPP 400-600 MPa durante 3 min, respectivamente; TT 20-90 °C durante 5 min y HPP 400-600 MPa durante 3 min, respectivamente.

En el **Apartado 4.2** el pH fue ajustado con zumo de limón a un valor de 3,8, obteniéndose una acidez de 0,74 g de ácido cítrico/100 mL de muestra.

Para llevar a cabo el estudio de vida útil en puré de tomate, comparando entre diferentes combinaciones de HPP y temperaturas suaves frente a pasteurización normal (**Apartado 4.2**) fue tratado con diferentes tratamientos: TT 90 °C durante 5 min; TT 70 °C durante 5 min y HPP 400 MPa durante 3 min; TT 65 °C durante 5 min y HPP 500 MPa durante 3 min; TT 60 °C durante 5 min y HPP 600 MPa durante 3 min (al control no se le aplicó ningún tratamiento) (**Figura 3.2**).

Concluidos los tratamientos, fue almacenado en botellas de plástico PET 1/cristal a - 80 °C (**Apartado 4.1**) y 4 °C (**Apartado 4.2**) hasta su posterior análisis.



**Figura 3.2.** Evolución durante el almacenamiento de los envases con el puré de tomate (ajustado a pH 3,8) tratado según los tratamientos empleados en el **Apartado 4.2.**

### 3.2.2. Formulación y elaboración del gazpacho

Para la preparación del gazpacho, los vegetales (tomate, pepino, pimiento verde, cebolla, zumo de limón y ajo) se seleccionaron y lavaron en una lavadora de vegetales (FMA, 2010).

Seguidamente, se procedió al pelado y cortado de los vegetales en una cortadora URSHEL® (GKA DICER, 2006).

Posteriormente, los vegetales se trituraron utilizando una trituradora industrial (SAMMIC, 2008) e inmediatamente se tamizaron en un tamiz con luz de malla de 1,6 mm (FMA, 2005), obteniendo una mezcla homogénea.

A esta mezcla, se le añadió agua, sal y aceite de oliva virgen extra. El pH fue ajustado con zumo de limón a un valor de 4.

La proporción de cada ingrediente se indica en la **Tabla 3.1.**

**Tabla 3.1.** *Formulación del gazpacho elaborado en el estudio.*

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad (g/ 100g)</b>
<b>Tomate</b>	70,0 ± 3
<b>Pepino</b>	15,0 ± 3
<b>Pimiento</b>	10,0 ± 1
<b>Cebolla</b>	3,0 ± 0,2
<b>Z. limón</b>	0,2 ± 0,02
<b>Ajo</b>	1,0 ± 0,1
<b>AOVE</b>	3,0 ± 0,3
<b>Sal</b>	0,6 ± 0,1

El gazpacho obtenido tuvo 5,5 °Brix, pH 4 y una acidez de 0,32 g de ácido cítrico/100 mL de muestra.

Una vez elaborado el gazpacho, para llevar a cabo el estudio de vida útil comparando entre temperatura suave, HPP con temperatura suave y pasteurización convencional (**Apartado 4.3**) fue tratado con los siguientes tratamientos: TT 90 °C durante 5 min; TT 60 °C durante 5 min; TT 60 °C durante 5 min y HPP 600 MPa durante 3 min (al control no se le aplicó ningún tratamiento) (**Figura 3.3**).

Por último, fue almacenado en botellas de plástico PET 1/cristal a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta su posterior análisis.



**Figura 3.3.** Evolución durante el almacenamiento de los envases con el gazpacho (ajustado a pH 4) tratado según los tratamientos empleados en el **Apartado 4.3**.

### 3.2.3. Elaboración de los subproductos del gazpacho

Todos los subproductos obtenidos de la elaboración del gazpacho (tomate, pepino, pimiento, cebolla, limón y ajo) se mezclaron originando el subproducto de gazpacho (**Figura 3.4**).

Al ser un producto altamente perecedero y fácilmente contaminable, se proporcionó en formato líquido parcialmente reconstituido con agua mineral 50:50 (v/v); se trató con un TT 110 °C durante 3 min y se dispuso en envases asépticos de 2 Kg para su incorporación en la receta de grisines, así como, la realización de los análisis.



**Figura 3.4.** *Subproducto del gazpacho elaborado en el estudio, y subproductos constituyentes del mismo.*

### 3.2.4. Formulación y elaboración de grisines a base de los subproductos del gazpacho

Para la obtención de los grisines se utilizó el subproducto del gazpacho estéril en formato líquido, parcialmente reconstituido con agua mineral 50:50 (v/v).

Para elaborar los grisines se siguieron las recomendaciones establecidas en las Buenas Prácticas de Fabricación. De esta manera, una vez establecido el protocolo de la elaboración se elaboraron 3 recetas diferentes.

Una de ellas fue la receta del grisín normal, mientras que las otras dos (señaladas a partir de ahora en el trabajo como prototipo 1 y 2) se correspondieron con formulaciones en las que se incorporaba el subproducto del gazpacho en diferentes cantidades (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2.** *Formulación de los tres modelos de grisines elaborados en el presente estudio.*

<b>Ingredientes</b>	Grisín normal (g)	Grisín prototipo 1 (g)	Grisín prototipo 2 (g)
<b>Harina floja</b>	78,0 ± 3	78,0 ± 3	44,0 ± 3
<b>Harina fuerte</b>	78,0 ± 3	78,0 ± 3	44,0 ± 3
<b>Agua mineral</b>	86,0 ± 1	41,70 ± 1	-
<b>Levadura</b>	3,50 ± 0,2	3,50 ± 0,2	3,50 ± 0,2
<b>Sal</b>	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2
<b>AOVE</b>	10,0 ± 1	10,0 ± 1	10,0 ± 1
<b>Subp. gazpacho</b>	-	80,0 ± 2	67,92 ± 2

Para sustituir la cantidad de agua de la formulación normal del grisín por subproducto del gazpacho, fue necesario estimar el contenido en seco del subproducto. Se realizó separando la parte sólida de la líquida mediante centrifugación (4.000 rpm durante 10 min), determinando que la muestra presentaba un 55,7% de agua.

Tras esto, se estableció que el grisín prototipo 1 incorporara 80 g del subproducto del gazpacho (con 44,3 g agua de gazpacho), rectificando hasta los 86 g necesarios, con 41,7 g de agua mineral.

Por su parte, para el prototipo 2 se tuvo en cuenta la cantidad de agua y de sólido del subproducto de gazpacho. Es decir, que toda el agua que tuviese la receta la incorporara el subproducto del gazpacho; por lo que, se incorporaron 155,3 g de subproducto. Y se rectificó la cantidad de las harinas para mantener la misma relación de sólido/líquido de la receta.

Tras pesar los ingredientes, se procedió a su mezclado y amasado; resultando que a la masa del prototipo 1 le faltaba harina, puesto que al trabajarla

estaba pegajosa; y que, la receta del prototipo 2 o podía formar una masa consistente al sobrarle mucho líquido, lo que determinó disminuir la cantidad de subproducto de gazpacho de la receta del prototipo 2 a 67,92 g.

El proceso de elaboración de los tres tipos de grisines desarrollados en el estudio se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar, se procedió al pesado y mezclado de los ingredientes (para el mezclado se añadieron todos los líquidos menos el agua que se hizo a la mitad; y en último lugar se añadió la sal. De esta manera, se unieron los dos tipos de harinas, con el aceite de oliva virgen extra, la levadura y la mitad del agua. Este caso fue para la elaboración del grisín normal.

Para el grisín prototipo 1, se añadió el agua y la mitad del subproducto del gazpacho.

Y para el grisín prototipo 2, se añadió solo la mitad del subproducto del gazpacho.

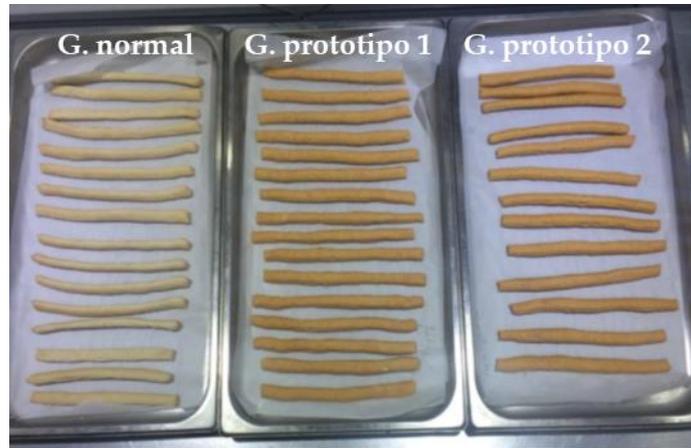
A continuación, se amasó la masa del grisín, primero con dos dedos, y después con toda la mano. Se dejó reposar 3 min la masa y se boleó.

Seguidamente, se dejó reposar 15 min (tiempo en el que aumentó el volumen), y se extendió con un rodillo, hasta que alcanzó un grosor aproximado de 0,5 cm.

Una vez que alcanzo el grosor, la masa fue cortada en forma de bastones con ayuda de un cuchillo y una regla, con las medidas aproximadas de 1,5 cm x 23 cm.

Para las cantidades establecidas en la receta final se obtuvieron unos 15 grisines de unos 22 cm de largo cada uno, en las masas de grisín normal y prototipo 1, con un peso medio de 13,61 g 15,83 g, respectivamente; y 12 grisines para el prototipo 2 con un peso medio de 14,52 g (**Figura 3.5**).

Finalizada esta parte, se hornearon los bastones a 180 °C durante 30 min.



**Figura 3.5.** *Grisines elaborados en el estudio.*

### 3.3. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS TÉRMICOS Y ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

#### 3.3.1. Tratamientos térmicos

Se establecieron diversos tratamientos térmicos para los **Apartados 4.1, 4.2** y **4.3**. Las muestras del puré de tomate y gazpacho fueron incubadas en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L y controladas con un termómetro digital Silcook Pincha Carne T-50-300 (garantizando la estabilidad de la temperatura), durante el tiempo y la temperatura que se consideraron oportunos en cada estudio.



**Figura 3.6.** *Pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L.*

### 3.3.2. Altas presiones hidrostáticas

El tratamiento por HPP consistió en la pascalización a una temperatura inicial de 4 °C, temperatura de trabajo viable desde el punto de vista industrial, puesto que evita el sobrecalentamiento del puré de tomate/gazpacho durante el tratamiento. Se utilizó un equipo industrial Hiperbaric (Hiperbaric 135, Burgos, España). Los principales parámetros del sistema de HPP fueron: rendimiento 760 kg/h, capacidad de los buques 135 L, diámetro del interior de los buques 300 mm y potencia 227 KW. La medición de la presión se hizo con un transductor de presión IS-20H (Wika, Lawrenceville, EE.UU.) capaz de medir presiones de 0 a 600 MPa. La temperatura inicial del agua situada en la entrada del buque fue medida por un sensor de temperatura Pt100 (IFM electrónico, El Prat de Llobregat, España).

Se ensayaron tres condiciones diferentes de pascalización (400, 500 y 600 MPa) para los **Apartados 4.1** (parcialmente) y **4.2**, y una condición de pascalización (600 MPa) para el **Apartado 4.3**.

Para cada presión el tiempo de retención fue 3 min y el tiempo total de procesamiento fue de 5 min y 8 s. Con tales parámetros el aumento de la temperatura estuvo por debajo de 3 °C por cada incremento de 100 MPa, lo que indica que la temperatura de la muestra estuvo por debajo de 25 °C a 600 MPa.



**Figura 3.7.** *Equipo industrial Hiperbaric (Hiperbaric 135, Burgos, España).*  
([www.hiperbaric.com/es/aplicaciones](http://www.hiperbaric.com/es/aplicaciones)).

### 3.4. ANÁLISIS ENZIMÁTICO

Para estudiar el efecto de los tratamientos térmicos y no térmicos en tres de las principales enzimas (POD, PME y PG) implicadas en la degradación de zumos y bebidas vegetales, se realizaron extracciones y caracterizaciones en puré de tomate y gazpacho, así como estudios de inactivación térmica, por pH y por HPP en puré de tomate para elegir las mejores condiciones de inhibición a utilizar en los estudios de vida útil en puré de tomate (**Apartado 4.2**) y gazpacho (**Apartado 4.3**).

#### 3.4.1. Actividad peroxidasa

##### 3.4.1.1. Extracción de peroxidasa

Una alícuota con 50 mL de puré de tomate o gazpacho se homogeneizó en un Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany) durante 7 min. El homogenizado, se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se extrajo el sobrenadante y se filtró a través de una jeringa con filtro Minisart SRP2 0,2 µm, obteniéndose el extracto enzimático, que se almacenó a -80 °C.

##### 3.4.1.2. Medición de la actividad peroxidasa

POD fue determinada espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1063, usando como sustrato ABTS<sup>•+</sup> [ácido 2,2`azinobis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico], a 414 nm ( $\epsilon_{414} = 31,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Rodríguez-López y col., 2000). Una unidad enzimática es la cantidad de enzima que produce 1 µmol del radical ABTS<sup>•+</sup> por minuto. El medio de reacción estándar contenía (a 25 °C) en tampón acetato de sodio 100 mM, pH 3,5, 3 mM de ABTS<sup>•+</sup>, 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20 µL del extracto enzimático crudo, en un volumen final de 1 mL.

##### 3.4.1.3. pH óptimo de peroxidasa

El pH óptimo se determinó midiendo la actividad POD en un medio de reacción estándar, que contenía tampón acetato sódico 100 mM (pH 3-5), tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6-7,5) y tampón borato sódico 100 mM (pH 8-9).

#### 3.4.1.4. Caracterización cinética de peroxidasa

Para determinar los parámetros cinéticos ( $K_M$  y  $V_m$ ) se estudió el efecto de la concentración de ABTS<sup>•+</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la actividad POD en puré de tomate. Se estudió el efecto de la concentración de ABTS<sup>•+</sup>, aumentando de 0 a 5 mM en el medio de reacción estándar y manteniendo fija a 2 mM la [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. También se estudió el efecto de la [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] en la actividad POD, por ello su concentración aumentó de 0 a 60 mM en el medio de reacción estándar, y se mantuvo una concentración fija de ABTS<sup>•+</sup> (3 mM).

#### 3.4.1.5. Estabilidad térmica de peroxidasa

La estabilidad enzimática de POD fue determinada a diferentes temperaturas y tiempos de incubación incubando alícuotas de 100 mL de puré de tomate en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L, a diferentes temperaturas (20, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 90 °C) y a distintos tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min). Después de calentar, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y la actividad enzimática de POD se determinó en las condiciones óptimas.

#### 3.4.1.6. Efectos del pH y temperatura sobre la actividad peroxidasa

La actividad enzimática de POD a diferentes pH y temperaturas se determinó ajustando alícuotas de 100 mL de puré de tomate a valores de pH 2,5, 3, 3,5, 4 y 4,5 (cada valor fue ajustado con ácido cítrico). Posteriormente, cada una de estas alícuotas ajustadas a los distintos pH, se incubaron a temperaturas de 20, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 90 °C durante 5 min en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L. Las muestras se enfriaron en un baño de hielo y la actividad POD se determinó en las condiciones óptimas.

#### 3.4.1.7. Efectos del pH/temperatura y las altas presiones hidrostáticas sobre la actividad peroxidasa

La actividad enzimática de POD se determinó incubando alícuotas de 100 mL de puré de tomate, a valores de temperatura de 20, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 90

°C durante 5 min en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L. Posteriormente, cada una de estas alícuotas tratadas a distintas temperaturas se presurizaron con diferentes presiones 400 MPa, 500 MPa y 600 MPa (3 min) durante 1 y 3 ciclos en un presurizador industrial Hiperbaric (Hiperbaric 135, Burgos, España). Tras los tratamientos las muestras se almacenaron a - 80 °C hasta su posterior análisis.

De igual modo, se realizó otro estudio para POD ajustando alícuotas de 100 mL de puré de tomate a valores de pH 2,5, 3, 3,5, 4 y 4,5 (cada valor fue ajustado con ácido cítrico). Posteriormente, cada una de estas alícuotas ajustadas a distintos pH se presurizaron con diferentes presiones 400 MPa, 500 MPa y 600 MPa (3 min) durante 1 y 3 ciclos en un presurizador industrial Hiperbaric (Hiperbaric 135, Burgos, España). Tras los tratamientos las muestras se almacenaron a - 80 °C hasta su posterior análisis.

### **3.4.2. Actividad pectinmetilesterasa**

#### *3.4.2.1. Extracción de pectinmetilesterasa*

PME fue extraída usando el método descrito por Hagerman y Austin (1986) con algunas modificaciones. Una alícuota de 10 mL de puré de tomate se homogeneizó en un Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany) durante 7 min. Este homogenado, fue ajustado a pH 7 con NaOH 0,5 N. Posteriormente, se adicionó y mezcló con NaCl hasta una concentración final de 0,5 M. La mezcla resultante, fue centrifugada a 5.000 rpm durante 30 min a 4 °C, desechándose el precipitado. El sobrenadante se ajustó a pH 4,2 con HCl 0,5 N, y se filtró a través de una jeringa con filtro Minisart SRP2 0,2 µm, obteniéndose el extracto enzimático, que se almacenó a - 80 °C.

#### *3.4.2.2. Medición de la actividad pectinmetilesterasa*

PME fue determinada espectrofotométricamente, en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1063, usando como sustrato pectina cítrica, a 620 nm ( $\epsilon_{620} = 0,25 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Hagerman y Austin, 1986). El ensayo se realizó con todos los reactivos al mismo pH para garantizar la reproducibilidad en los cambios de color.

Sin embargo, los tampones interfieren con la medición de la producción de ácido, por lo que todos los reactivos deben ser preparados en soluciones muy débilmente tamponadas. El medio de reacción estándar contenía (25 °C) tampón fosfato potásico 3 mM pH 7,5, 300 µL de pectina cítrica al 1% (p/v) (conteniendo 0,0005 mM de NaCl), 70 µL azul de bromotimol al 0,01% (p/v) y 20 µL del extracto enzimático en un volumen final de 1 mL.

#### 3.4.2.3. *pH óptimo de pectinmetilesterasa*

El pH óptimo se determinó midiendo la actividad PME en un medio de reacción estándar, que contenía tampón acetato sódico 100 mM (pH 3-5), tampón fosfato sódico 100 mM (pH 6-7,5) y tampón borato sódico 100 mM (pH 8-9).

#### 3.4.2.4. *Caracterización cinética de pectinmetilesterasa*

Para determinar los parámetros cinéticos ( $K_M$  y  $V_m$ ), se estudió el efecto de la concentración de la pectina cítrica. Para determinar el efecto de la concentración, la pectina aumentó de 0 a 40 mM en el medio de reacción estándar.

#### 3.4.2.5. *Estabilidad térmica de pectinmetilesterasa*

La estabilidad enzimática de PME a diferentes temperaturas y tiempos de incubación se determinó incubando alícuotas de 100 mL de puré de tomate en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L, a diferentes temperaturas (20, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 y 90 °C) y a distintos tiempos (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min). Después de calentar, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y la actividad enzimática de PME se determinó en las condiciones óptimas.

#### 3.4.2.6. *Efectos del pH y temperatura sobre la actividad pectinmetilesterasa*

La actividad enzimática de PME a diferentes pH y temperaturas se determinó ajustando alícuotas de 100 mL de puré de tomate a valores de pH de 3,5, 4 y 4,5.

Posteriormente, cada una de estas alícuotas ajustadas a distintos pH, se incubaron con temperaturas de 20, 50, 60, 70 y 90 °C durante 5 min en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L. Las muestras se enfriaron en un baño de hielo y la actividad enzimática de PME se determinó en las condiciones óptimas.

### **3.4.3. Actividad poligalacturonasa**

#### *3.4.3.1. Extracción de poligalacturonasa*

PG fue extraída usando el método descrito por Gross (1982) con algunas modificaciones. Una alícuota de 10 mL de puré de tomate se transfirió a un tubo eppendorf de 15 mL y se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se decantó y fue reemplazado por agua destilada. La mezcla anterior se ajustó a pH 3 con HCl 0,1 M. A continuación, la muestra se volvió a centrifugar a 5.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se decantó, se añadió al precipitado 1,2 M de NaCl (1:1) y se incubó durante 1 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 min y se obtuvo el sobrenadante obteniendo el extracto enzimático, que se almacenó a - 80 °C.

#### *3.4.3.2. Medición de la actividad poligalacturonasa*

PG fue determinada espectrofotométricamente, en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1063, usando como sustrato ácido poligalacturónico, a 276 nm ( $\epsilon_{276} = 0,99 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Gross, 1982). En el medio de reacción se mezcló 45  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático crudo con 110  $\mu\text{L}$  de ácido poligalacturónico al 0,2% (p/v) y se incubó en un pasteurizador industrial EQS BR26-PUT-4000L a 40 °C durante 10 min.

Transcurrido el tiempo, para detener la reacción se añadió al medio de reacción 700  $\mu\text{L}$  de tampón de borato 0,1 M, pH 9 y 145  $\mu\text{L}$  de cianoacetamida al 1%, y se hirvió durante 10 min. Por último, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y la actividad enzimática de PG se determinó en las condiciones óptimas.

### 3.4.3.3. Caracterización cinética de poligalacturonasa

Para determinar los parámetros cinéticos ( $K_M$  y  $V_m$ ), se estudió el efecto de la concentración del ácido galacturónico. Para determinar el efecto de la concentración, el ácido galacturónico aumentó de 0 a 0,73 mM en el medio de reacción estándar.

## 3.5. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

Con el fin de evaluar la calidad organoléptica, se determinaron los principales parámetros físico-químicos que habitualmente son utilizados en la industria agroalimentaria en las muestras de puré de tomate (**Apartado 4.2**), gazpacho (**Apartado 4.3**) y subproductos (**Apartado 4.4**), utilizando la metodología descrita en la literatura y por la AOAC (Association of Analytical Communities).

### 3.5.1. pH

En la medición del pH de puré de tomate, gazpacho o subproductos se utilizó un pHmetro Crison modelo GLP21 (Crison, Barcelona, Spain) que fue calibrado previamente con solución tampón code 9463 (pH 4,01) y code 9464 (pH 7,00).

### 3.5.2. Sólidos solubles totales

Para la determinación del contenido en sólidos solubles totales de puré de tomate o gazpacho fue utilizado un refractómetro (Atago, EEUU) de rango 0-32 °Brix (g sacarosa/100 mL) (método 932.14, AOAC, 1990).

### 3.5.3. Ácidos titulables totales (acidez)

En la determinación de la acidez se pesaron 10 g de puré de tomate o gazpacho. El volumen se valoró potenciométricamente (pHmetro Crison modelo GLP21) con NaOH 0,1 M hasta alcanzar un pH de 8,10. El resultado se expresó como g ácido cítrico/100 mL a través de la fórmula: g ácido cítrico = peso del ácido

cítrico (equivalentes) x N NaOH x mL gastados/mL muestra x 100 (método 924.15, AOAC, 1990).

#### 3.5.4. Contenido en pulpa

Para la determinación del contenido en pulpa, en tubos cónicos graduados de 10 mL se añadió el puré de tomate o gazpacho y se centrifugaron (Controltecnica gyrocen 416) a 15.000 rpm durante 10 min, tras la centrifugación se cuantificó visualmente el % en pulpa.

#### 3.5.5. Parámetros de color

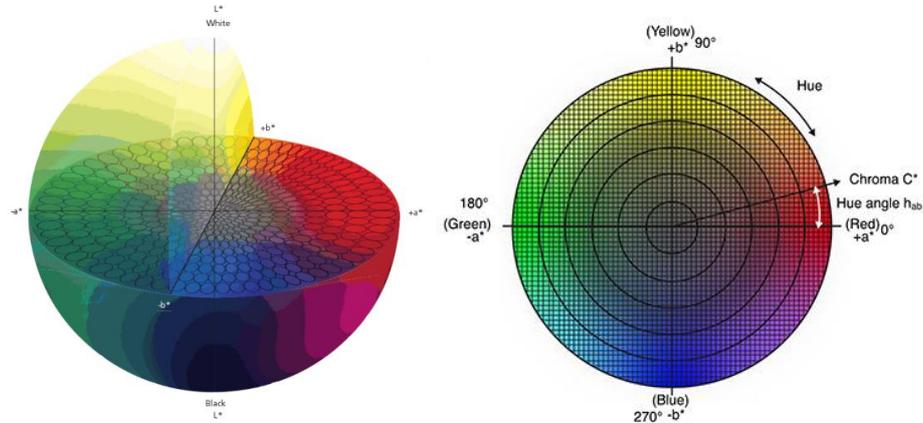
La medición del color, coordenadas CIELab, ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), se realizó en un colorímetro Hunterlab Colorflex® (Hunterlab, Reston, Virginia, U.S.A).

El parámetro  $L^*$  indica luminosidad y los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas de cromaticidad, verde-rojo y azul-amarillo, respectivamente.

$L^*$  es una medida aproximada de luminosidad, siendo la propiedad según la cual cada color se puede considerar como equivalente a un miembro de la escala de grises, entre negro y blanco, tomando valores dentro del rango 0 (negro) - 100 (blanco).

El parámetro  $a^*$  toma valores positivos para el color rojo y negativos para el color verde, mientras que  $b^*$  toma valores positivos para el color amarillo y negativos para el color azul (Pérez-López y col., 2007).

El valor  $\Delta E$  representa la correlación espacial de los valores  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$  en la esfera CIELab expresada como  $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$  (McGuire, 1992).



**Figura 3.8.** Espacio de color CIELAB. Hunterlab Colorflex® (Hunterlab, Reston, Virginia, U.S.A).

### 3.5.6. Azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa)

Para la determinación del contenido en los azúcares mayoritarios, se utilizó el método descrito por Mateos-Aparicio y col., (2010) con ligeras modificaciones. Primeramente, se llevó a cabo una etapa preanalítica donde 10 mL de puré de tomate o gazpacho fueron diluidos con agua ultrapura y se centrifugaron a 7.500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se purificó pasándolo por un cartucho de SPE Strata-X 33  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, EE.UU.) previamente activado con metanol. La determinación analítica se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1100 acoplado a un detector de índice de refracción con una columna cromatográfica Rezex RPM-Monosaccharide  $\text{Pb}^{+2}$  de 8  $\mu\text{m}$  (300  $\times$  7,8 mm) (Phenomenex). Se le aplicó un volumen de inyección de 5  $\mu\text{L}$  y la temperatura del horno se fijó en 87  $^{\circ}\text{C}$ . La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo isocrático con agua ultrapura como fase móvil a un flujo de 0,5 mL/min. Los azúcares identificados fueron glucosa, fructosa y sacarosa.

Aunque no se incluyen en los resultados, también se identificaron algunos azúcares minoritarios como la maltosa, isomaltosa y sorbitol (**Anexos 1-6**).

### 3.5.7. Nivel de vitamina C

Para la determinación del contenido en vitamina C se utilizó el método descrito por Romero-Rodríguez y col., (1992) con ligeras modificaciones. Tras pesar

10 g de puré de tomate, gazpacho o subproductos, fueron mezclados con 50 mL de agua desionizada. Seguidamente, la mezcla se homogeneizó en un Ultra Turrax (Ika, Staufen, Germany) durante 7 min. El homogenado resultante se pesó (5 g) y se mezcló con 25 mL de la solución extractante (metafosfórico al 0,5%). Posteriormente, la mezcla se agitó en oscuridad durante 15 min y se filtró obteniendo la solución final. Se determinó el contenido en vitamina C mediante HPLC (Merck– Hitachi, Darmstad, Germany) usando una columna C-18 de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 LichroCART 205-4 HPLC-Cartridge con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron medidas a 245 nm, utilizando un detector de diodos Shimadzu SPD-M6A UV (Shimadzu, Kyoto, Japan). La fase móvil estaba compuesta por: agua/metanol/tampón acetato/dimetilhexilamina en una proporción 94,5/4/1,5/0,15 (v/v/v/v). Los resultados fueron expresados en mg/100 g.

### 3.5.8. Determinación de compuestos fenólicos totales

La determinación del contenido en compuestos fenólicos totales fue mediante el método de Folin-Ciocalteu, en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Kidron, Harel y Mayer, 1978). Las medidas se realizaron añadiendo a 40  $\mu\text{L}$  de puré de tomate o gazpacho, 500  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (p/v) y agua destilada hasta enrasar a un volumen final de 10 mL. Tras incubar 1 h a 25  $^\circ\text{C}$ , la absorbancia fue determinada a 765 nm en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1063, frente a un blanco que contenía los anteriores reactivos sin la muestra (sustituida por agua). Los resultados fueron expresados en g/L.

### 3.5.9. Determinación de la capacidad antioxidante

El ensayo ORAC-fluoresceína se determinó por la metodología descrita por Lucas-Abellán y col., (2008). En cada pocillo de la microplaca se añadieron: 20  $\mu\text{L}$  de puré de tomate o gazpacho, 100  $\mu\text{L}$  de fluoresceína, 50  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 y 20  $\mu\text{L}$  de ADPH. En el caso de los controles, el volumen de muestra se sustituyó por tampón fosfato 75 mM a pH 7,4. La fluorescencia se registró cada 60 segundos a 37  $^\circ\text{C}$ , usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55 con una multicelda termostatzada. Las lecturas fueron medidas con una  $\lambda$  de excitación de

493 nm y una  $\lambda$  de emisión de 515 nm. El valor ORAC se calculó utilizando la siguiente ecuación:  $ORAC = (AUC_{muestra} - AUC_{blanco}) \times F \times [Trolox] / (AUC_{trolox} - AUC_{blanco})$ , donde AUC es el área bajo la curva y F es el factor de dilución de los extractos. Los resultados fueron expresados en mM Trolox/L.

### 3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Con el fin de evaluar la seguridad microbiológica se determinaron los principales grupos microbianos alterantes y patogénicos en las muestras de puré de tomate, gazpacho, subproductos y grisines utilizando la normativa ISO (International Standardization Organization) e IFU (International Fruit and Vegetable Juice Association).

#### 3.6.1. Mohos y levaduras

Se sembraron alícuotas de 1 mL de la solución utilizada para el recuento de colonias aeróbicas en cada una de las 3 placas Petri analizadas, disolviéndose en 20 mL de Agar Saboraud modificado (Merck 1.07315), cuya preparación fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se solidificó el medio, las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días. Al concluir el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL o Log UFC/g. Se realizó el análisis estadístico tras analizar cada muestra por triplicado (ISO 21527:2008).

#### 3.6.2. Bacterias acidófilas

Se sembraron alícuotas de 1 mL de la solución utilizada para el recuento de bacterias acidófilas en cada una de las 3 placas Petri analizadas, disolviéndose en 25 mL de orange serum agar médium (OSA) (Merck 1.10673) a pH 5,5, cuya preparación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando el medio solidificó, las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días. Al concluir el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL. Se realizó el análisis estadístico tras analizar cada muestra por triplicado (IFU N°2, 1996).

### 3.6.3. Coliformes totales

Se sembraron alícuotas de 1 mL de la solución utilizada para el recuento de colonias aeróbicas en cada una de las 3 placas Petri analizadas, disolviéndose en 10 mL de Violet Red Bile Agar Lactose (VRBA-L) (Merck 1.01406), preparado según las instrucciones del fabricante. Cuando el medio solidificó, se añadió una segunda capa de la solución VRBA-L (10 mL), y las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Al concluir el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL o Log UFC/g. Se realizó el análisis estadístico tras analizar cada muestra por triplicado (ISO 4831:2006).

### 3.6.4. *E. coli*

Se sembraron alícuotas de 1 mL de la solución utilizada para el recuento de aerobios mesófilos en cada una de las 3 placas Petri analizadas, disolviéndose en 20 mL de Agar Chromocult® (Merck 1.07043) cuya preparación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando el medio solidificó, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Al concluir el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL o Log UFC/g. Se realizó el análisis estadístico tras analizar cada muestra por triplicado (ISO 7251:2005).

### 3.6.5. *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*

*Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* se estudiaron diluyendo 10 mL de subproductos o grisines en 250 mL de Brain Heart Infusion (BHI) (BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) e incubando a 37 °C durante 48 h (ISO 21528:2004). Para *Salmonella spp.*, las muestras se incubaron en Rappaport Vasiliadis (RV) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a 41 °C durante 48 h. Posteriormente se sembraron en CHROMagar™ *Salmonella* plus (Sharlab Sentmenat, Barcelona, España) (ISO 6579:2002) y se confirmaron mediante la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (HLY gene). En el caso de *L. monocytogenes* se utilizó el medio selectivo *Listeria* Chromogenic Agar Base (LCAB) (ISO 11290:1996) y se confirmó mediante la reacción en cadena de polimerasa (HYL

gene). Se determinó la presencia (+) o ausencia (-) en 25 g.

### 3.6.6. Mesófilos aerobios totales

Se diluyeron 10 mL de puré de tomate o gazpacho en 90 mL de agua de peptona (Merck 1.07043.1000) preparada al 0,1% (p/v). A partir de esta solución inicial se añadieron alícuotas de 1 mL de la solución anterior en cada una de las 3 placas Petri analizadas. Posteriormente, se añadieron 20 mL de Agar (Merck 1.05463) cuya preparación fue siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando el medio solidificó, las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. Al concluir el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL. Se realizó el análisis estadístico tras analizar cada muestra por triplicado (ISO 4833:2013).

### 3.7. ANÁLISIS SENSORIAL

El análisis sensorial de las muestras fue realizado a través de un test cuantitativo con la colaboración de 12 panelistas expertos suministrados por AMC S.A. (Murcia, España). Se usó una escala (de 0 a 10) donde 0 significó descontento total del panelista y 10 significó aceptación total del panelista.

Los atributos evaluados en el panel de cata para el pure de tomate y gazpacho fueron: sabor, aroma, aspecto visual, textura y valoración global.

Los atributos evaluados en el panel de cata para los grisnes fueron: sabor salado, color, textura, apariencia y valoración global.

Los panelistas disponían de agua para limpiar el paladar entre muestras. Los resultados se expresaron como la media de todas las puntuaciones (ISO 8586:2012).

Los formularios empleados para la realización de las catas se muestran en la **Figura 3.9**.

Nombre:	Fecha:	
Producto:	Nº lote:	
Valorar del 0 al 10 donde: 0. Muy malo 10. Excelente		
COLOR <input type="radio"/>	AROMA <input type="radio"/>	TEXTURA <input type="radio"/>
SABOR <input type="radio"/>	GLOBAL <input type="radio"/>	
Comentarios:		

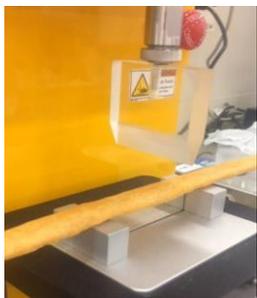
Nombre:	Fecha:	
Producto:	Nº lote:	
Valorar del 0 al 10 donde: 0. Muy malo 10. Excelente		
SABOR <input type="radio"/>	COLOR <input type="radio"/>	TEXTURA <input type="radio"/>
APARIENCIA <input type="radio"/>	GLOBAL <input type="radio"/>	
Comentarios:		

**Figura 3.9.** Formulario para la evaluación sensorial del puré de tomate y gazpacho (**imagen izquierda**), y grisines (**imagen derecha**).

A los panelistas expertos se les indicó que describieran brevemente según su criterio los mejores y peores atributos, así como los más representativos. Además, se hizo hincapié en que detectaran dentro de los atributos sabor y aroma connotaciones sensoriales a fruta cocida (en caso de que existieran).

### 3.7.1. Análisis instrumental de la textura en los grisines

La determinación de la textura en los grisines se llevó a cabo con un texturómetro Brookfield Engineering Laboratories, Inc., utilizando la sonda TA-PSFS-C con las características del método de test.

		<b>Método Test</b>	
Tipo de Test:	Ruptura	Tpo. Recuperación:	0 s
Corrección:	306,00 N	Mismo activador:	Falso
Esperar t.:	0 s	Velocidad Pretest:	2,00 mm/s
Carga Activación:	0,04 N	Fr. Muestreo:	20,00 points/sec
Vel. Test:	1,00 mm/s	Sonda:	NONE
Velocidad Vuelta:	2,0 mm/s	Elemento:	TA-PSFS-C
Contador ciclos:	1,0	Celda Carga:	50000g

**Figura 3.10.** Sonda TA-PSFS-C utilizada para el análisis de los grisines (**imagen izquierda**). Método test utilizado en el texturómetro (**imagen derecha**).

### 3.8. ANÁLISIS NUTRICIONAL

Con el fin de evaluar la calidad nutricional se determinaron los principales parámetros nutricionales en las muestras de subproductos y grisines (**Apartado 4.4**) utilizando la normativa del BOE (Boletín Oficial del Estado) y AOAC (Association of Analytical Communities).

#### 3.8.1. Humedad

Para determinar el % de humedad fue utilizado un analizador halógeno utilizando el principio termo-gravimétrico. Este método se basa en la pérdida de peso que experimenta un cuerpo cuando se le aplica energía calorífica. El dispositivo contiene una balanza de precisión integrada que mide continuamente el peso. Fueron pesados 5 g de subproductos en un porta-muestras y se introdujeron en el equipo, secándose mediante un radiador halógeno hasta que el peso se estabilizó. El resultado fue expresado en % (método 934.06, AOAC, 2000).

#### 3.8.2. Grasa

Para determinar el contenido de grasa se utilizó el método gravimétrico. Se pesaron 30 g de subproductos o grisines que fueron mezclados en un matraz Erlenmeyer con 75 mL de agua desmineralizada y 65 mL de ácido clorhídrico concentrado grado técnico. La mezcla anterior fue sometida a hidrólisis mediante calentamiento. Cuando finalizó, se retiraron las muestras de la cocineta y de la Sorbona, y se filtraron con papel de filtro. Una vez retenida la muestra en el papel de filtro, se lavó para eliminar el ácido clorhídrico. Concluido el lavado, la muestra se colocó en la estufa a 125 °C durante 25 min. Una vez seco el papel de filtro fue introducido en los capuchones de celulosa. Se encendió el extractor de grasa y se adhirió a las columnas de extracción los capuchones con las muestras. Cada vaso fue expuesto a hexano. Los vasos se colocaron debajo de las columnas de extracción y fueron fijados en el lugar correspondiente cerrando manualmente el equipo. Después de colocar las columnas de extracción en la posición de inmersión, se hirvieron durante 25 min. Tras esto, se levantaron los capuchones y fueron lavados

durante 35 min. Transcurrido el tiempo, se cerraron las llaves de las columnas de extracción para destilar todo el solvente de los vasos con muestra y recuperar el hexano. A continuación, se introdujeron los vasos de extracción en la estufa a 125 °C durante 25 min. Por último, los vasos con la grasa fueron introducidos en el desecador y se enfriaron a 20 °C, tomando el peso del vaso con grasa. El cálculo de grasa se realizó mediante la siguiente fórmula:  $\text{grasa} = ((\text{vaso} + \text{grasa}) - \text{vaso vacío}) \times 100/\text{g muestra}$ . El resultado fue expresado en g/100 g (método 2003.06, AOAC, 2003).

### 3.8.3. Carbohidratos

Para el cálculo de los carbohidratos, una vez calculados los valores de humedad, grasa, proteínas, fibra y cenizas, se aplicó la siguiente fórmula:  $\text{carbohidratos} = (100 - (\text{humedad} + \text{lípidos} + \text{proteínas} + \text{fibra} + \text{cenizas}))$ . El resultado fue expresado en g/100 g (RD. 930/92, de 17-07, BOE 5-08-92).

### 3.8.4. Proteínas

Para determinar el contenido de proteínas se utilizó el método Kjeldahl, para lo cual, 2 g de subproductos o grisines fueron mezclados (matraz de digestión Kjeldahl) con 1 g de catalizador y 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. La mezcla anterior fue calentada levemente al principio y bruscamente a partir de los 15 min hasta que quedó transparente. Una vez enfriada, se añadió agua desionizada hasta enrasar a 100 mL. Al matraz colocado en el destilador le fueron añadidos 50 mL de hidróxido sódico al 30%, destilando la mezcla anterior hasta obtener 250 mL de destilado, y posteriormente se le añadió 30 mL de ácido bórico al 2% con un 1% de indicador, y se enrasó a 100 mL con agua desionizada. Cuando el volumen en el Erlenmeyer alcanzó 200 mL finalizó la destilación. Por último, se procedió a la valoración de la muestra con HCl 0,05 N. El cálculo de proteínas se realizó mediante la siguiente fórmula:  $\text{proteínas} = N \times 1,4 \times 6,25 (V - V_b)/P_m$ . Dónde: N = normalidad del HCl empleado, V = volumen en mL de valorante consumido, V<sub>b</sub> = volumen de mL consumido por un blanco que se hará con todos los reactivos sin muestra, P<sub>m</sub> = peso en gramos de la muestra y V<sub>m</sub> = volumen en litros de la muestra. El resultado fue expresado en g/100 g (método 2.062, AOAC, 1984).

### 3.8.5. Fibra bruta

Para determinar el contenido de fibra bruta alimentaria se utilizó el método enzimático-gravimétrico. Primeramente, la fibra bruta fue aislada como un residuo indigestible, y medida gravimétricamente tras la eliminación enzimática (amiloglucosidasa,  $\alpha$ -amilasa y proteasa) del resto de compuestos (excepto proteínas y cenizas que fueron restadas). Transcurrido el tratamiento enzimático, los residuos restantes fueron lavados con agua caliente a 75 °C y se aislaron por filtración, constituyendo el residuo gravimétrico insoluble (RGI) que, restando el contenido en proteínas y cenizas, constituyeron la fibra insoluble (FI). La fibra soluble fue precipitada usando etanol. Estos residuos constituyen el residuo gravimétrico soluble (RGS), que después de extraer el contenido en proteínas y cenizas, representa la fibra soluble (FS). El cálculo de fibra bruta (FB) se realizó mediante la siguiente fórmula:  $FB = FI + FS$ . El resultado fue expresado en g/100 g (método 991.42, AOAC, 1995).

### 3.8.6. Materia seca

La materia seca se determinó por diferencia de peso, para lo cual se restó a 100 el porcentaje de humedad obtenido. El resultado fue expresado en % (método 2001.12, AOAC, 2005).

### 3.8.7. Cenizas

Para evaluar el contenido en cenizas, fueron pesados 10 g de subproductos o grisines en una cápsula de porcelana que previamente había sido secada en un horno convencional a 55 °C durante 1 hora. A continuación, se pasó la cápsula al horno mufla (525 °C), calcinándose hasta que los componentes orgánicos desaparecieron totalmente y quedó un residuo libre de restos negros de carbón. El cálculo de cenizas se realizó mediante la siguiente fórmula:  $\text{cenizas} = (\text{peso final} - \text{peso cápsula}) / (\text{peso muestra}) \times 100$ . El resultado fue expresado en % (método 934.01, AOAC, 1995).

### 3.8.8. Valor energético

El valor energético de un alimento es proporcional a la cantidad de energía que puede proporcionar al quemarse en presencia de oxígeno. Se mide en calorías, que es la cantidad de calor necesario para aumentar en un grado la temperatura de un gramo de agua. El valor calórico fue estimado a partir de los contenidos en macronutrientes, mediante los coeficientes de conversión de nutrientes en energía: proteína (4 kcal/g), grasa (9 kcal/g), carbohidratos (4 kcal/g) y fibra (2 kcal/g), posteriormente se tradujo y expresó en KJ (1 kcal = 4,18 kJ) (RD. 930/92, de 17-07, BOE 5-08-92).

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las muestras se analizaron por triplicado y se representó la media aritmética  $\pm$  desviación estándar. De manera complementaria, en los **Apartados 4.2, 4.3 y 4.4** el efecto del tratamiento sobre las variables dependientes o el efecto del tiempo fueron determinados mediante un ANOVA. El test Tukey se utilizó para ver diferencias significativas, las cuales fueron consideradas estadísticamente diferentes cuando  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el soporte informático Sigmaplot 12.5 software package (Jandel Scientific, Germany).

## **IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



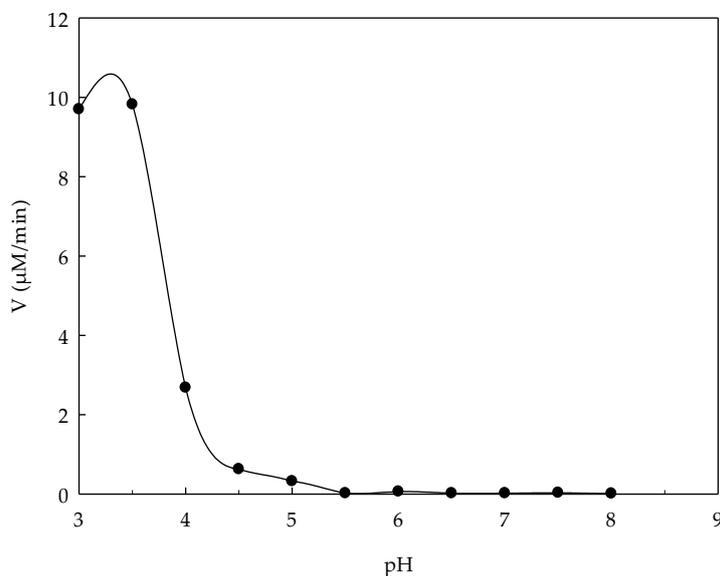
## IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. “CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y ESTUDIOS ENZIMÁTICOS EN PURÉ DE TOMATE”

#### 4.1.1. Caracterización cinética de peroxidasa en puré de tomate

La purificación de enzimas en extractos de plantas es un proceso difícil debido a la presencia de una gran variedad de productos secundarios que pueden unirse fuertemente a las enzimas y cambiar sus características (Chung y col., 2005; Al-Bagmi y col., 2018).

El pH es un factor determinante en la expresión de la actividad enzimática. La **Figura 4.1** muestra el perfil de pH para la oxidación de  $ABTS^{\bullet+}$  por POD en un rango de pH de 3-8. En POD se encontró que el pH óptimo era 3,5, similar al obtenido en lombarda roja (Fortea y col., 2012), aunque más bajo que el obtenido en alga roja (pH 5) (Fortea y col., 2011).



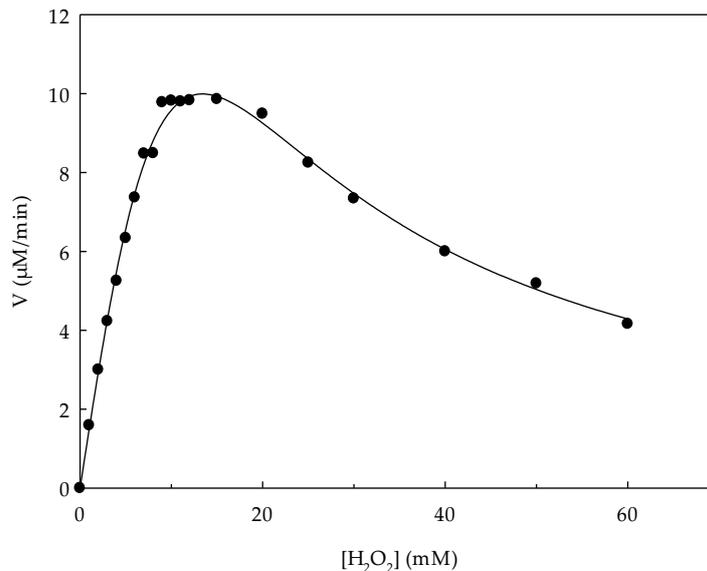
**Figura 4.1.** Efecto del pH en la actividad POD, en presencia de 10 mM de  $H_2O_2$  y 3 mM de  $ABTS^{\bullet+}$ .

Para caracterizar POD, se llevó a cabo un estudio detallado de sus parámetros cinéticos,  $V_m$  y  $K_M$ , que se determinaron a pH 3,5.

La **Figura 4.2** muestra un perfil cinético de inhibición por la alta concentración del sustrato, que se puede analizar cinéticamente mediante el ajuste por regresión no lineal de los puntos experimentales a la siguiente ecuación (Rodríguez-López y col., 2000) (4.1):

$$v = \frac{V_m[S]}{K_M + [S] + [S]^2 / K_{si}} \quad (4.1)$$

donde  $K_{si}$  es la constante de inhibición del sustrato.



**Figura 4.2.** Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  en la actividad POD.

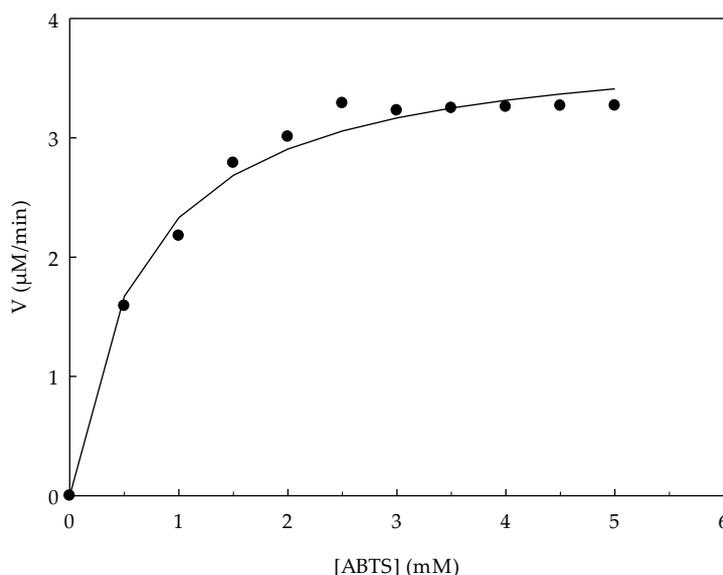
Cuando se incrementó la concentración de  $H_2O_2$  a una concentración fija y saturante de ABTS<sup>••</sup> (3 mM), la actividad POD aumentó hasta alcanzar la saturación. El valor de  $K_M$  para  $H_2O_2$  fue de 477,26 mM y el valor de  $V_m$  fue de 721,53  $\mu M/min$ , además se observó una inhibición por alta concentración de sustrato con una  $K_{si}$  de 0,37 mM.

El perfil cinético concuerda con el obtenido para la peroxidasa de rábano picante (Núñez-Delicado y col., 2005), espárragos, nabo y de alga roja (Fortea y col.,

2011) describiéndose una inhibición por alta concentración de sustrato en el caso del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este valor de  $K_M$  obtenido para  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue muy superior al descrito en lombarda roja (0,98 mM) (Fortea y col., 2011), pimienta (1,3 mM) (Cabanes y col., 2007) o melón (0,2 mM) (Bahceci y col., 2005).

La **Figura 4.3** muestra un perfil cinético de saturación por alta concentración del sustrato. Cuando la concentración de  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  aumentó de 0 a 5 mM, a una concentración fija de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM), la actividad POD aumentó hasta alcanzar la saturación. El valor de  $K_M$  fue 0,65 mM y el valor de  $V_m$  fue 3,85  $\mu\text{M}/\text{min}$ .

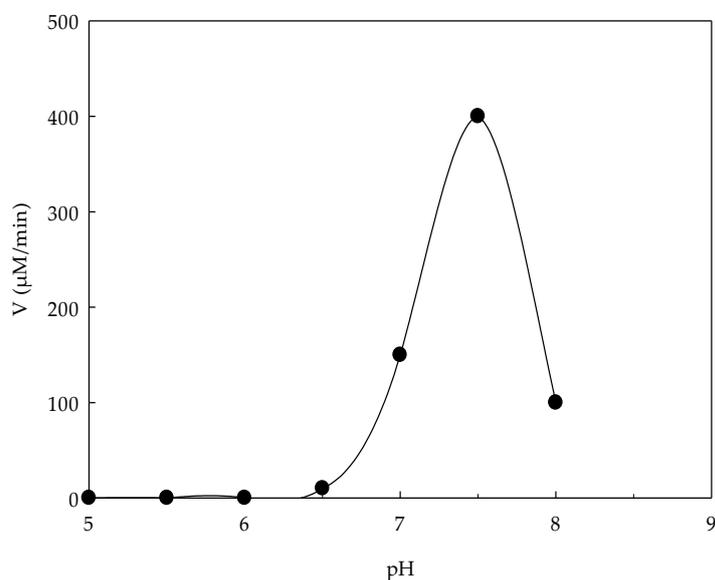
El valor de  $K_M$  para  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  fue similar al descrito para lombarda roja (Fortea y col., 2012) o pimienta (Cabanes y col., 2007), e inferior para rábano picante (4 mM) (Núñez-Delicado y col., 2005) o alga roja (13 mM) (Fortea y col., 2011).



**Figura 4.3.** Efecto de la concentración del  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  en la actividad POD.

#### 4.1.2. Caracterización cinética de pectinmetilesterasa en puré de tomate

La **Figura 4.4** muestra el efecto del pH en la actividad PME en un rango de pH 5-8. El pH óptimo fue 7,5, similar al obtenido en manzana (Denès, Baron y Drilleau, 2000), banana (Ly-Nguyen y col., 2002a), Kiwi (Pal, Vyana y Agrawal, 2016) o zanahoria (Ly-Nguyen y col., 2002b).



**Figura 4.4.** Efecto del pH en la actividad PME, en presencia de 10 mM de pectina.

Los parámetros cinéticos ( $V_m$  y  $K_M$ ) de PME se determinaron ajustando los puntos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando los datos obtenidos a pH 7,5.

La **Figura 4.5** muestra la variación de la velocidad frente a la concentración de sustrato (pectina). Al aumentar la concentración de pectina de 0 a 38 mM, la actividad PME aumentó hasta alcanzar la saturación. El valor de  $K_M$  y  $V_m$  obtenido para la pectina fue de 0,54 mM y 436,12  $\mu\text{M}/\text{min}$ , respectivamente.

El valor de  $K_M$  fue similar al descrito en manzana (Denès, Barón y Drilleau, 2000), e inferior a banana (0,77 mM) (Ly-Nguyen y col., 2002a), Kiwi (0,84 mM) (Pal, Vyana y Agrawal, 2016) o zanahoria (1,01 mM) (Ly-Nguyen y col., 2002b).

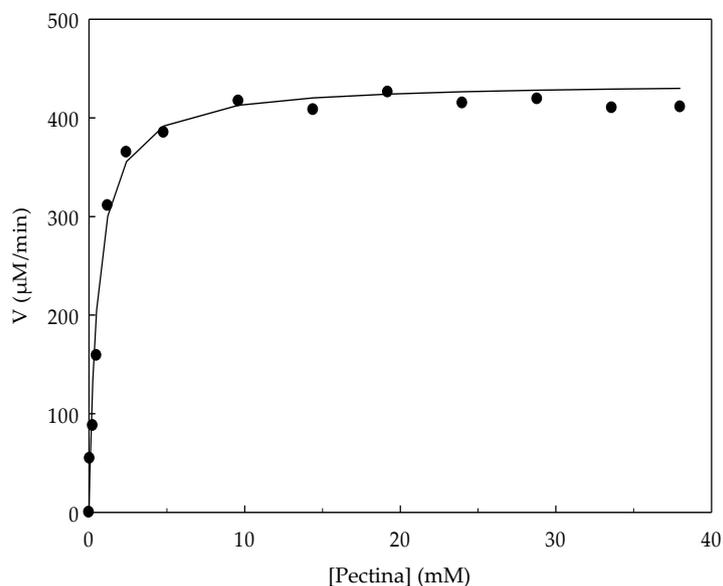


Figura 4.5. Efecto de la concentración de pectina en la actividad PME.

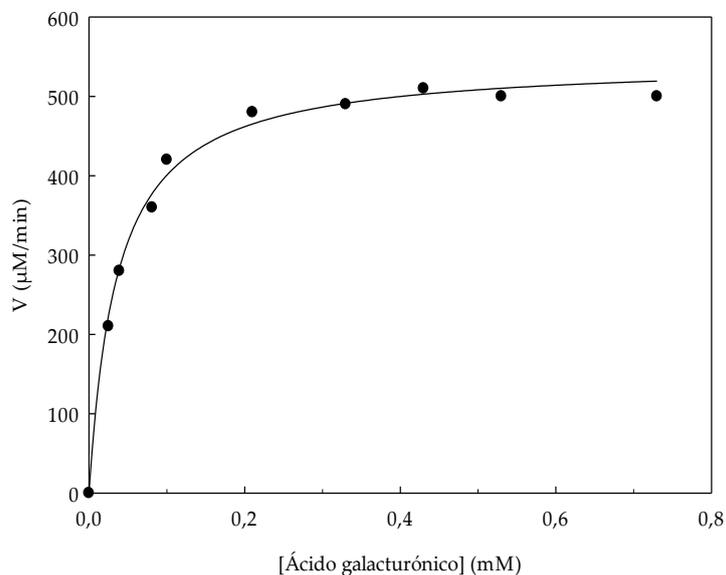
#### 4.1.3. Caracterización cinética de poligalacturonasa en puré de tomate

PG necesitó la adición de NaCl (1,2 M) sobre el extracto enzimático en crudo para poder extraerse y almacenarse.

Para caracterizar PG, se llevó a cabo el estudio detallado de sus parámetros cinéticos,  $V_m$  y  $K_M$ , que se determinaron ajustando los puntos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando los datos obtenidos a pH 9, que es el pH óptimo según la determinación de Gross (1982).

La Figura 4.6 muestra la variación en la velocidad frente a la concentración de sustrato (ácido galacturónico).

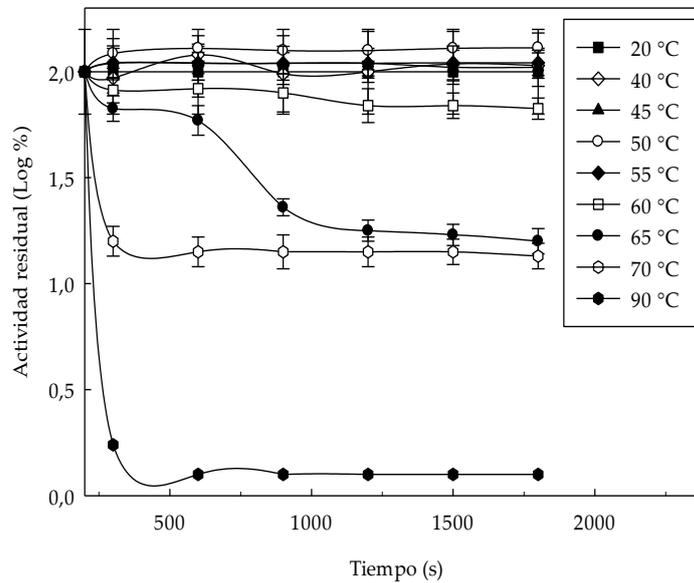
Cuando se incrementó la concentración de ácido galacturónico de 0 a 0,73 mM, la actividad PG aumentó hasta alcanzar la saturación. El valor de  $K_M$  y  $V_m$  obtenido fue de 0,036 mM y 544,84  $\mu\text{M}/\text{min}$ , respectivamente.



**Figura 4.6.** Efecto de la concentración del ácido galacturónico en la actividad PG.

#### 4.1.4. Estabilidad térmica de peroxidasa y pectinmetilesterasa en puré de tomate

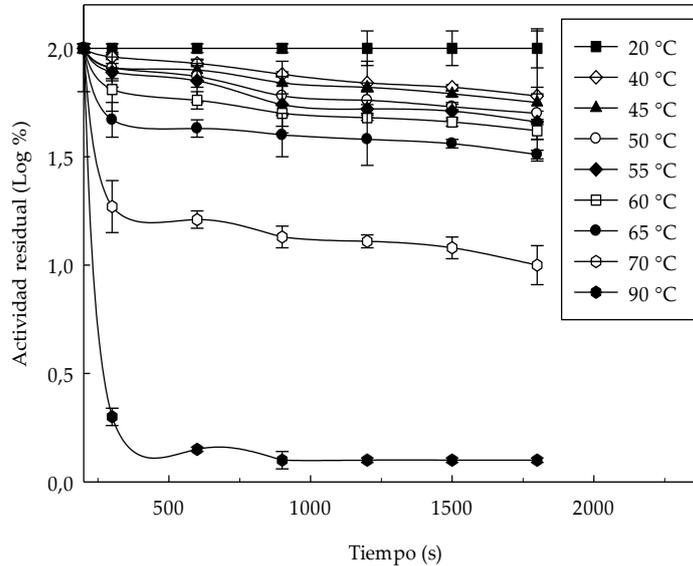
Se realizó un estudio de estabilidad térmica en POD y PME. Para POD, temperaturas superiores a 60 °C (de 5 a 30 min) causaron una disminución ligera pero gradual en su actividad, hasta que se observó una inhibición del 40% a 70 °C (a partir de 5 min de incubación) (**Figura 4.7**).



**Figura 4.7.** Inactivación térmica de POD. Actividad residual (Log %) frente al tiempo de calentamiento a diferentes temperaturas (20-90 °C).

La temperatura requerida para la inactivación total de POD fue de 90 °C, siendo mayor a la descrita en alga roja (30-50 °C) (Fortea y col., 2011), pimiento (30-60 °C) (Cabanés y col., 2007), fresa (50-80 °C) (Hiner y col., 1996) o melón (40-70 °C) (Rodríguez-López y col., 2000).

Para PME, temperaturas superiores a 40 °C (a partir de 5 min de incubación) causaron una disminución ligera pero gradual de su actividad, hasta que se observó una inhibición del 45% a 70 °C (a partir de 5 min de incubación) (**Figura 4.8**).



**Figura 4.8.** Inactivación térmica de PME. Actividad residual (Log %) frente al tiempo de calentamiento con diferentes temperaturas (20-90 °C).

La temperatura requerida para la inactivación total de PME fue de 90 °C, siendo mayor a la descrita en banana (80 °C) (Ly-Nguyen y col., 2002a), zanahoria (65 °C) (Ly-Nguyen y col., 2002b), mango (78 °C) (Díaz-Cruz y col., 2016) o tomate (77,8 y 75 °C) (Anthon y col., 2002; Stoforos y col., 2002, respectivamente).

#### 4.1.5. Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad peroxidasa y pectinmetilesterasa en puré de tomate

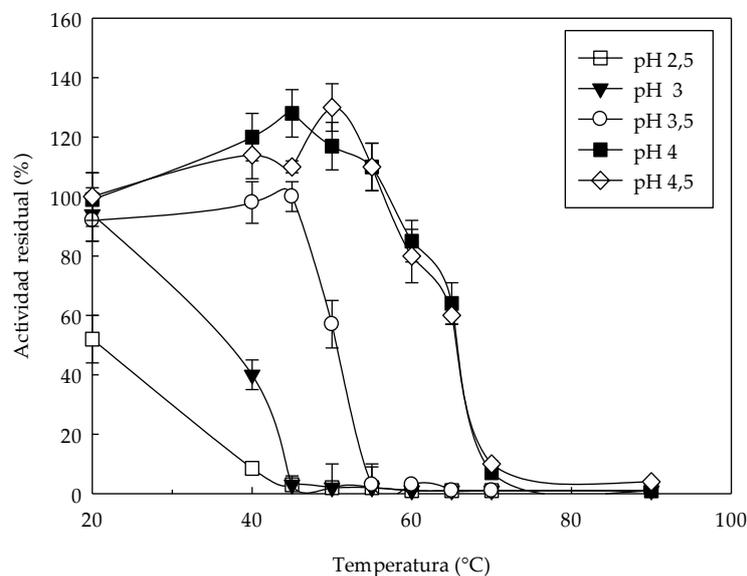
Se llevó a cabo el estudio del efecto sinérgico del pH y la temperatura para POD y PME, observándose en ambas enzimas una fuerte actividad pH dependiente y un pH óptimo de 4,5.

En el caso de POD, se estudió el efecto de temperaturas comprendidas entre 20 y 90 °C con un rango de pH comprendido entre 2,5-4,5 (**Figura 4.9**). La actividad POD observada disminuyó gradualmente cuando el pH se redujo y aumentó la temperatura. A valores de pH comprendidos entre 2,5-3,5 con temperaturas de 55-90 °C, la actividad residual fue solo del 1-3%.

Por otro lado, a valores de pH comprendidos entre 2,5-3 con temperaturas de 40-90 °C, la actividad residual fue del 1-6%, siendo muy similar a la obtenida en

melocotón a pH 3 y 30 °C (Toralles y col., 2005) y menor a la obtenida en uva caimaron a pH 4 y 25 °C (25%) (Rivera-Camelo, Restrepo y Narváez-Cuenca, 2004).

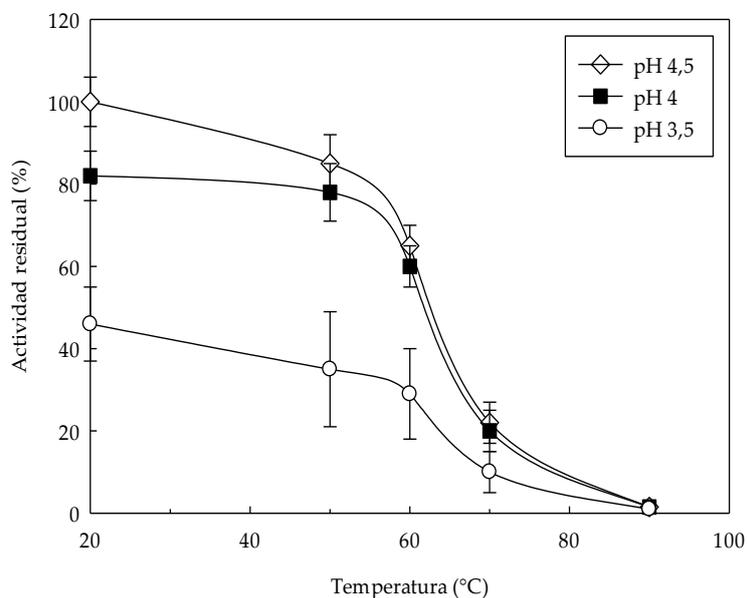
Sin embargo, se observa una activación en la actividad POD a pH 4 y 4,5 con temperaturas comprendidas entre 40-60 °C, alcanzando una activación del 30% a pH 4,5 y 50 °C, siendo similar a la obtenida en melocotón a pH 4 y 30 °C (Toralles y col., 2005).



**Figura 4.9.** Efecto sinérgico del pH y la temperatura en la actividad POD. Actividad residual (%) frente a temperatura a diferentes pH (2,5-4,5).

En el caso de PME, se estudió el efecto de temperaturas comprendidas entre 20-90 °C en un rango de pH comprendido entre 3,5-4,5 (**Figura 4.10**).

A valores de pH de 3,5 con temperaturas de 70 y 90 °C, la actividad residual fue del 8 y 2%, respectivamente, siendo similar a la obtenida en manzana a pH 4 y 35 °C (Denès, Barón y Drilleau, 2000).



**Figura 4.10.** Efecto sinérgico del pH y la temperatura en la actividad PME. Actividad residual (%) frente a temperatura a diferentes pH (3,5-4,5).

Estos resultados demuestran que POD y PME de tomate son inhibidas más eficazmente conforme disminuye el pH y aumenta la temperatura, siendo especialmente sensibles a  $\text{pH} \leq 3,5$  con temperaturas  $\geq 70$  °C.

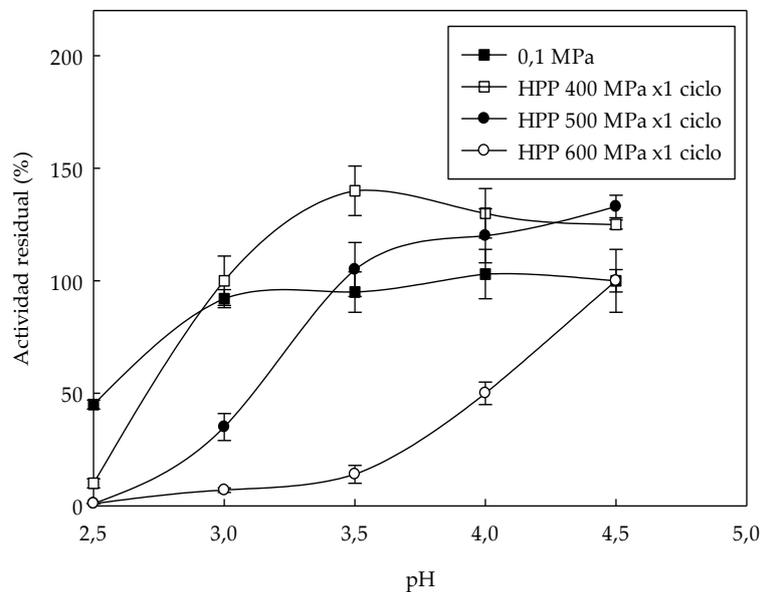
#### 4.1.6. Efectos del pH y las altas presiones hidrostáticas sobre la actividad peroxidasa en puré de tomate

POD presentó mayor actividad en tomate que las otras dos enzimas caracterizadas anteriormente (PME y PG). En POD se llevó a cabo el estudio del efecto sinérgico del pH y el HPP durante 1 y 3 ciclos (3 min/ciclo para todos los tratamientos con HPP). Independientemente de los ciclos del HPP, se observó una fuerte influencia del pH en la actividad (**Figuras 4.11 y 4.12**).

En la **Figura 4.11** se muestra el efecto de pH comprendidos entre 2,5-4,5 en la actividad residual de peroxidasa tras tratar las muestras con HPP (400, 500 y 600 MPa) durante 1 ciclo. La actividad POD disminuyó gradualmente conforme el pH se redujo a valores más ácidos y aumentó la presión. A valores de pH 2,5, 3 y 3,5 con HPP 600 MPa (durante 1 ciclo) la actividad residual fue la más baja obtenida (2, 7 y 14%, respectivamente). Al pH más ácido (2,50) con HPP 400, 500 y 600 MPa

(durante 1 ciclo) la actividad residual fue del 11, 3 y 2%, respectivamente. Estos datos sugieren que para inhibición la POD de tomate el HPP es más efectivo a pH más ácidos.

En un estudio similar, Quaglia y col., (1996) aplicaron tratamientos con HPP 900 MPa durante 10 min a temperatura ambiente en POD de judías verdes y provocó una inhibición del 88%. De igual modo, en zumo de zanahoria tratado con HPP (600 MPa), también a temperatura ambiente, se obtuvo una inhibición de POD del 31% (Szczepańska y col., 2019).



**Figura 4.11.** Efecto sinérgico del pH y HPP (1 ciclo) en la actividad POD. Actividad residual (%) frente a pH con diferentes HPP 400/500/600 MPa.

En la **Figura 4.11** podemos observar activaciones en la actividad POD a los valores de pH más altos (4 y 4,5) con HPP 400 y 500 MPa. A valores de pH 4 y 4,5 con HPP 400 y 500 MPa (durante 1 ciclo) se observó una activación enzimática de POD del 30 y 25%, respectivamente. De igual modo, hubo otra activación del 40% en la actividad POD a pH 3,5 con HPP 400 MPa (durante 1 ciclo).

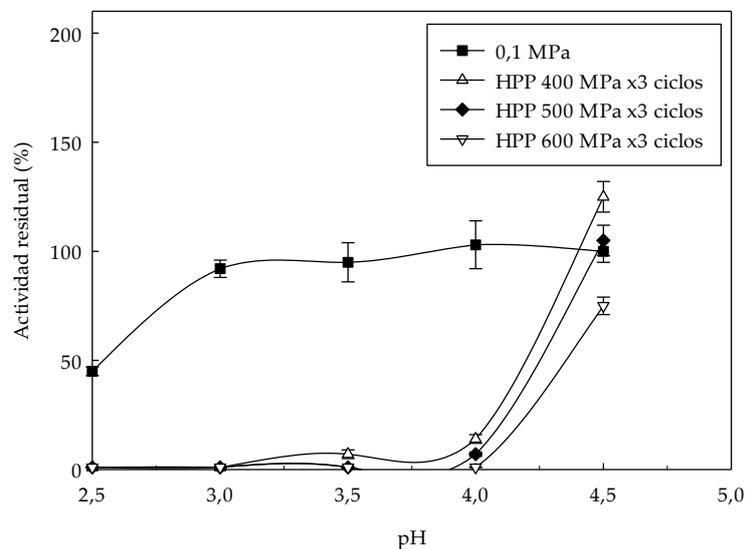
Estos resultados están de acuerdo con Anese y col., (1995), los cuales demostraron que el efecto del pH de un extracto enzimático procedente de zumo de frutas afecta notablemente en la activación de las enzimas. En este mismo trabajo

se observó la activación enzimática de POD al ajustar el zumo con distintos pH (4,5-7) y tratándolo posteriormente con HPP 300-500 MPa (1 min) a 25 °C.

En otro estudio similar realizado por García-Palazón y col., (2004) aplicaron en extracto de puré de fresa un tratamiento con HPP 400 MPa, a temperatura ambiente y provocó la activación parcial de POD.

En la **Figura 4.12** se observó como el tratamiento con 3 ciclos de HPP potenció fuertemente el efecto de inhibición en POD de tomate, respecto al tratamiento con 1 ciclo (**Figura 4.11**). A pH 3,5 con HPP 400 y 500 MPa (durante 3 ciclos) la POD quedó en un 7 y 2% de actividad residual, respectivamente. En los tratamientos de HPP 600 MPa (durante 3 ciclos) con pH 2,5, 3, 3,5 y 4, la POD fue completamente inactivada. De igual modo, a pH 2,5 y 3 con HPP 400 y 500 MPa (durante 3 ciclos) la POD también se inactivó completamente.

Estos resultados sugieren que el HPP es más efectivo en la inhibición de enzimas a pH más ácidos, mostrando así la elevada barorresistencia de la enzima al necesitar 3 ciclos. De hecho, Seyderhelm y col., (1996) comprobaron la gran barorresistencia de diferentes enzimas vegetales, entre ellas la POD, mostrándose resistente a presiones de hasta 700 MPa a 25 °C.



**Figura 4.12.** Efecto sinérgico del pH y HPP (3 ciclos) en la actividad POD. Actividad residual (%) frente a pH con diferentes HPP 400/500/600 MPa.

Por el contrario, también se aprecia (**Figura 4.12**) una activación del 25% en la actividad POD a pH 4,5 con HPP 400 MPa (durante 3 ciclos).

Estos fenómenos de activación observados en algunos casos como consecuencia de la combinación de los tratamientos del HPP (a temperatura ambiente) con ajustes de pH, pueden estar atribuidos a la configuración reversible y/o a los cambios en la conformación de la enzima o el sustrato (Huppertz y col., 2019).

En resumen, 1 ciclo de HPP inactivó POD de tomate más eficazmente conforme se redujo el pH y aumentó la presión, siendo especialmente sensible a  $\text{pH} \leq 3,5$  con  $\text{HPP} \geq 600$  MPa durante 1 ciclo (3 min/ciclo). Además, con 3 ciclos de HPP la POD fue inhibida más eficazmente conforme se redujo el pH y aumentó la presión, siendo especialmente sensible a  $\text{pH} \leq 4$  con  $\text{HPP} \geq 400$  MPa durante 3 ciclos (3 min/ciclo).

#### **4.1.7. Efectos de la temperatura y las altas presiones hidrostáticas sobre la actividad peroxidasa en puré de tomate**

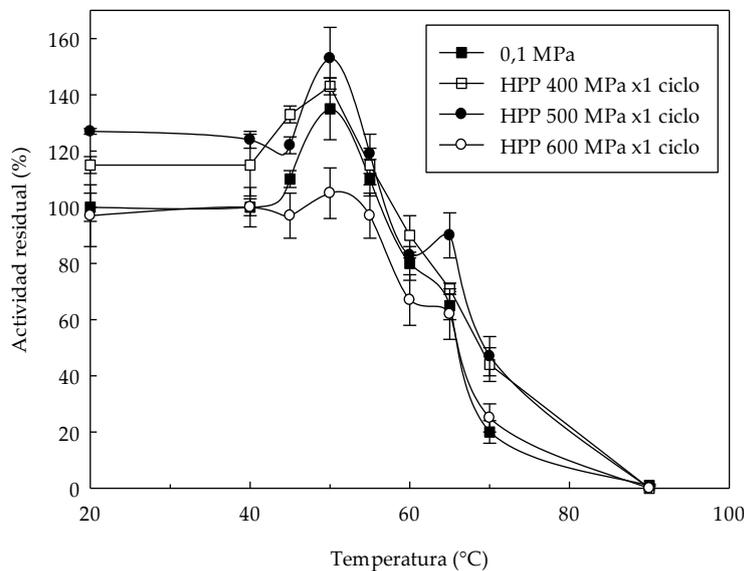
En POD se llevó a cabo el estudio del efecto sinérgico de la temperatura y el HPP durante 1 y 3 ciclos (3 min/ciclo para todos los tratamientos con HPP). Independientemente de los ciclos del HPP, los resultados muestran una fuerte influencia de la temperatura en la actividad POD.

En la **Figura 4.13** se observa el efecto de la temperatura de incubación de los extractos y los tratamientos con HPP (400, 500 y 600 MPa) durante 1 ciclo, en la actividad POD en puré de tomate. La actividad POD disminuyó gradualmente conforme aumentó la temperatura y la presión. A temperaturas de 60, 65 y 70 °C con HPP 600 MPa (durante 1 ciclo) la actividad residual fue del 67, 62 y 25%, respectivamente.

De manera similar, a temperatura de 70 °C con HPP 400, 500 y 600 MPa (durante 1 ciclo) la actividad residual fue del 44, 47 y 25%, respectivamente. Y a temperatura de 90 °C con HPP 400, 500 y 600 MPa (durante 1 ciclo) la POD fue completamente inactivada.

Estos resultados sugieren que para inhibir la POD de tomate son más efectivas las temperaturas altas que los tratamientos con HPP (400-600 MPa).

En un estudio similar, de Jesús, Leite y Cristianini (2018) aplicaron tratamientos con HPP 690 MPa durante 5 min, a 80 °C, en POD de fruta açáí y provocó una inhibición parcial del 20%, mostrándose muy barorresistente. Por otro lado, Cano, Hernández y de Ancos (1997) mostraron que la temperatura tiene un efecto importante sobre la actividad POD en puré de fresa, siendo parcialmente inhibida a mediante un tratamiento con HPP 280 MPa previamente incubado a una temperatura de 45 °C.



**Figura 4.13.** Efecto sinérgico de la temperatura y HPP (1 ciclo) en la actividad POD. Actividad residual (%) frente a temperatura con diferentes HPP 400/500/600 MPa.

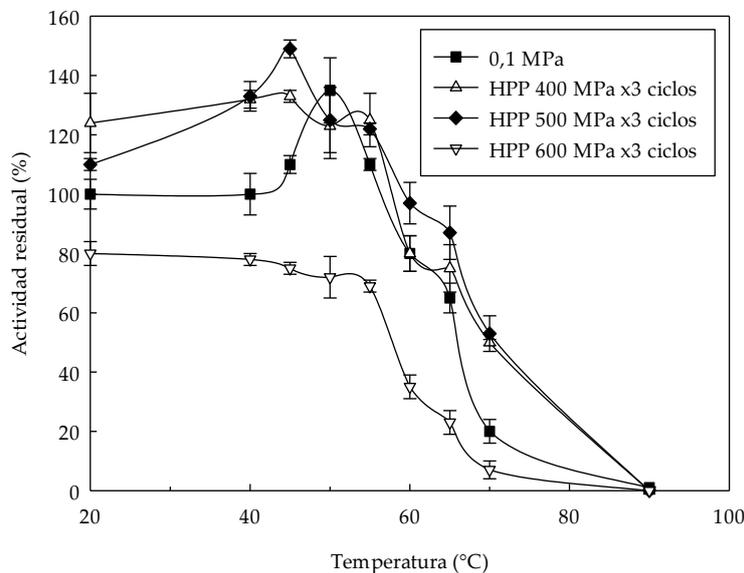
Por el contrario, también se aprecian activaciones enzimáticas de POD a valores de temperatura comprendidos entre 20 y 55 °C con HPP 400 y 500 MPa. A temperaturas de 20, 40, 45, 50 y 55 °C con HPP 400 MPa (durante 1 ciclo) se observó una activación en la actividad POD del 15, 15, 33, 43 y 15%, respectivamente. De igual modo, las temperaturas de 20, 40, 45, 50 y 55 °C con HPP 500 MPa (durante 1 ciclo) mostraron una activación en la actividad POD del 27, 24, 22, 53 y 19%, respectivamente. Sin embargo, las temperaturas anteriores con HPP 600 MPa, no mostraron ninguna activación (**Figura 4.13**).

Estos resultados son similares a los publicados por García-Palazón y col., (2004), los cuales aplicaron en un extracto de puré de fresa un tratamiento con HPP

400 MPa durante 5 y 10 min a 25 °C y aumentó la actividad POD en un 13 y 1%, respectivamente.

Cuando se realizó el tratamiento con 3 ciclos de HPP aumentó fuertemente el efecto de inhibición en POD de tomate con respecto a 1 ciclo (**Figura 4.13**). Tal y como se observa en la **Figura 4.14**, la actividad POD disminuyó gradualmente conforme aumentó la temperatura y la presión. A temperaturas de 60, 65 y 70 °C con HPP 600 MPa (durante 3 ciclos) la actividad residual fue del 35, 23 y 7%, respectivamente. De manera similar, a temperatura de 70 °C con HPP 400 y 500 MPa (durante 3 ciclos) la actividad residual fue del 50 y 53%, respectivamente. A temperaturas de 20, 40, 45, 50 y 55 °C con HPP 600 MPa (durante 3 ciclos) la actividad residual fue del 80, 78, 75, 72 y 68%, respectivamente. Y a temperatura de 90 °C con HPP 400, 500 y 600 MPa (durante 3 ciclos) la POD fue completamente inactivada. Estos resultados sugieren que para inhibir la POD de tomate lo más efectivo es un mayor número en ciclos de presión con temperaturas altas.

Seyderhelm y col., (1996) estudiaron la barorresistencia de diferentes enzimas incluyendo la POD, mostrándose resistente a presiones que oscilaban entre 600 y 700 MPa, a 25 °C.



**Figura 4.14.** Efecto sinérgico de la temperatura y HPP (3 ciclos) en la actividad POD. Actividad residual (%) frente a temperatura con diferentes HPP 400/500/600 MPa.

En la **Figura 4.14** se aprecian activaciones enzimáticas de POD a intervalos de temperatura de 20-55 °C con HPP 400 y 500 MPa. A temperaturas de 20, 40, 45, 50 y 55 °C con HPP 400 MPa (durante 3 ciclos) se observó una activación en la actividad POD del 24, 32, 33, 23 y 25%, respectivamente. De igual modo, las temperaturas de 20, 40, 45, 50 y 55 °C con HPP 500 MPa (durante 3 ciclos) mostraron una activación en la actividad POD del 10, 33, 49, 25 y 22%, respectivamente.

En la actualidad, estos fenómenos de activación observados en algunos casos como consecuencia de la combinación de los tratamientos del HPP con temperaturas suaves han sido observados por algunos autores (Morales-de la Peña y col., 2018; Franck y col., 2019; Kangur y col., 2019). Estos autores estudiaron el efecto sinérgico del HPP y la temperatura sobre las enzimas en puré de tomate, comprobando que la actividad POD del tomate se incrementaba con HPP 350 MPa y 25 °C. Otro estudio, observó que la POD de hierba mate tratada con CO<sub>2</sub> comprimido a 30 °C y 7 MPa, aumentó su actividad un 25% (Primo y col., 2007).

En resumen, la POD de tomate fue inhibida más eficazmente conforme aumentó la temperatura y la presión, siendo especialmente sensible a temperaturas  $\geq 70$  °C con HPP  $\geq 600$  MPa durante 1 ciclo (3 min/ciclo).

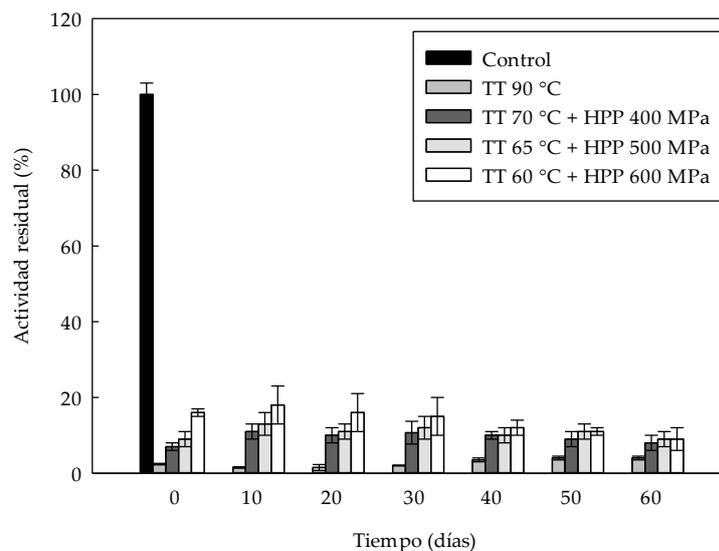
Además, la POD fue inhibida más eficazmente conforme aumentó la temperatura, la presión y el número en ciclos de presión, siendo especialmente sensible a temperaturas  $\geq 65$  °C con HPP  $\geq 600$  MPa durante 3 ciclos (3 min/ciclo).

## 4.2. "ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN PURÉ DE TOMATE: COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES COMBINACIONES DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS CON TRATAMIENTO TÉRMICO SUAVE, FRENTE A PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL"

### 4.2.1. Análisis enzimático del estudio de vida útil en puré de tomate

#### 4.2.1.1. Actividad peroxidasa

En la **Figura 4.15** se presenta la evolución de la actividad residual de POD en las muestras de puré de tomate durante su periodo de tratamiento, mostrando en todos los tratamientos empleados una inhibición parcial de la enzima.



**Figura 4.15.** Evolución de la actividad residual de POD (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

El TT 90 °C (el que más temperatura empleó) fue el mejor para inhibir la actividad POD, mostrando a día 0 una actividad residual del 2,4%, y no encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) durante el tiempo

del estudio de vida útil. Por otra parte, las diferentes combinaciones de temperaturas suaves y HPP empleadas en el estudio fueron insuficientes para inactivar por completo a la POD, encontrándose, en todas ellas valores de actividad residual de la enzima entre el 10 y el 17%, y presentando una disminución progresiva desde el día 0 hasta el día 60.

Así, la POD no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa, a partir del día 10 del estudio de vida útil.

Sin embargo, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el control, el TT 90 °C y el resto de tratamientos con HPP (TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa), entre los días 0 y 60 del estudio de vida útil.

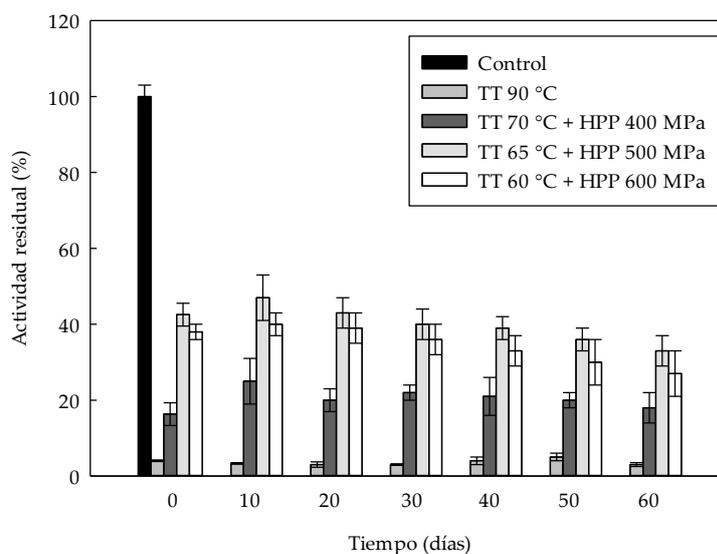
En base a estos resultados se puede afirmar la eficacia de los TT suaves con HPP para inhibir parcialmente la POD en el puré de tomate, siendo el TT 70 °C + HPP 400 MPa el mejor tratamiento puesto que, al emplear la mayor temperatura de los tres, fue el que más inhibió la POD a día 0. No obstante, ningún tratamiento del estudio (incluido el TT 90 °C) consiguió la inactivación total de la POD.

Nuestros resultados concuerdan con distintos estudios realizados sobre la POD en zumos y purés vegetales. En todos ellos se comprobó como la POD fue muy resistente a los tratamientos con HPP (Terefe, Buckow y Versteeg, 2014; Chakraborty y col., 2014; Wibowo y col., 2019), siendo necesario tratamientos de HPP combinados con temperaturas suaves y tiempos cortos, tal y como se hizo en el estudio, para su mayor inactivación. En un estudio similar realizado por Hurtado y col., (2015), la aplicación de HPP 350-600 MPa durante 3-5 minutos en smoothies de frutas frescas no afectó a la actividad POD a causa de su elevada barorresistencia.

Por el contrario, otros estudios consiguieron la inhibición parcial de la POD también en puré de fresa con HPP 300 MPa durante 15 min (Cano, Hernández y de Ancos, 1997) y en fresa entera con HPP 450 MPa durante 6 min (Terefe y col., 2009). Vervoort y col., (2011) redujeron un 35% la actividad POD en zumo de naranja tratado con HPP 600 MPa (durante 1 min). De manera similar, Chang y col., (2016) redujeron un 50% la actividad POD en zumo de uva tratado con HPP 600 MPa durante 5 min.

## 4.2.1.2. Actividad pectinmetilesterasa

En la **Figura 4.16** se presenta la evolución de la actividad residual de PME en las muestras de puré de tomate durante su periodo de tratamiento, mostrando en todos los tratamientos empleados una inhibición parcial de la enzima.



**Figura 4.16.** Evolución de la actividad residual de PME (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

De nuevo, el TT 90 °C fue el más eficaz inhibiendo la actividad enzimática (puesto que fue el tratamiento que mayor temperatura empleó y, por tanto, más alteración provocó en la estructura de PME), ya que, la actividad residual fue del 4%, a día 0, oscilando entre el 3-5% a lo largo del estudio de vida útil.

Tras el TT 70 °C + HPP 400 MPa, a día 0, la actividad residual fue del 16%, y se mantuvo entre el 16-25% a lo largo del tiempo de almacenamiento.

También a día 0, tras los TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa la actividad residual fue del 42 y 38%, respectivamente. Además, a lo largo del estudio de vida útil, la actividad residual de la PME se mantuvo casi constante en los dos tratamientos anteriores.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) en la actividad residual de PME en ninguno de los tratamientos empleados, entre los días 0 y 60 del estudio. Por el contrario, sí las hubo ( $p \leq 0,05$ ) entre el control y el resto de los tratamientos.

Como se puede observar en la **Figura 4.16**, la PME fue resistente a los TT con HPP puesto que emplearon temperaturas suaves. Sin embargo, no sucedió lo mismo con el TT 90 °C que empleó una temperatura más elevada y provocó en ella la mayor inhibición de los tratamientos del estudio.

El TT 70 °C + HPP 400 MPa fue el mejor de los tres tratamientos que emplearon HPP para reducir la actividad PME, posiblemente porque empleó mayor temperatura que los otros dos tratamientos, evidenciando que esta enzima se ve más afectada por la temperatura que por las altas presiones hidrostáticas.

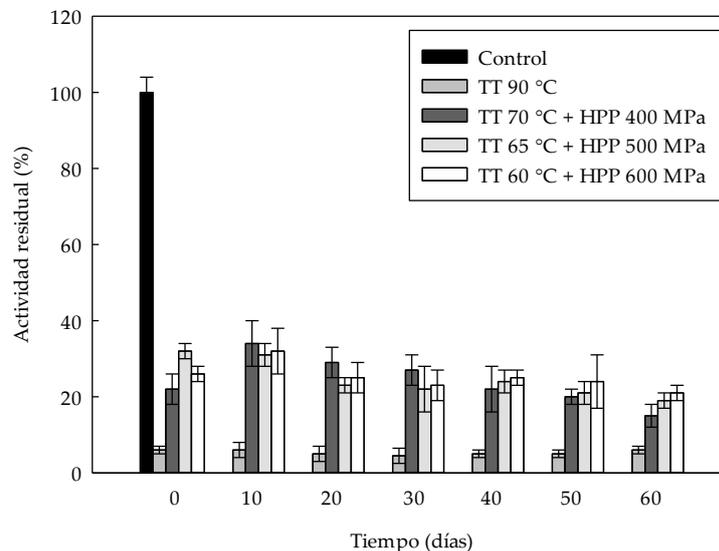
Estos resultados concuerdan con los publicados en estudios realizados sobre la PME en zumos y purés vegetales (Wibowo y col., 2019). En smoothies vegetales tratados con HPP 350-400 MPa durante 5 min, la PME no se consiguió inhibir, teniendo que aumentar la presión hasta 600 MPa durante 3 min para poder reducir su actividad en un 40% (Hurtado y col., 2015). La PME tratada con HPP 450 MPa durante 30 min fue parcialmente inhibida en zumo de naranja (Nienaber y Shellhammer, 2001a,b; Bayindirli y col., 2006). Para el puré de plátano fueron necesarias presiones de 600 MPa durante 2 min para poder reducir la actividad PME (Ly-Nguyen y col., 2002a).

Jayathunge y col., (2015) trataron zumo de tomate con HPP 600 MPa durante 1 min a 28 °C consiguiendo reducir la actividad PME desde 23,3 (control) hasta 2 mmol/min/g.

Ng y col., (2019) en jackfruit redujeron un 60% la actividad PME con HPP 600 MPa durante 15 min.

#### 4.2.1.3. Actividad poligalacturonasa

En la **Figura 4.17** se presenta la evolución de la actividad residual de PG en las muestras de puré de tomate durante su periodo de tratamiento, mostrando en todos los tratamientos empleados una inhibición parcial de la enzima.



**Figura 4.17.** Evolución de la actividad residual de PG (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Una vez más, el TT 90 °C fue el más eficaz (al emplear la mayor temperatura de los tratamientos del estudio), puesto que la actividad residual fue del 6%, a día 0, manteniéndose entre el 4,5-6% a lo largo del estudio de vida útil.

Tras el TT 70 °C + HPP 400 MPa, a día 0, la actividad residual fue del 22%, manteniéndose entre el 15-34% a lo largo del estudio de vida útil, disminuyendo ligeramente conforme avanza el tiempo de almacenamiento.

Con el TT 65 °C + HPP 500 MPa, a día 0, la actividad residual fue del 32%, y se mantuvo entre el 19-32% a lo largo del estudio de vida útil, disminuyendo ligeramente a lo largo del tiempo del estudio.

También a día 0, la actividad residual fue del 26% con el TT 60 °C + HPP 600 MPa, manteniéndose entre el 21-32% a lo largo del estudio de vida útil, disminuyendo progresivamente conforme avanza el tiempo de almacenamiento.

La PG no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para los TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa, entre los días 0 y 60 del estudio de vida útil (excepto a día 10), debido a que las temperaturas de los tratamientos fueron similares. Sin embargo, si hubo diferencias

estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el control, el TT 90 °C y el resto de tratamientos con HPP (TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa), entre los días 0 y 60 del estudio de vida útil.

Por lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que los tres tratamientos que combinaron temperaturas suaves y HPP mostraron una tendencia y un efecto de inhibición similar para la PG, siendo el TT 70 °C + HPP 400 MPa el mejor de los tres puesto que causó la mayor inhibición a día 0 (22% de actividad residual). Esto se debe a que PG resultó más sensible a la temperatura que a las altas presiones hidrostáticas, y este tratamiento fue el que mayor temperatura empleó de los tres tratamientos que incluyeron HPP.

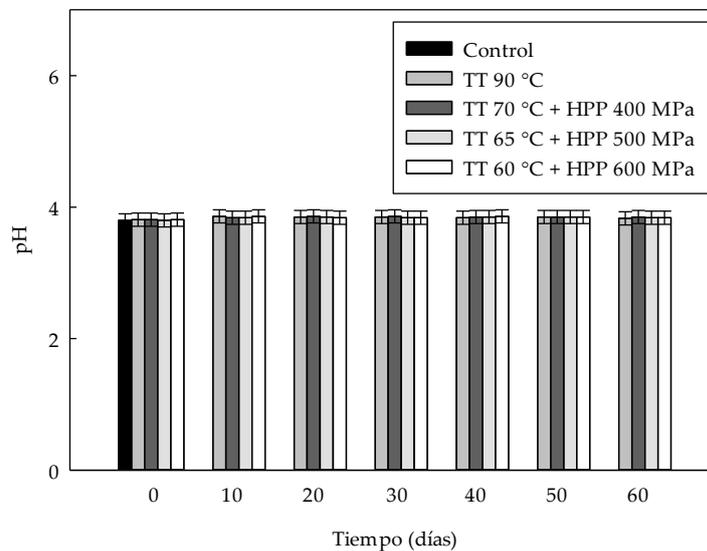
Jayathunge y col., (2015) trataron zumo de tomate con HPP 600 MPa durante 1 min a 28 °C consiguiendo reducir la actividad PG desde 28,4 (control) hasta 25,6 mmol/min/g. Ng y col., (2019) en jackfruit redujeron la actividad PG un 90% con HPP 600 MPa durante 15 min. Hsu, Tan y Chi (2008) redujo la actividad residual de la PG de tomate al 12 y 98% con HPP 250 MPa y HPP 400–600 MPa, respectivamente. De hecho, algunas combinaciones de HPP (500–550 MPa) con temperaturas suaves (60–75 °C) consiguieron inactivar totalmente la PG (Fachin y col., 2003; Verlent y col., 2004).

#### 4.2.2. Análisis físico-químico del estudio de vida útil en puré de tomate

##### 4.2.2.1. pH

El pH es un factor determinante en la expresión de la actividad enzimática alterante y en la seguridad microbiológica de los alimentos, ya que, la mayoría de los microorganismos patógenos tienen inhibido su crecimiento a valores de pH ácidos  $< 4,6$  (Crawford y col., 1996). Además, el pH tiene una influencia importante en el sabor y en la estabilidad de las bebidas vegetales.

La **Figura 4.18** muestra la evolución del pH para los distintos tratamientos desarrollados en el estudio a lo largo del tiempo de vida útil.



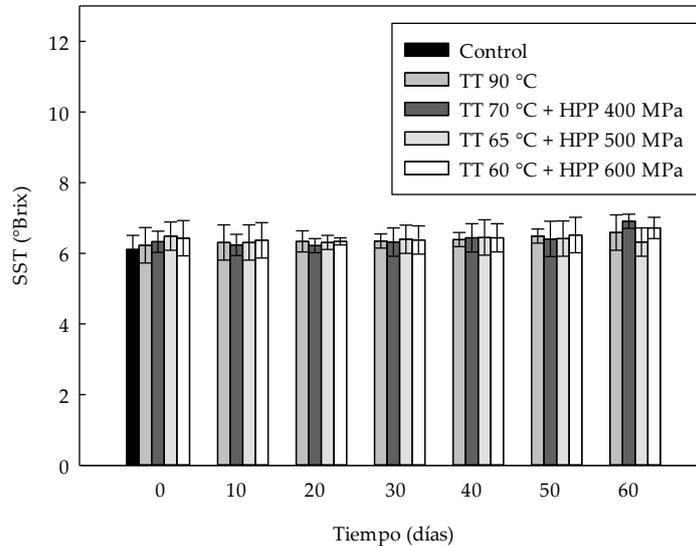
**Figura 4.18.** Evolución del valor de pH para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Se encontró que los valores de  $\text{pH} \pm 3,8$  se mantuvieron constantes en todos los tratamientos y durante todos los días del almacenamiento. Por ello, el pH no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil. Esto es debido a que no hay ninguna alteración microbiológica grave que pueda afectar los valores del pH, lo cual es un indicativo de calidad para las muestras.

Los valores de pH fueron similares a los obtenidos en puré de tomate (Mihretu y Bhalekar, 2016) o zumo de tomate (Jayathunge y col., 2015) e inferiores a jackfruit (5,03) (Ng y col., 2019).

#### 4.2.2.2. Sólidos solubles totales

Los valores del contenido en sólidos solubles totales medidos desde día 0 hasta el día 60 fueron similares en todos los tratamientos desarrollados en el estudio (**Figura 4.19**), por lo que los tratamientos de conservación aplicados no tuvieron efecto sobre ellos.



**Figura 4.19.** Evolución en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

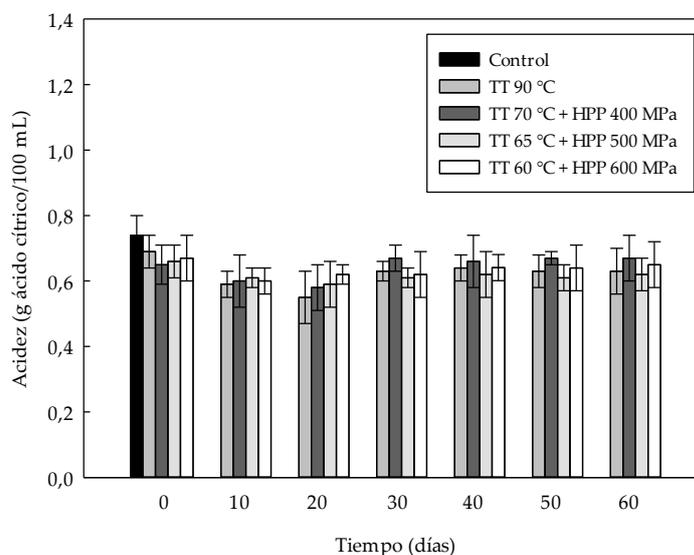
Los sólidos solubles totales no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil, presentando valores que oscilaron entre 6 y 6,7 °Brix, y mostrando una clara correlación en el contenido de azúcares mayoritarios del puré de tomate, que como se verá más adelante en las **Figuras 4.22, 4.23** y **Tabla 4.5** tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ).

Los resultados fueron similares a los publicados por Andrés, Villanueva y Tenortio (2016) en smoothie de soja, donde el contenido de sólidos solubles totales fue similar en todos los tratamientos durante el tiempo del estudio de vida.

Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo fueron distintos a los publicados por Wasim y Singh (2015) en tomate, donde si hubo una ligera reducción en el contenido de sólidos solubles totales durante el tiempo de almacenamiento.

#### 4.2.2.3. Ácidos titulables totales (acidez)

Los valores del contenido en ácidos titulables totales medidos desde el día 0 hasta el día 60 fueron similares en todos los tratamientos desarrollados en el estudio (**Figura 4.20**) debido a que el pH se mantuvo sin variaciones durante el tiempo de almacenamiento (**Figura 4.18**).



**Figura 4.20.** Evolución en el contenido de ácidos titulables totales (g ácido cítrico/100 mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

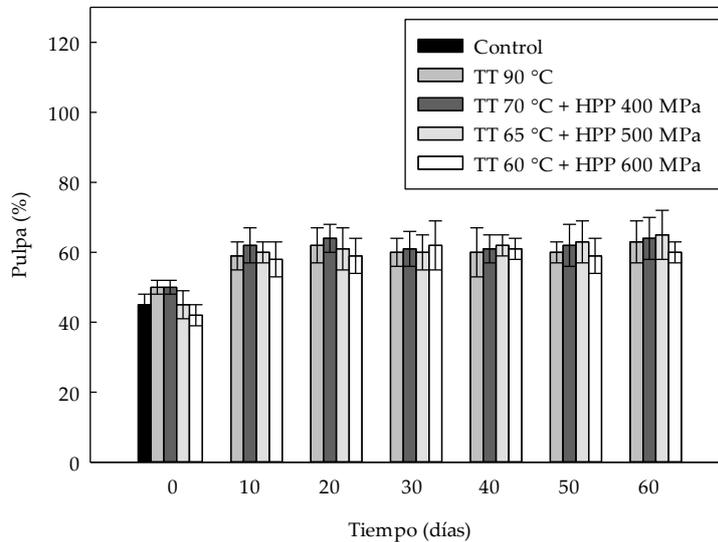
Por ello, los ácidos titulables totales no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil.

Sin embargo, en el control, el contenido de ácidos titulables totales fue ligeramente superior (0,74 g ácido cítrico/100 mL) al resto de tratamientos en los diferentes días de almacenamiento; esto se pudo deber a que los distintos tratamientos empleados alteraron la pared celular y liberaron los azúcares contenidos en el citosol, lo que a su vez redujo la acidez de las muestras.

Otros estudios sobre el HPP describieron cambios ligeramente significativos en el contenido de ácidos titulables totales durante la vida útil en zumo de naranja (Bull y col., 2004) y zumo de arándano (Barba y col., 2012).

#### 4.2.2.4. Contenido en pulpa

Los valores del contenido en pulpa comprendidos entre el día 10 y el día 60 fueron similares (oscilando entre el 60 y 64%) en todos los tratamientos desarrollados en el estudio (Figura 4.21).



**Figura 4.21.** Evolución en el contenido de pulpa (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Sin embargo, a día 0 los valores del contenido en pulpa fueron inferiores al resto de días analizados durante el almacenamiento.

Con respecto al contenido en pulpa no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos a día 0. Por el contrario, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el día 0 y el resto de los días hasta el final del estudio de vida útil (día 60).

El aumento del contenido en pulpa conforme avanzó el tiempo del almacenamiento pudo ser debido de la actividad residual de la PME (**Figura 4.16**) y la PG (**Figura 4.17**), que actuando de manera sinérgica provocaron pérdidas de estabilidad y viscosidad en las pectinas (Duvetter y col., 2009).

#### 4.2.2.5. Parámetros de color

Las **Tablas 4.1, 4.2 y 4.3** muestran la evolución durante los 60 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C), de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  analizados tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.

El parámetro  $L^*$  (luminosidad), a día 0, se vio afectado por los TT 70 °C + HPP 400 MPa (25,32) y TT 65 °C + HPP 500 MPa (25,34), siendo significativamente inferior al control (sin tratamiento) (26,94), TT 90 °C (26,93) y TT 60 °C + HPP 600 MPa (26,92) (**Tabla 4.1**).

**Tabla 4.1.** Evolución del parámetro colorimétrico  $L^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	26,94±0,5 <sup>c</sup>	26,93±0,3 <sup>c</sup>	25,32±0,5 <sup>b</sup>	25,34±0,3 <sup>b</sup>	26,92±0,5 <sup>c</sup>
10	n.d.	26,45±0,6 <sup>c</sup>	27,41±0,4 <sup>c</sup>	30,40±0,5 <sup>e</sup>	31,93±0,5 <sup>e</sup>
20	n.d.	28,43±0,5 <sup>d</sup>	32,37±0,3 <sup>f</sup>	35,26±0,3 <sup>g</sup>	32,42±0,3 <sup>f</sup>
30	n.d.	27,43±0,4 <sup>c</sup>	31,34±0,3 <sup>e</sup>	31,94±0,4 <sup>e</sup>	31,99±0,6 <sup>e</sup>
40	n.d.	25,03±0,5 <sup>b</sup>	26,23±0,4 <sup>c</sup>	23,54±0,5 <sup>a</sup>	27,94±0,5 <sup>c</sup>
50	n.d.	26,82±0,2 <sup>c</sup>	32,29±0,5 <sup>f</sup>	29,31±0,3 <sup>d</sup>	24,77±0,3 <sup>b</sup>
60	n.d.	27,75±0,3 <sup>c</sup>	25,77±0,4 <sup>b</sup>	28,32±0,4 <sup>d</sup>	25,70±0,5 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

Además, durante el almacenamiento hubo significativos aumentos, respecto al control, para los tratamientos con HPP entre los días 10 y 30.

En el parámetro  $a^*$ , a día 0, hubo un aumento en los TT 70 °C + HPP 400 MPa (24,99), TT 65 °C + HPP 500 MPa (26,07) y TT 60 °C + HPP 600 MPa (26,17) respecto al control (sin tratamiento) (19,7), sin embargo, el TT 90 °C (19,77) se mantuvo sin cambios. Durante el tiempo de almacenamiento hubo aumentos, respecto al control, para el TT 90 °C entre los días 10 y 60 (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.2.** Evolución del parámetro colorimétrico  $a^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	19,70±0,7 <sup>a</sup>	19,77±1 <sup>ab</sup>	24,99±1 <sup>cd</sup>	26,07±1 <sup>cd</sup>	26,17±0,8 <sup>de</sup>
10	n.d.	25,02±0,7 <sup>cd</sup>	24,52±0,6 <sup>cd</sup>	24,17±0,9 <sup>cd</sup>	24,14±0,7 <sup>cd</sup>
20	n.d.	27,43±0,6 <sup>de</sup>	21,71±0,9 <sup>ab</sup>	22,65±0,9 <sup>bc</sup>	24,36±0,7 <sup>cd</sup>
30	n.d.	28,33±0,7 <sup>e</sup>	19,79±0,8 <sup>ab</sup>	21,95±0,9 <sup>bc</sup>	21,38±0,7 <sup>ab</sup>
40	n.d.	26,82±0,6 <sup>de</sup>	24,95±0,7 <sup>cd</sup>	23,86±0,6 <sup>c</sup>	24,05±1 <sup>cd</sup>
50	n.d.	25,60±0,8 <sup>cd</sup>	19,15±0,6 <sup>a</sup>	21,33±0,7 <sup>ab</sup>	23,36±0,8 <sup>bc</sup>
60	n.d.	24,60±0,6 <sup>cd</sup>	20,15±0,8 <sup>ab</sup>	22,33±0,8 <sup>bc</sup>	22,36±0,7 <sup>bc</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

Por el contrario, en los tratamientos con HPP disminuyó el parámetro  $a^*$  durante el tiempo del estudio de vida útil.

El parámetro  $b^*$  mostró similitud para todos los tratamientos de nuestro estudio a día 0. Durante el almacenamiento hay gran variabilidad de los datos y, por tanto, no se aprecia una tendencia clara en ningún tratamiento (**Tabla 4.3**).

**Tabla 4.3.** Evolución del parámetro colorimétrico  $b^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	45,61±1 <sup>b</sup>	45,57±0,7 <sup>b</sup>	43,91±0,8 <sup>ab</sup>	43,78±0,7 <sup>ab</sup>	45,82±0,4 <sup>b</sup>
10	n.d.	48,04±0,5 <sup>c</sup>	50,64±1 <sup>d</sup>	51,04±0,9 <sup>d</sup>	50,61±1 <sup>d</sup>
20	n.d.	48,12±1 <sup>cd</sup>	50,10±0,9 <sup>cd</sup>	50,20±1 <sup>cd</sup>	50,59±1 <sup>d</sup>
30	n.d.	47,12±0,8 <sup>c</sup>	46,53±1 <sup>c</sup>	51,02±0,8 <sup>d</sup>	48,49±0,5 <sup>c</sup>
40	n.d.	44,08±0,6 <sup>b</sup>	44,76±0,9 <sup>b</sup>	48,23±1 <sup>cd</sup>	42,78±0,9 <sup>a</sup>
50	n.d.	45,69±1 <sup>b</sup>	44,29±1 <sup>ab</sup>	49,82±1 <sup>cd</sup>	42,29±0,8 <sup>a</sup>
60	n.d.	45,79±0,5 <sup>b</sup>	47,39±0,7 <sup>c</sup>	47,33±0,8 <sup>c</sup>	44,29±0,9 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

Para obtener una idea global del color, fue calculado para todos los tratamientos de nuestro estudio el valor  $\Delta E$ .

Este valor engloba en un solo dato los parámetros de cromaticidad ( $a^*$  y  $b^*$ ) y el parámetro de luminosidad ( $L^*$ ), de tal forma que es un indicador del oscurecimiento, puesto que, cuando descendió el valor de  $\Delta E$  se produjo un aumento del oscurecimiento en la muestra.

Como se aprecia en la **Tabla 4.4**, en el valor  $\Delta E$  durante el almacenamiento hay gran disparidad de datos y, por tanto, en ningún tratamiento se aprecia una clara tendencia.

**Tabla 4.4.** Evolución del parámetro colorimétrico  $\Delta E^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	n.d.	0,08±0,1	5,15±0,09	6,70±0,04	6,44±0,09
10	n.d.	6,52±0,09	9,73±0,05	7,84±0,07	6,93±0,02
20	n.d.	9,30±0,07	9,76±0,07	10,04±0,1	10,79±0,04
30	n.d.	8,78±0,04	7,46±0,07	9,23±0,06	8,79±0,06
40	n.d.	7,58±0,09	7,36±0,05	7,63±0,04	6,52±0,09
50	n.d.	5,90±0,02	10,39±0,11	4,72±0,06	5,39±0,08
60	n.d.	5,11±0,05	9,52±0,04	3,42±0,09	3,19±0,09

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

De manera global, se puede concluir que los tratamientos con HPP conservaron mejor el color original que el TT 90 °C, presentando este último un color ligeramente distinto y más oscuro al resto de tratamientos (**Figura 3.2**) seguramente por cocción del tomate, ya que, a esa temperatura hay una elevada degradación de los pigmentos que proporcionan el color. De hecho, Sadilova y col., (2009), concluyeron que la pasteurización favorece la formación de productos de degradación, pudiendo explicar el cambio de coloración.

Se ha observado, en general, que el HPP con baja temperatura no afectó a los pigmentos responsables del color, y que el HPP retuvo mejor el color que la pasteurización, por ejemplo, en puré de calabaza con HPP 400-600 MPa (Contador y col., 2014), en pepino con HPP 400 MPa durante 4 min (Zhao y col., 2013) o en puré de zanahoria a con HPP 600 MPa durante 15 min (Patras y col., 2009).

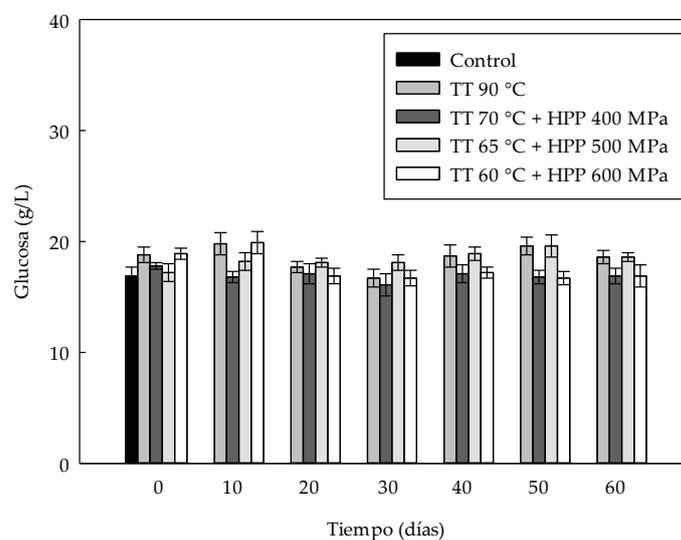
El zumo de pepino tratado con HPP a 400 MPa durante 4 min (Zhao y col., 2013), el puré de tomate tratado con HPP 400 MPa durante 15 min (Sánchez-Moreno y col., 2006) y una bebida a base de vegetales tratada con HPP 400 MPa durante 2-9 min (Barba, Esteve y Frigola, 2010) también obtuvieron mayor  $L^*$ , coincidiendo con los resultados. De igual modo, Andrés y col., (2016) observaron en los tratamientos con HPP una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) del valor  $L^*$ ,

que fue mayor cuanto mayor fue la presión aplicada (47,1 para HPP 550 MPa y 46,2 para HPP 650 MPa) en comparación con la muestra control.

#### 4.2.2.6. Azúcares mayoritarios (*glucosa, fructosa y sacarosa*)

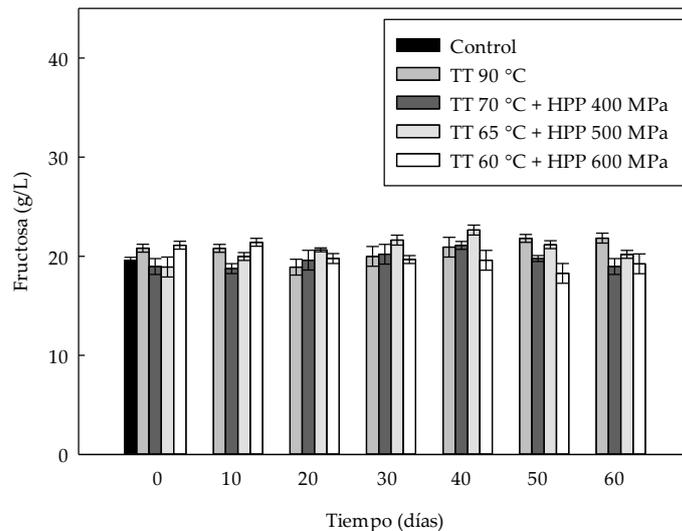
En ocasiones, los azúcares pueden sufrir alteraciones en su estructura química durante el tratamiento y almacenamiento de la fruta y los vegetales debido a la hidrólisis química (Vicente y col., 2009), actividad enzimática oxidativa (peroxidasa) o alteración microbiológica. En el estudio, el perfil de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa fue cuantificado, a lo largo del tiempo de almacenamiento, para todos los tratamientos.

Tal y como se muestra en la **Figura 4.22**, los niveles del contenido en glucosa fueron similares para todos tratamientos durante el período de almacenamiento, oscilando entre 16,71 y 19,6 g/L, y no mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil.



**Figura 4.22.** Evolución en el contenido de glucosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Del mismo modo, los niveles del contenido en fructosa (**Figura 4.23**) fueron similares para todos tratamientos durante el período de almacenamiento, oscilando entre 18,32 y 21,41 g/L, no mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil.



**Figura 4.23.** Evolución en el contenido de fructosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

El contenido en sacarosa estuvo por debajo del límite de detección (< 1 g/L) en todos los tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento (**Tabla 4.5**).

Algunos autores también han documentado la falta de sacarosa en zumos tratados con temperaturas suaves y pasteurizados (Hurtado y col., 2015; Wibowo y col., 2019).

Butz y col., (2003) afirmaron que la falta de sacarosa en frambuesa tratada con HPP y almacenada durante 30 días se debió a la inhibición incompleta de la enzima  $\beta$ -fructosidasa.

**Tabla 4.5.** Evolución en el contenido de sacarosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

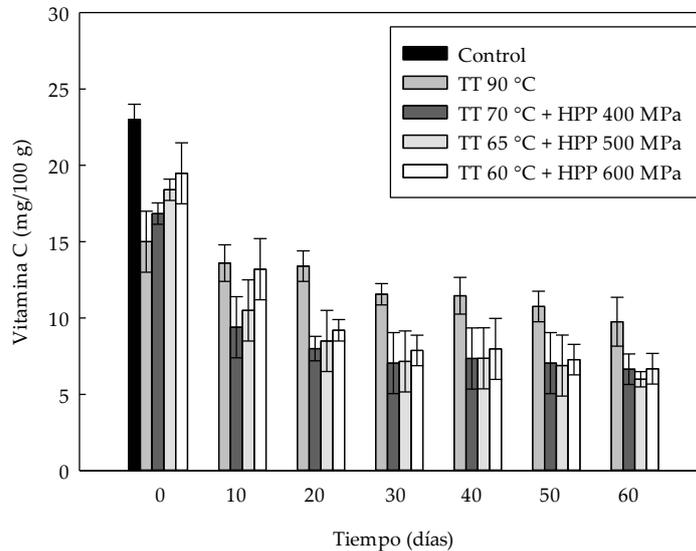
<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

La escasa variabilidad en los niveles de azúcares es un indicativo químico positivo, demostrando que no hay contaminación microbiológica. En caso contrario, los microorganismos fermentarían los azúcares y los transformarían en alcoholes, lo que supondría un descenso notable en sus concentraciones (además de alteraciones en el pH); Como se puede comprobar en las **Figuras 4.22, 4.23** y en la **Tabla 4.5** esto no sucedió, por lo que se puede afirmar la efectividad de todos los tratamientos en cuanto a la supervivencia microbiana, puesto que las muestras evolucionaron favorablemente.

#### 4.2.2.7. Nivel de vitamina C

La **Figura 4.24** muestra la evolución durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (4 °C) del contenido en vitamina C analizado tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.



**Figura 4.24.** Evolución en el contenido de vitamina C (mg/100 g) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento.

El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Según el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, para declarar un zumo/puré o bebida vegetal como fuente de vitamina C se requiere un contenido mínimo de 6 mg/100 g. En base a esto, tras aplicación de todos los tratamientos el puré de tomate siguió siendo fuente de vitamina C hasta el día 60 del almacenamiento.

Los resultados mostraron que los TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa (16,84, 18,41 y 19,48 mg/100 g, respectivamente) redujeron menos que el TT 90 °C (15 mg/100 g) el contenido total de vitamina C a día 0, puesto que emplearon menos temperatura.

A pesar de ello, la vitamina C se conservó mejor con el TT 90 °C a lo largo del tiempo de almacenamiento, y de los tres tratamientos que incluyeron HPP fue el TT 60 °C + HPP 600 MPa el que mejor retuvo el contenido de vitamina C durante el tiempo de almacenamiento.

El contenido en vitamina C de la muestra control mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al resto de los tratamientos. De igual

modo, el TT 90 °C mostro diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) frente al resto de los tratamientos entre los días 20 y 60 del estudio de vida útil.

Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para los tratamientos con HPP (TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa) entre los días del almacenamiento.

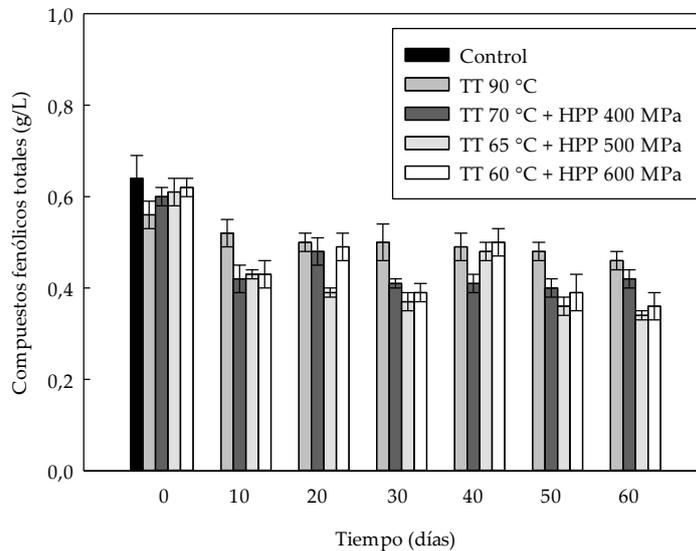
Normalmente la degradación de la vitamina C puede deberse a reacciones oxidativas catalizadas por enzimas oxidorreductasas como la POD (Vervoort y col., 2011) o a reacciones aeróbicas y anaeróbicas no enzimáticas causadas por alteraciones químicas o microbiológicas entre las moléculas que componen los zumos y purés vegetales (Jayathunge y col., 2015).

Además, la vitamina C es un antioxidante que se degrada con facilidad, por lo que es el más afectado y propenso a la degradación durante los tratamientos y tiempo de almacenamiento. Por esto es considerado un indicador cualitativo indispensable en la industria de zumos/purés y bebidas vegetales (Kalt, 2005; Esteve y Frígola, 2007).

Los resultados concuerdan con diferentes estudios realizados sobre la degradación de la vitamina C bajo tratamientos con HPP en varios zumos y purés vegetales. En todos ellos se comprobó que la vitamina C es degradada con facilidad bajo tratamientos con HPP o tratamientos con HPP y temperaturas suaves. Patras y col., (2009) en puré de tomate redujeron el contenido de vitamina C desde 20,83 (control) hasta 19,21 mg/100 g con HPP 600 MPa (durante 15 min), y hasta 12,51 mg/100 g con TT 70 °C (durante 2 min). Otro estudio, también en puré de tomate, observó la reducción del contenido en vitamina C desde 15,14 (control) hasta 10,6 mg/100 g con HPP 400 MPa (durante 15 min) (Sánchez-Moreno y col., 2006). De manera similar, Marszałek y col., (2017) encontraron que en puré de fresa se redujo el contenido de vitamina C, a día 0, desde 53,38 (control) hasta 37,88 mg/100 g con HPP 500 MPa + TT 50 °C.

#### 4.2.2.8. *Determinación de compuestos fenólicos totales*

Tras la aplicación de los diferentes tratamientos en el puré de tomate se estudiaron los cambios en el contenido de los compuestos fenólicos a lo largo del tiempo de almacenamiento (**Figura 4.25**).



**Figura 4.25.** Evolución en el contenido de compuestos fenólicos totales (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el periodo de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

En el caso de los tratamientos con HPP, a día 0, el contenido de los compuestos fenólicos se mantuvieron similares entre sí (0,60, 0,61 y 0,62 g/L para TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa, respectivamente) puesto que hay poca diferencia entre las temperaturas que emplearon en los distintos tratamientos, aunque fueron ligeramente inferiores al control (0,64 g/L). No obstante, de estos tres tratamientos fue el TT 60 °C + HPP 600 MPa el que mejor retuvo los contenidos de los compuestos fenólicos.

Por el contrario, también a día 0, el TT 90 °C mostró una reducción más causada en el contenido de los compuestos fenólicos (0,56 g/L) respecto al control y los tratamientos con HPP, debido a que las altas temperaturas degradaron más a los compuestos fenólicos.

A pesar de ello, desde el punto de vista estadístico, los compuestos fenólicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos a día 0.

A pesar de las ligeras pérdidas tras los tratamientos empleados, en el presente trabajo se observa que los compuestos fenólicos, igual que en otros trabajos, fueron resistentes a la presión (Keenan y col., 2012; Hurtado y col., 2015) y pasteurización (Landl y col., 2010; Marszalek y col., 2015).

Otro aspecto importante fue la disminución, entre el día 0 y el día 10, del contenido en compuestos fenólicos de los tratamientos con HPP seguramente causada por la actividad residual de POD (**Figura 4.15**); mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el contenido en compuestos fenólicos con estos tratamientos durante ambos días.

A partir del día 10 disminuyó progresivamente, con todos los tratamientos menos el TT 70 °C + HPP 400 MPa, el contenido en compuestos fenólicos hasta el final del estudio de vida útil, también a causa de POD. Por ello, de los tres tratamientos que incluyeron HPP, fue el TT 70 °C + HPP 400 MPa el mejor porque retuvo más los contenidos de compuestos fenólicos.

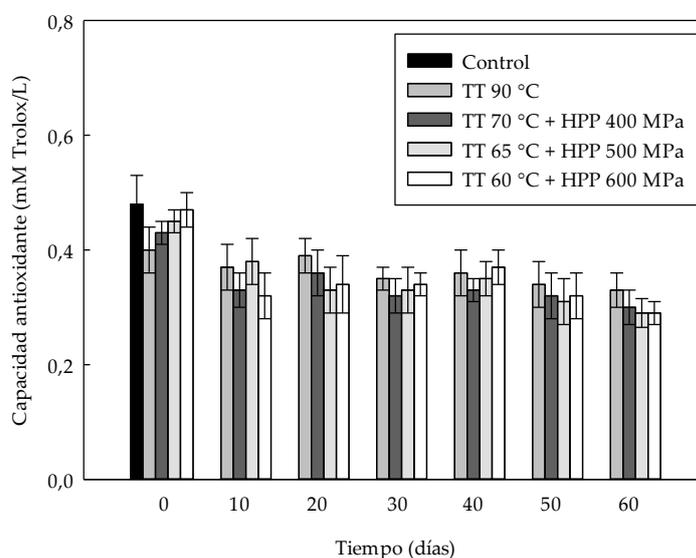
Sin embargo, de todos los tratamientos del estudio fue el TT 90 °C el que conservó mejor el contenido en compuestos fenólicos (puesto que empleó más temperatura y redujo más la actividad residual de POD); y evitó la disminución drástica entre los días 0 y 10.

Estos resultados concuerdan con Keenan y col., (2010), los cuales observaron una mayor pérdida en el contenido de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento, en tratamientos con HPP 450 MPa durante 3 min frente a TT 70 °C durante 10 min. De igual modo, otros autores también observaron la degradación en los compuestos fenólicos a lo largo del tiempo de almacenamiento en distintos zumos y purés vegetales tratados con HPP (Cao y col., 2012; Liu y col., 2014; Błaszczak, Amarowicz y Górecki, 2017).

#### *4.2.2.9. Determinación de la capacidad antioxidante*

El puré de tomate puede oxidarse y perder capacidad antioxidante durante el procesado y almacenamiento, como resultado de reacciones enzimáticas (principalmente por POD), químicas y microbiológicas.

Los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras de puré de tomate sometidas a distintos tratamientos a lo largo de la vida útil se muestran en la **Figura 4.26**.



**Figura 4.26.** Evolución en la capacidad antioxidante (mM Trolox/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Tal y como se puede observar, a día 0, los tratamientos con HPP apenas afectaron a la capacidad antioxidante, sin embargo, hubo una disminución mayor con el TT 90 °C (0,4 mM Trolox/L) puesto que empleó una elevada temperatura, degradando a la vitamina C (**Figura 4.24**) y los compuesto fenólicos (**Figura 4.25**), entre otros compuestos, responsables de la capacidad antioxidante.

Por este motivo, a día 0, la capacidad antioxidante no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los tratamientos que incluyeron HPP y el control.

Otros estudios tampoco encontraron cambios en la capacidad antioxidante en un zumo de naranja después del tratamiento con HPP (Fernández-García y col., 2001; Sánchez-Moreno y col., 2005).

Por el contrario, Keenan y col., (2010) informaron de ligeras diferencias entre el estado antioxidante de smoothies vegetales tratados con HPP 450 MPa durante 5 min y TT 70 °C durante 10 min. Estos resultados pueden ser explicados por la inhibición parcial de enzimas oxidasas (principalmente POD) bajo estas condiciones de presurización.

En el presente estudio tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para los tratamientos que incluyeron HPP y para el TT 90 °C, entre los días 10 y 60 del estudio de vida útil. Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre todos los tratamientos del día 0 y del resto de días hasta el final del estudio de vida útil (día 60); observándose una pérdida gradual de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento.

Estos resultados coinciden con los publicados por Błaszczak, Amarowicz y Górecki (2017), los cuales observaron una pérdida de la capacidad antioxidante a lo largo del tiempo de almacenamiento en un zumo de aronia tratado con HPP 600 MPa durante 15 min. Esto se puede producir cuando las condiciones de presurización son insuficientes para inactivar por completo las enzimas y su actividad residual provoca la oxidación durante el tiempo de almacenamiento.

### 4.2.3. Análisis microbiológico del estudio de vida útil en puré de tomate

#### 4.2.3.1. Mohos y levaduras

En las **Tablas 4.6** y **4.7** se muestran los resultados de los recuentos de mohos y levaduras, respectivamente, para el puré de tomate sometido a los diferentes tratamientos en el estudio tras 60 días de almacenamiento.

El recuento de mohos y levaduras fue  $< 0,69$  Log UFC/mL con todos los tratamientos durante el almacenamiento; siendo necesario al menos 6 Log UFC/mL para producir alteraciones sensoriales por fermentaciones según afirmaron Thomas y col., (2004).

Los resultados indican que todos los tratamientos empleados en el estudio de vida útil fueron eficaces para impedir el crecimiento a mohos y levaduras entre el día 0 y el día 30; por el contrario, el control mostró un crecimiento elevado puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no se inactivaron los mismos. Estos resultados se deben, además del efecto de los tratamientos, por el pH bajo del puré de tomate (3,8) el cual sensibiliza fuertemente a los microorganismos sometidos a HPP y/o temperaturas suaves o pasteurizaciones (Velázquez-Estrada y col., 2012).

En mohos (**Tabla 4.6**) se observa como a partir del día 40, con el TT 70 °C + HPP 400 MPa hubo recuentos de 0,6 y 0,69 Log UFC/mL, y a partir del día 50, con el TT 65 °C + HPP 500 MPa hubo recuentos de 0,3 Log UFC/mL. Sin embargo, con

los TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa no hubo crecimiento durante todo el tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.6.** Evolución en el recuento microbiológico de mohos (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	1,43±1,1 <sup>a</sup>	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
10	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
20	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
30	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
40	n.d.	< L.D.	0,60±0,6 <sup>b</sup>	< L.D.	< L.D.
50	n.d.	< L.D.	0,69±0,5 <sup>b</sup>	0,30±0,2 <sup>c</sup>	< L.D.
60	n.d.	< L.D.	0,69±0,3 <sup>b</sup>	0,30±0,3 <sup>c</sup>	< L.D.

<sup>a,b,c</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Por este motivo, de los tres tratamientos que incluyeron HPP fue el TT 60 °C + HPP 600 MPa el que mejor resultado obtuvo, eligiéndose como el mejor para impedir el crecimiento de mohos en el puré de tomate.

En el caso de las levaduras (**Tabla 4.7**) entre el día 40 y el día 60, con el TT 70 °C + HPP 400 MPa hubo recuentos que oscilaron entre 0,3 y 0,69 Log UFC/mL; y a partir del día 50, con el TT 65 °C + HPP 500 MPa hubo recuentos de 0,3 y 0,47 Log UFC/mL. Sin embargo, con los TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa no hubo crecimiento durante todo el tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.7.** Evolución en el recuento microbiológico de levaduras (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	5,41±1,7 <sup>a</sup>	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
10	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
20	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
30	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
40	n.d.	< L.D.	0,30±0,3 <sup>b</sup>	< L.D.	< L.D.
50	n.d.	< L.D.	0,69±0,6 <sup>c</sup>	0,30±0,3 <sup>b</sup>	< L.D.
60	n.d.	< L.D.	0,69±0,5 <sup>c</sup>	0,47±0,2 <sup>d</sup>	< L.D.

<sup>a,b,c,d</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Por esta razón, de los tres tratamientos que incluyeron HPP fue el TT 60 °C + HPP 600 MPa el que mejor resultado obtuvo, eligiéndose nuevamente como el más eficaz para impedir el crecimiento de levaduras en el puré de tomate.

Estos resultados concuerdan con los presentados por Landl y col., (2010), los cuales, tras aplicar HPP 400 MPa durante 5 min a un puré de manzana, no observaron crecimiento de mohos y levaduras durante 21 días de almacenamiento a 5 °C.

Del mismo modo, Varela-Santos y col., (2012) estudiaron el efecto del tratamiento HPP 350-550 MPa, durante diferentes tiempos de procesado en la calidad microbiológica del zumo de granada. Estos autores indicaron que tras aplicar una presurización media de 350 MPa durante 2 min, el nivel de mohos y levaduras estuvo por debajo del límite de detección durante el almacenamiento.

## 4.2.3.2. Bacterias acidófilas

En la **Tabla 4.8** se muestran los recuentos de bacterias acidófilas realizados tras los tratamientos desarrollados en el estudio entre el día 0 y el día 60.

**Tabla 4.8.** Evolución en el recuento microbiológico de bacterias acidófilas (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	5,45±1 <sup>a</sup>	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
10	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
20	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
30	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
40	n.d.	< L.D.	0,30±0,2 <sup>b</sup>	< L.D.	< L.D.
50	n.d.	< L.D.	0,60±0,5 <sup>c</sup>	0,30±0,2 <sup>b</sup>	< L.D.
60	n.d.	< L.D.	0,69±0,6 <sup>c</sup>	0,84±0,3 <sup>d</sup>	< L.D.

<sup>a,b,c,d</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Los valores de los recuentos de bacterias acidófilas se mantuvieron por debajo de 0,84 Log UFC/mL para todos los tratamientos a lo largo del almacenamiento; por el contrario, el control mostró un crecimiento mucho más elevado puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no se inactivaron las mismas.

Todos los tratamientos empleados fueron efectivos al mantener sin crecimiento a las bacterias acidófilas entre el día 0 y el día 30. No obstante, a partir del día 40, con el TT 70 °C + HPP 400 MPa hubo recuentos de 0,3 y 0,69 Log UFC/mL, y a partir del día 50, con el TT 65 °C + HPP 500 MPa hubo recuentos de 0,3 y 0,84 Log UFC/mL; con los TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa no se detectó crecimiento durante todo el tiempo de almacenamiento.

Por este motivo, de los tres tratamientos que incluyeron HPP fue el TT 60 °C + HPP 600 MPa el que mejor resultado obtuvo, eligiéndose como el mejor para impedir el crecimiento de bacterias acidófilas en el puré de tomate.

Estos resultados concuerdan con los publicados por Vercammen y col., (2012) en tomate ajustado a pH 4,2 y 5, y tratado con HPP (100-800 MPa) y un tratamiento térmico suave (60 °C); concluyeron que el tratamiento con HPP junto con un tratamiento térmico suave de 60 °C inactiva las esporas de los acidotermófilos *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Bacillus coagulans*, ofreciendo perspectivas para reducir los problemas de deterioro en productos ácidos causados por estas bacterias.

#### 4.2.3.3. Coliformes totales y *E. coli*

En las **Tablas 4.9** y **4.10** se muestran los respectivos recuentos microbiológicos de coliformes totales y *E. coli*, para el puré de tomate tratado con los tratamientos tras 60 días de almacenamiento.

**Tabla 4.9.** Evolución en el recuento microbiológico de coliformes (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	5,82±1,2	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
10	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
20	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
30	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
40	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
50	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
60	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

**Tabla 4.10.** Evolución en el recuento microbiológico de *E. coli* (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	0,69±0,5	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
10	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
20	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
30	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
40	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
50	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.
60	n.d.	< L.D.	< L.D.	< L.D.	< L.D.

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Los resultados muestran que no hay presencia ni crecimiento de coliformes totales y *E. coli*, tras los distintos tratamientos y a lo largo del tiempo de almacenamiento, tal y como exige el Reglamento (UE) n° 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019.

Por tanto, la aplicación de todos los tratamientos de nuestro estudio fue eficaz para impedir el crecimiento de bacterias patógenas; por el contrario, el control mostró un crecimiento elevado puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no se inactivaron los mismos.

Estos resultados se deben a que tratamientos con HPP inactivan microorganismos como *E. coli* (Ng y col., 2019); puesto que, se ha visto que altera la estructura celular y las funciones fisiológicas, rompiendo incluso las cadenas de ADN o desactivando la selectividad de las membranas (Lado y Yousef, 2002).

#### 4.2.3.4. Mesófilos aerobios totales

Tal y como puede observarse en la **Tabla 4.11**, todos los recuentos de microorganismos mesófilos aerobios, para todos los tratamientos empleados en las

muestras del estudio se encontraron por debajo de 5 Log UFC/mL, siendo este el límite establecido por el Reglamento (UE) nº 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019, para los mismos en alimentos.

Por el contrario, el control mostró un crecimiento que superó el límite (5,35 Log UFC/mL) puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no hubo nada que impidiera su crecimiento.

**Tabla 4.11.** Evolución en el recuento microbiológico de mesófilos aerobios totales (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	5,35±1,2 <sup>a</sup>	1,20±0,5 <sup>d</sup>	1,14±0,3 <sup>d</sup>	1,14±0,6 <sup>d</sup>	1,20±0,2 <sup>d</sup>
10	n.d.	1,46±0,6 <sup>cd</sup>	1,00±0,6 <sup>d</sup>	0,47±0,2 <sup>ef</sup>	0,69±0,6 <sup>e</sup>
20	n.d.	1,17±0,7 <sup>d</sup>	0,60±0,7 <sup>e</sup>	0,84±0,6 <sup>de</sup>	0,47±0,3 <sup>ef</sup>
30	n.d.	0,47±0,2 <sup>ef</sup>	0,30±0,2 <sup>g</sup>	0,95±0,4 <sup>de</sup>	0,69±0,3 <sup>e</sup>
40	n.d.	0,47±0,3 <sup>ef</sup>	0,47±0,4 <sup>fe</sup>	0,60±0,3 <sup>e</sup>	2,19±0,4 <sup>c</sup>
50	n.d.	3,77±1 <sup>b</sup>	0,30±0,2 <sup>g</sup>	0,69±0,5 <sup>e</sup>	0,60±0,3 <sup>e</sup>
60	n.d.	4,17±0,3 <sup>b</sup>	0,30±0,2 <sup>g</sup>	0,69±0,5 <sup>e</sup>	2,19±0,3 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

En base a los resultados obtenidos, estas condiciones se alcanzaron en todos los tratamientos de nuestro estudio a lo largo del tiempo de almacenamiento. No obstante, en comparación con el TT 90 °C, los tratamientos que incluyeron HPP fueron más eficaces en la reducción de la carga microbiológica del puré de tomate, aunque esto no supone una ventaja respecto al TT 90 °C, puesto que las cargas microbiológicas fueron bajas en ambos tipos de tratamientos.

En general, en los tratamientos con HPP los recuentos microbianos disminuyeron a partir del día 0. Esta disminución se debe a la inducción, mediante

el HPP, de daños en algunos microorganismos que no son capaces de reparar con el tiempo, provocando su muerte (De Lamo y col., 2005).

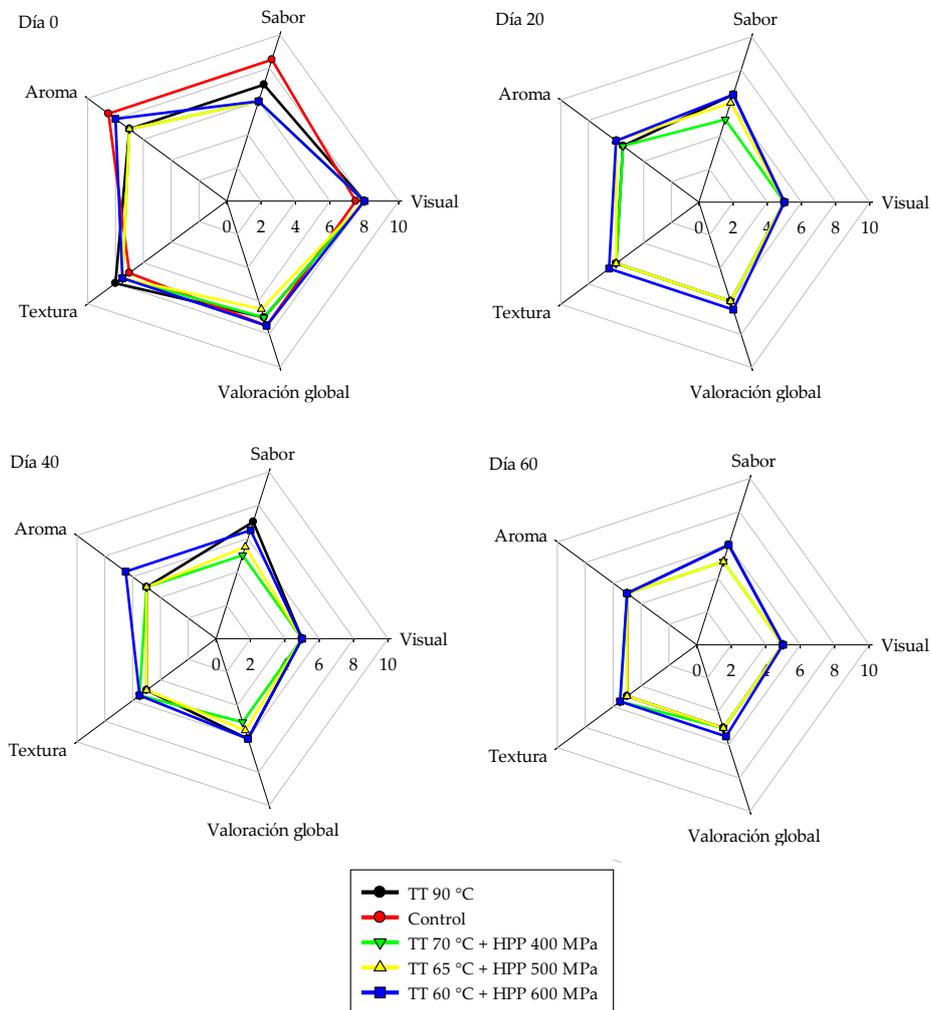
Según otros estudios la aplicación de HPP 200-400 MPa, fue eficaz para suprimir la mayoría de patógenos y microorganismos mesófilos aerobios presentes en los zumos de frutas (Varela-Santos y col., 2012; Juárez-Enríquez y col., 2014; Vega-Gálvez y col., 2014). Scolari y col., (2015) consiguieron destruir microorganismos por HPP 300 MPa durante 5 min en smoothies vegetales inoculados con *Zygosaccharomyces bailii* y *L. monocytogenes*. Otros estudios realizados en zumos de fruta inoculados con *S. cerevisiae* con 106 UFC/mL, y después sometido a tratamientos con HPP 290 MPa durante 30 min a temperatura ambiente, dieron como resultado la inactivación total de las levaduras (Hoover y col., 1989).

#### 4.2.4. Análisis sensorial del estudio de vida útil en puré de tomate

En la **Figura 4.27** se muestra la evolución durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (4 °C) del análisis sensorial del puré de tomate analizado tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.

A día 0, ninguno de los tratamientos del estudio tuvo consecuencias negativas graves en la calidad global del puré de tomate. De hecho, las puntuaciones de la valoración global de los tratamientos fueron 7,2, 7,1, 6,9 y 7,7 para el TT 90 °C, TT 70 °C + HPP 400 MPa, TT 65 °C + HPP 500 MPa y TT 60 °C + HPP 600 MPa, respectivamente, siendo similares entre sí y no mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ). A pesar de ello, a día 0, el TT 60 °C + HPP 600 MPa fue el que mejor valoración global obtuvo.

En otras investigaciones la aplicación de HPP 400 MPa durante 1-5 min en dos tipos de productos vegetales, calabaza y brócoli, y otro producto de calabacín, berenjena, espinaca y acelga, no tuvo efectos negativos sobre las características sensoriales (Masegosa y col., 2014). De igual modo, en el estudio realizado por Houska y col., (2006) no se encontraron diferencias sensoriales en un zumo de brócoli y manzana, almacenado durante 70 días, tras el tratamiento con HPP 500 MPa durante 10 min y su control. Sin embargo, la aplicación de tratamientos más intensos con HPP 500-800 MPa durante 20 min modificó el sabor del zumo de naranja (Fernández-García y col., 2001).



**Figura 4.27.** Evolución del análisis sensorial para los atributos estudiados en las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. Los TT 70/65/60 °C fueron calentados durante 5 min y, posteriormente, presurizados con HPP 400/500/600 MPa durante 3 min.

Otro aspecto relevante fue que el puré de tomate tratado con HPP estuvo libre de malos olores y sabores desagradables asociados con el tratamiento de conservación, mientras que el TT 90 °C, según los comentarios de los panelistas expertos, desarrolló un olor y sabor persistente a fruta cocida debido al empleo de mayor temperatura respecto a los tratamientos con HPP, lo que también explicaría su menor frescura (Wang y col., 2003; Wang, Wang y Liao, 2015).

Polydera, Stoforos y Taoukis, (2003) afirmaron que el desarrollo del olor y sabor a fruta cocida sería la diferencia sensorial más relevante entre los productos de frutas pasteurizados. Muchos compuestos del sabor presentes en los zumos de frutas están sujetos a ser degradados por los tratamientos térmicos, lo que resulta en pérdidas significativas de los sabores frutales naturales y desarrollo de sabores de frutas cocinadas (Wang y col., 2003).

Fue el puré de tomate con el TT 60 °C + HPP 600 MPa el que tuvo la mejor puntuación en la valoración global (con valores que oscilaron entre 7,7 a día 0, y 5,8 a día 60) a lo largo del tiempo de almacenamiento en comparación con el puré de tomate tratado con el resto de tratamientos del estudio; esto se debió a que este tratamiento empleó la menor temperatura de todos los tratamientos.

En otros estudios de vida útil, las pérdidas cualitativas sensoriales empezaron a ser notables a los 30 días de almacenamiento (4 °C) en smoothies vegetales tratados con HPP 450 MPa durante 5 min (Keenan y col., 2011) o a los 90 días de almacenamiento (4 °C) en zumo de naranja tratado con HPP 600 MPa + TT 40 °C (Polydera, Stoforos y Taoukis, 2005).

En el estudio de vida útil del puré de tomate concluimos a la vista de los resultados globales obtenidos, que el TT 60 °C + HPP 600 MPa fue el más idóneo de todos los tratamientos analizados en el estudio. Esto se debe a que mantuvo las mejores condiciones organolépticas y obtuvo los mejores resultados en los análisis microbiológicos, puesto que no se alteraron en ningún momento la calidad microbiológica; siendo importante remarcar que hasta el día 40 en refrigeración (4 °C) no se alteraron las características nutricionales con respecto a los otros tratamientos del estudio.

### 4.3. “ESTUDIO DE VIDA ÚTIL EN GAZPACHO: COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTO TÉRMICO SUAVE, ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA CON TRATAMIENTO TÉRMICO SUAVE Y PASTEURIZACIÓN CONVENCIONAL”

En el estudio de vida útil de puré de tomate, los tratamientos en los que se obtuvieron los mejores resultados a nivel microbiológico y sensorial fueron: TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa. Por esta razón, se decidió continuar evaluando dichos tratamientos en gazpacho (constituido al 70% por puré de tomate). Además, al estudio de vida útil de gazpacho se le decidió incluir el TT 60 °C, aprovechando una producción industrial que existía previamente y cuya finalidad responde a fines comerciales.

#### 4.3.1. Análisis enzimático del estudio de vida útil en gazpacho

##### 4.3.1.1. Actividad peroxidasa

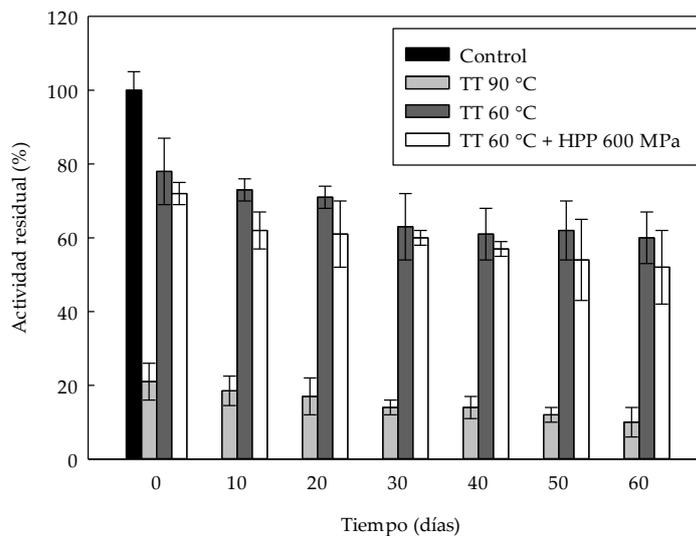
Tal y como se puede observar en la **Figura 4.28**, la POD del gazpacho se inactivó parcialmente cuando se trató con todos los tratamientos empleados en el estudio, siendo el TT 90 °C el más eficaz para inhibir la POD, al ser el que mayor temperatura empleó. Con este tratamiento, a día 0, la actividad residual que presentó la enzima fue del 21%, y fue disminuyendo a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Por otro lado, tras los TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa, también a día 0, la actividad residual fue del 78 y 72%, respectivamente, mostrando nuevamente a lo largo del tiempo de almacenamiento una disminución progresiva en la actividad residual; los % de actividad residual de POD con ambos tratamientos fueron muy elevados en relación con el TT 90 °C, puesto que las temperaturas que utilizaron fueron muy suaves y, por tanto, no consiguieron inhibir tan eficazmente la enzima.

En base a estos resultados, de los dos tratamientos del estudio que emplearon temperaturas suaves, se puede afirmar que el TT 60 °C + HPP 600 MPa fue mejor inhibiendo la POD que el TT 60 °C, ya que, al incluir HPP 600 MPa consiguió inhibir más la enzima. No obstante, ninguno de los tratamientos del estudio (incluido el TT 90 °C) consiguió la inactivación total de la POD.

Por otro lado, que los TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa fueran menos eficaces inhibiendo la POD de gazpacho que la de puré de tomate, se pudo deber a que el gazpacho contuvo diferentes isoformas de la enzima, ya que, cada uno de los ingredientes que lo componen (tomate, pepino, pimiento, cebolla y ajo) aportó la suya, encontrándose un efecto sinérgico por el sumatorio de la actividad POD de cada ingrediente.

La POD no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para los TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa, entre los días 10 y 60 del estudio de vida útil. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el control, el TT 90 °C y el resto de tratamientos (TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa), entre los días 0 y 60 del estudio de vida útil.



**Figura 4.28.** Evolución de la actividad residual de POD (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

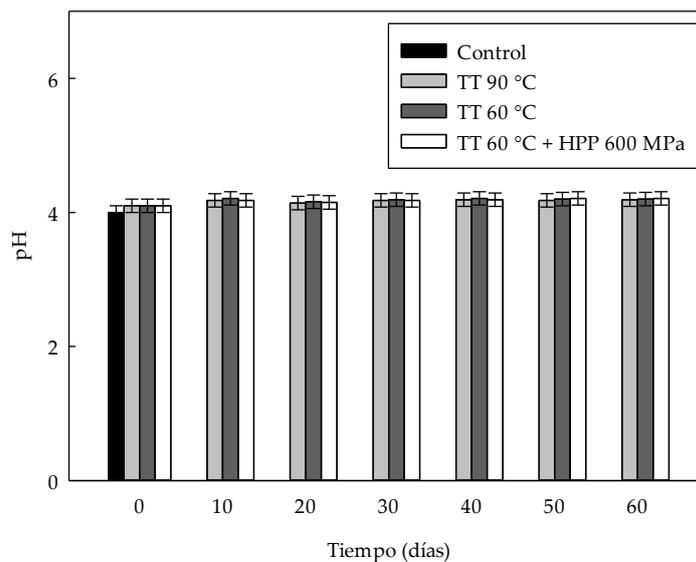
Los resultados concuerdan con otros estudios realizados sobre la POD en zumos (Wibowo y col., 2019). Vervoort y col., (2011) encontraron que la actividad residual fue del 65% en zumo de naranja tratado con HPP 600 MPa durante 1 min. Chang y col., (2017) observaron que la actividad residual fue del 50% en zumo de

uva tratado con HPP 600 MPa durante 5 min. Chakraborty, Rao y Mishra (2015) redujeron la actividad relativa ( $A/A_0$ ) en POD de piña desde 1 hasta 0,2 con TT 70 °C + HPP 600 MPa durante 20 min. Sin embargo, de Jesús, Leite y Cristianini (2018) no consiguieron reducir la actividad POD de fruta açai con HPP 600 MPa durante 15 min.

### 4.3.2. Análisis físico-químico del estudio de vida útil en gazpacho

#### 4.3.2.1. pH

En la **Figura 4.29** se muestra la evolución del pH para los distintos tratamientos desarrollados en el estudio a lo largo del tiempo de almacenamiento.



**Figura 4.29.** Evolución del pH para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

Uno de los factores más importantes a la hora de reducir y/o impedir el crecimiento microbiano en alimentos es el pH, puesto que, tal y como se ha comentado en el **Subapartado 4.2.2.1**, la mayor parte de los microorganismos que

contaminan los alimentos crecen mal o no crecen a valores de pH ácidos  $< 4,6$  (Crawford y col., 1996). Por ello, es fundamental ajustar los alimentos a estos valores para evitar las contaminaciones indeseables.

Se encontró que los valores de pH  $\pm 4$  se mantuvieron constantes en los tres tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil. El pH no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil, debido a que no existieron alteraciones microbiológicas graves que pudieran afectar a sus valores, lo cual es un indicativo de calidad para las muestras.

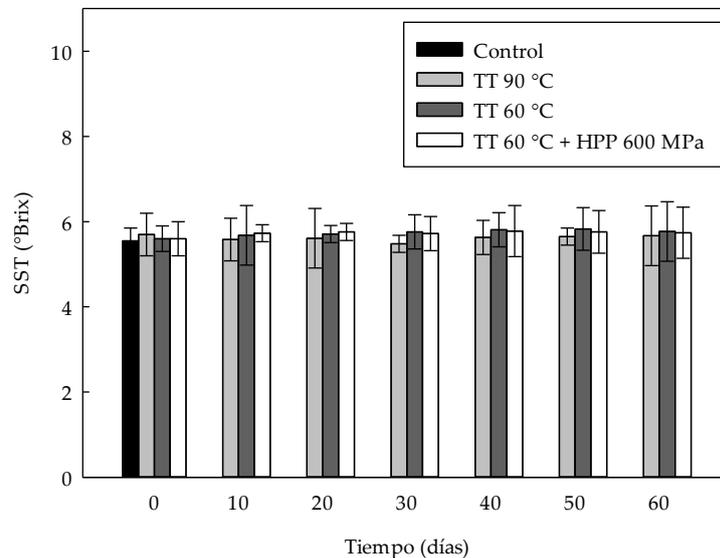
Los valores de pH fueron ligeramente superiores al gazpacho elaborado por Plaza y col., (2006) (3,85) e inferiores al elaborado por Verde-Méndez y col., (2011) (4,96).

#### 4.3.2.2. *Sólidos solubles totales*

Los valores del contenido en sólidos solubles totales comprendidos entre día 0 y el día 60 fueron constantes en todos los tratamientos del estudio (**Figura 4.30**). Por este motivo, los sólidos solubles totales no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil, presentando valores que oscilaron entre 5,4 y 5,8 °Brix, y mostrando una clara correlación en el contenido de azúcares mayoritarios del gazpacho (**Figuras 4.33, 4.34, y Tabla 4.16**), que tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ).

Los valores del contenido en sólidos solubles totales (5,4-5,8 °Brix) fueron similares al gazpacho elaborado por Verde-Méndez y col., (2011) (5,8 °Brix) e inferiores al elaborado por Plaza y col., (2006) (6,87 °Brix).

Por otro lado, los resultados del estudio difieren a los publicados por Wasim y Singh (2015) en tomate, donde si hubo una ligera reducción en el contenido de sólidos solubles totales durante el tiempo de almacenamiento.



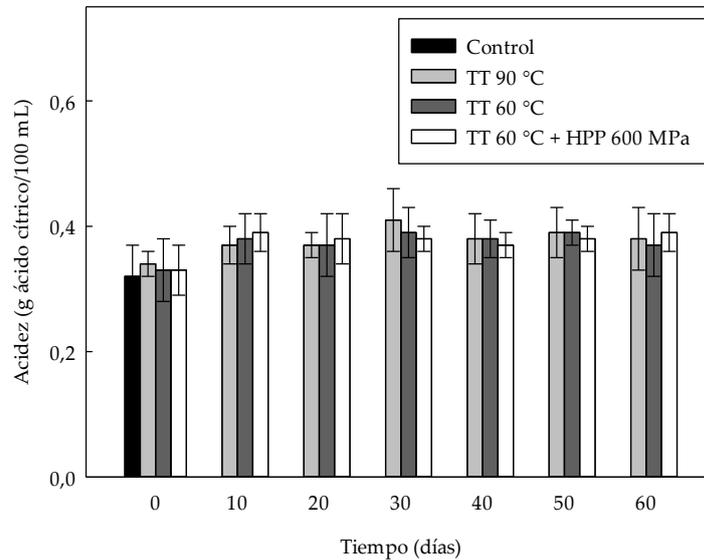
**Figura 4.30.** Evolución en el contenido de sólidos solubles totales (°Brix) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

#### 4.3.2.3. Ácidos titulables totales (acidez)

Como se observa en la **Figura 4.31**, a día 0, los valores del contenido en ácidos titulables totales de todos los tratamientos empleados en el estudio fueron ligeramente inferiores a los valores del resto de días de almacenamiento. Sin embargo, los mismos medidos entre el día 10 y el día 60 fueron similares entre sí con todos los tratamientos.

A pesar de ello, en los ácidos titulables totales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil, debido a que el pH (**Figura 4.29**) y los sólidos solubles totales (**Figura 4.30**) se mantuvieron sin diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) durante el tiempo de almacenamiento.

Los valores del contenido en ácidos titulables totales (0,34-0,39 g ácido cítrico/mL) fueron inferiores al gazpacho elaborado por Plaza y col., (2006) (0,64 g ácido cítrico/mL) y superiores al elaborado por Verde-Méndez y col., (2011) (0,14 g ácido cítrico/mL).



**Figura 4.31.** Evolución en el contenido de ácidos titulables totales (g ácido cítrico/100 mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

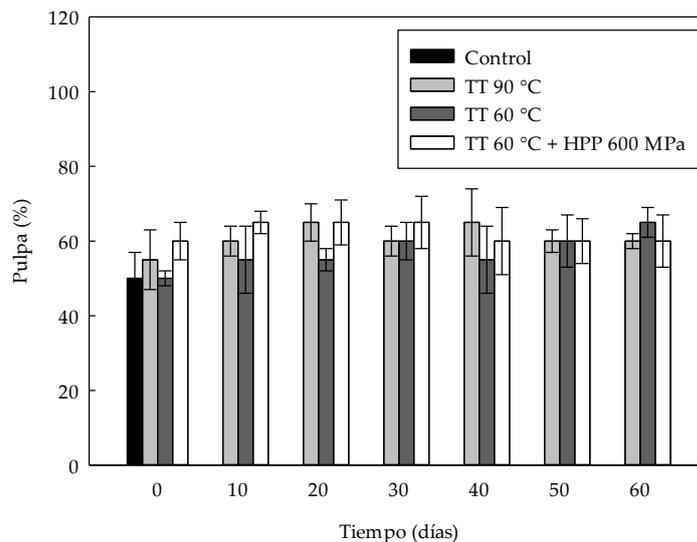
#### 4.3.2.4. Contenido en pulpa

Con respecto al contenido en pulpa, a día 0, los valores fueron ligeramente inferiores al resto de días analizados durante el almacenamiento, aumentando su contenido entre los días 0 y 10, manteniéndose estables y en valores adecuados (sin diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ )) durante el tiempo de almacenamiento restante (**Figura 4.32**).

El aumento del contenido en pulpa entre los días 0 y 10, al igual que ocurría en las muestras del puré de tomate, pudo deberse a que las actividades residuales de PME y PG (que actúan de manera sinérgica) provocaron pérdidas de estabilidad y viscosidad en las pectinas, precipitándolas y aumentando el contenido en pulpa de las muestras (Duvetter y col., 2009).

Los resultados concuerdan con los publicados por Welti-Chanes, Ochoa-Velasco y Guerrero-Beltrán (2009) en zumo de naranja, ya que demostraron que el tratamiento con HPP 50-250 MPa mantiene mucho mejor el contenido de pulpa que un zumo sin tratar, tras 12 días de almacenamiento a 4 °C. Por el contrario, Carreño

y col., (2010) cuando trataron un zumo de mandarina con HPP 150-450 MPa, encontraron una ligera disminución del contenido en pulpa desde el 2,44% (zumoz sin tratar) hasta el 2,26%.



**Figura 4.32.** Evolución en el contenido de pulpa (%) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

#### 4.3.2.5. Parámetros de color

Las **Tablas 4.12, 4.13 y 4.14** muestran la evolución durante el estudio de vida útil en refrigeración (4 °C), de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  analizados tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.

Para el valor del parámetro  $L^*$  (luminosidad), a día 0, no hubo diferencias entre los TT 90 °C (39,83), TT 60 °C (40,51) y TT 60 °C + HPP 600 MPa (40,35).

Sin embargo, a partir del día 10 hubo ligeros cambios en los valores del parámetro  $L^*$  en todos tratamientos, respecto al control (**Tabla 4.12**).

**Tabla 4.12.** Evolución del parámetro colorimétrico  $L^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	39,10±0,6 <sup>bc</sup>	39,83±0,5 <sup>bc</sup>	40,51±1 <sup>c</sup>	40,35±0,7 <sup>c</sup>
10	n.d.	36,80±0,7 <sup>b</sup>	36,87±0,6 <sup>b</sup>	36,52±0,6 <sup>b</sup>
20	n.d.	39,02±0,6 <sup>bc</sup>	37,34±0,3 <sup>b</sup>	37,02±0,4 <sup>b</sup>
30	n.d.	36,02±0,4 <sup>b</sup>	34,76±0,8 <sup>ab</sup>	36,41±0,5 <sup>b</sup>
40	n.d.	41,11±0,8 <sup>c</sup>	40,17±0,5 <sup>c</sup>	36,97±0,3 <sup>b</sup>
50	n.d.	40,11±0,5 <sup>c</sup>	39,19±0,7 <sup>bc</sup>	37,82±0,6 <sup>b</sup>
60	n.d.	37,02±0,3 <sup>b</sup>	35,83±0,7 <sup>b</sup>	35,81±0,6 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

En el valor del parámetro  $a^*$ , a día 0, hubo un ligero aumento con los TT 90 °C (40,01), TT 60 °C (39,73) y TT 60 °C + HPP 600 MPa (40,33), respecto al control (sin tratamiento) (38,72).

Sin embargo, a partir del día 10 de almacenamiento, los valores del parámetro  $a^*$  se mantuvieron similares respecto al control, en todos los tratamientos (Tabla 4.13).

**Tabla 4.13.** Evolución del parámetro colorimétrico  $a^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	38,72±0,5 <sup>bc</sup>	40,01±0,4 <sup>c</sup>	39,73±0,5 <sup>bc</sup>	40,33±0,9 <sup>c</sup>
10	n.d.	37,60±0,4 <sup>b</sup>	37,18±0,2 <sup>b</sup>	37,47±0,5 <sup>ab</sup>
20	n.d.	35,81±0,6 <sup>a</sup>	37,35±0,4 <sup>b</sup>	37,19±0,3 <sup>ab</sup>
30	n.d.	37,85±0,4 <sup>b</sup>	37,89±0,5 <sup>b</sup>	38,04±0,6 <sup>b</sup>
40	n.d.	35,65±0,5 <sup>a</sup>	38,01±0,3 <sup>b</sup>	36,91±0,4 <sup>ab</sup>
50	n.d.	37,65±1 <sup>ab</sup>	37,01±0,3 <sup>ab</sup>	37,01±1 <sup>ab</sup>
60	n.d.	38,55±0,5 <sup>b</sup>	38,17±0,4 <sup>b</sup>	38,56±0,4 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

El valor del parámetro  $b^*$ , a día 0, mostró un ligero aumento con los TT 90 °C (68,22), TT 60 °C (69,5) y TT 60 °C + HPP 600 MPa (69,2), respecto al control (sin tratamiento) (67,1).

Sin embargo, a lo largo del tiempo de almacenamiento hubo disminuciones en el valor del parámetro  $b^*$  con todos tratamientos, respecto al control (Tabla 4.14).

**Tabla 4.14.** Evolución del parámetro colorimétrico  $b^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	67,10±0,7 <sup>de</sup>	68,22±0,4 <sup>de</sup>	69,50±0,2 <sup>e</sup>	69,20±0,3 <sup>e</sup>
10	n.d.	63,16±0,3 <sup>bc</sup>	63,29±0,3 <sup>bc</sup>	62,70±0,6 <sup>bc</sup>
20	n.d.	66,42±0,5 <sup>d</sup>	64,09±1 <sup>c</sup>	63,41±0,5 <sup>bc</sup>
30	n.d.	61,83±0,6 <sup>bc</sup>	59,71±0,5 <sup>a</sup>	62,72±0,3 <sup>bc</sup>
40	n.d.	68,66±0,3 <sup>de</sup>	68,92±0,7 <sup>de</sup>	63,09±0,7 <sup>bc</sup>
50	n.d.	67,56±0,9 <sup>de</sup>	67,66±0,5 <sup>de</sup>	65,34±0,5 <sup>d</sup>
60	n.d.	64,12±0,4 <sup>c</sup>	62,91±0,4 <sup>bc</sup>	63,14±1 <sup>bc</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

Analizando de nuevo el valor  $\Delta E$ , para obtener una idea global del color (Tabla 4.15), se puede observar que hay una gran disparidad de datos que impiden obtener una conclusión clara.

**Tabla 4.15.** Evolución del parámetro colorimétrico  $\Delta E^*$  (CIELab) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	n.d.	1,84±0,03	2,92±0,05	2,92±0,07
10	n.d.	4,69±0,09	4,66±0,08	5,23±0,06
20	n.d.	3,02±0,04	3,71±0,07	4,44±0,09
30	n.d.	6,14±0,05	8,62±0,09	5,38±0,07
40	n.d.	3,97±0,07	2,13±0,03	4,15±0,08
50	n.d.	1,55±0,08	1,76±0,09	4,02±0,09
60	n.d.	3,61±0,03	5,39±0,07	5,02±0,09

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

De manera general, los TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa, conservaron mejor el color original que el TT 90 °C, presentando este último un color ligeramente distinto y más oscuro al resto de tratamientos (**Figura 3.3**).

Estos resultados tienen sentido, puesto que, la pasteurización favorece la formación de productos de degradación, pudiendo explicar el oscurecimiento y pérdida de color original, tal y como dicen otros autores (Sadilova y col., 2009). Por ello, las variaciones respecto al control en los parámetros  $L^*$  y  $a^*$ , se pueden atribuir a la degradación y polimerización de compuestos produciendo la alteración en el color del gazpacho. Pérez-Vicente y col., (2004) informaron que el color del zumo de granada se hizo más marrón con la pasteurización.

Por otro lado, en los resultados obtenidos también se puede observar que el HPP con baja temperatura afecta poco a los pigmentos responsables del color, y que el HPP retiene mejor el color que la pasteurización, tal y como describieron otros autores (Contador y col., 2014; Andrés y col., 2016).

Castellari y col., (2000) mostraron que un tratamiento con HPP 600 MPa durante 5 min y un TT 60 °C durante 10 min no tuvieron influencia sobre el parámetro  $L^*$  de la cerveza. Sin embargo, otros parámetros de color ( $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$ ) mostraron valores más altos en el caso del TT 60 °C.

Algunos autores afirmaron que tiene sentido pensar que las modificaciones que se observan en los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  a lo largo del tiempo de almacenamiento se deben, entre otros factores, a la acción de la POD (Chutia y col., 2019), ya que, tras los tratamientos sometidos al gazpacho del presente estudio, esta enzima solo fue inhibida parcialmente (**Figura 4.28**).

Posiblemente, la actividad enzimática residual de la POD contribuyó a los cambios en el color que presentaron las muestras de gazpacho con los tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento.

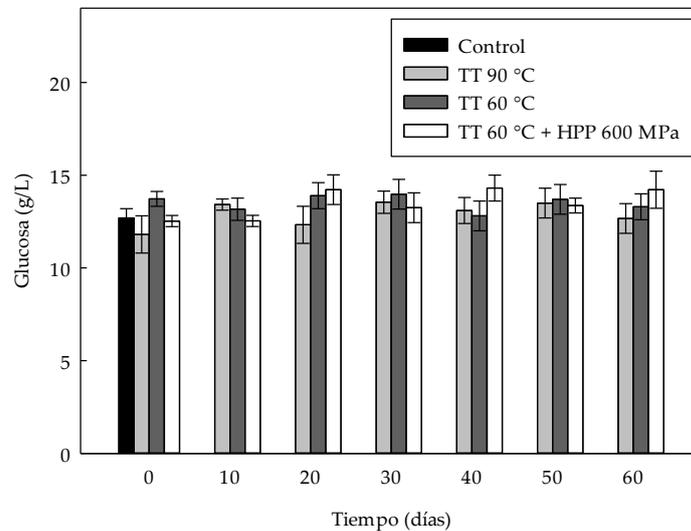
#### 4.3.2.6. Azúcares mayoritarios (*glucosa, fructosa y sacarosa*)

Las **Figuras 4.33** y **4.34**, y la **Tabla 4.16** muestran el efecto de los tratamientos de conservación y el tiempo de almacenamiento (60 días) sobre el contenido en glucosa, fructosa y sacarosa, respectivamente.

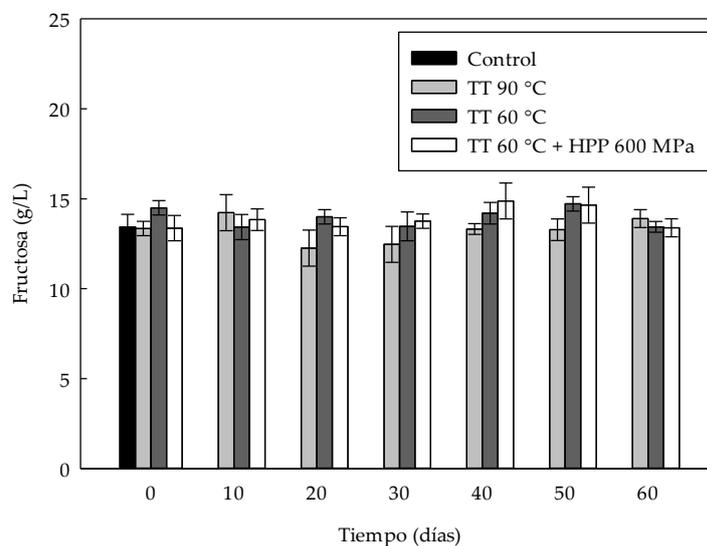
En general, el perfil de los azúcares del gazpacho no se vio afectado por los tratamientos y ni por el tiempo de almacenamiento, tal y como describieron Mihretu y Bhalekar (2016), y Vervoort y col., (2011). El principal azúcar encontrado fue la fructosa con un contenido medio de 14,21 g/L. No obstante, la glucosa y la fructosa se determinaron en cantidades promedio similares entre sí tras los distintos tratamientos.

Al igual que en el estudio de vida útil en puré de tomate, el contenido de glucosa de las muestras del gazpacho se mostró semejante en todos tratamientos durante el período de almacenamiento, oscilando entre 11,81 y 14,22 g/L, y no mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil (**Figura 4.33**).

De igual modo, en el contenido de fructosa tampoco hubo diferencias a causa de los tratamientos ni a lo largo del tiempo de almacenamiento, oscilando entre 13,35 y 14,72 g/L, y no mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos durante todos los días del estudio de vida útil (**Figura 4.34**).



**Figura 4.33.** Evolución en el contenido de glucosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.



**Figura 4.34.** Evolución en el contenido de fructosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

Tras los tratamientos y el posterior almacenamiento, el contenido de sacarosa se mantuvo siempre por debajo del límite de detección (< 1 g/L) en todas las muestras analizadas (también en el control (sin tratamiento)) (**Tabla 4.16**).

Autores como Butz y col., (2003), y Hurtado y col., (2015) también han documentado la falta de sacarosa en zumos tratados con temperaturas suaves y pasteurizados.

**Tabla 4.16.** Evolución en el contenido de sacarosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

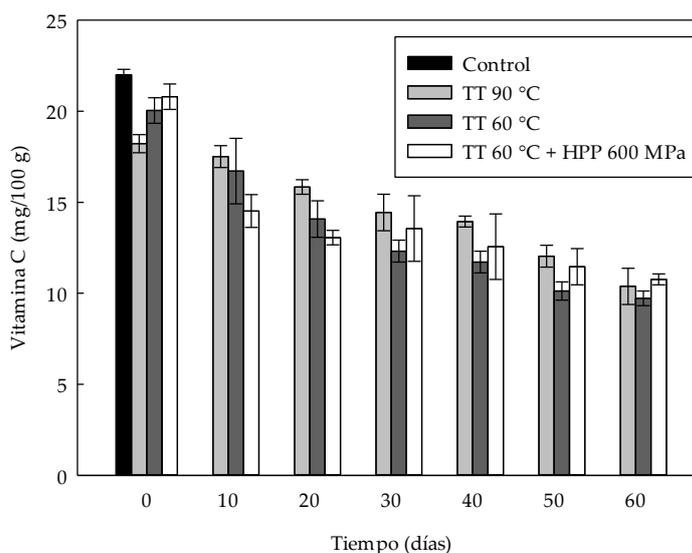
<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

En resumen, como se puede comprobar en las **Figuras 4.33, 4.34** y en la **Tabla 4.16**, en los niveles de azúcares mayoritarios no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) con los tratamientos a lo largo del tiempo de almacenamiento, demostrando que no hay contaminación microbiológica. En caso contrario, los microorganismos fermentarían los azúcares y los transformarían en alcoholes, lo que supondría un descenso notable en sus concentraciones (además de alteraciones en el pH); esto no sucede, por lo tanto, se puede afirmar la idoneidad de todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento.

## 4.3.2.7. Nivel de vitamina C

En la **Figura 4.35** se muestra la evolución durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (4 °C) del contenido en vitamina C analizado tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.



**Figura 4.35.** Evolución en el contenido de vitamina C (mg/100 g) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

Según el Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, para declarar un zumo/puré o bebida vegetal como fuente de vitamina C se requiere un contenido mínimo de 6 mg/100 g. En base a esto, tras la aplicación de todos los tratamientos el gazpacho siguió siendo fuente de vitamina C hasta el día 60 del almacenamiento.

El control, el TT 90 °C y el TT 60 °C + HPP 600 MPa a día 0, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al resto de días del estudio de vida útil. Por otro lado, también a día 0, la aplicación de los tratamientos generó una ligera pérdida en el contenido de vitamina C, respecto al control, mostrándose significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ) al resto de tratamientos.

Estos resultados fueron similares a los publicados en diferentes estudios, comprobándose que la vitamina C es degradada bajo tratamientos con HPP y/o temperaturas suaves. Patras y col., (2009) en puré de tomate redujeron el contenido en vitamina C desde 20,83 (control) hasta 19,21 mg/100 g con HPP 600 MPa durante 15 min, y hasta 12,51 mg/100 g con TT 70 °C durante 2 min. De manera similar, Marszałek y col., (2017) encontraron que en puré de fresa se redujo el contenido en vitamina C desde 53,38 (control) hasta 37,88 mg/100 g con HPP 500 MPa + TT 50 °C.

Durante los primeros 20 días del estudio, los TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ), siendo siempre superior el contenido de vitamina C con el TT 90 °C. Esta tendencia en relación al contenido de vitamina C fue uniforme entre los días 30 y 60 del estudio de vida útil, con respecto a los tratamientos TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa.

El TT 60 °C durante los primeros 20 días del estudio de vida útil mostró valores intermedios del contenido de vitamina C cuando se comparó con el resto de tratamientos. El TT 60 °C entre los días 30 y 50 presentó, de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ), menor contenido de vitamina C respecto al TT 90 °C. Sin embargo, a lo largo del estudio de vida útil el contenido de vitamina C del TT 60 °C + HPP 600 MPa fue superior al TT 60 °C, aunque no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ).

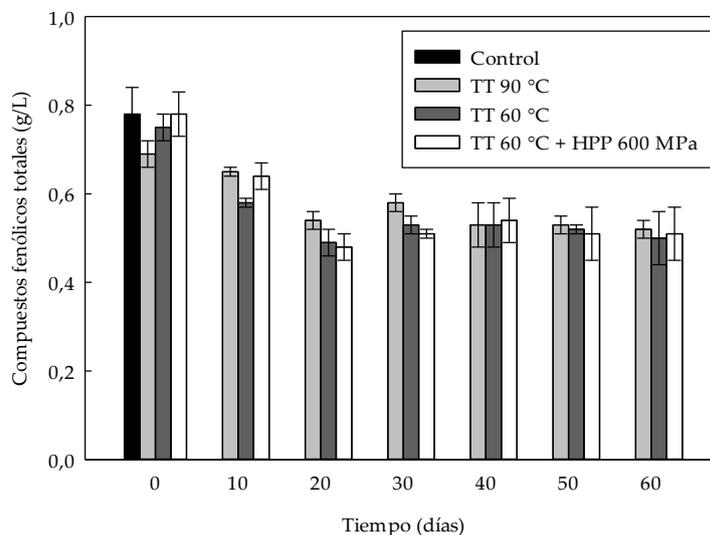
Por otro lado, los resultados demuestran que durante el tiempo de almacenamiento con todos los tratamientos hubo una pérdida en el contenido de vitamina C progresiva y gradual a lo largo del tiempo de almacenamiento, causada principalmente por la actividad residual de POD. De este modo, los resultados del estudio concuerdan con los publicados por Andrés y col., (2016), los cuales, tratando con HPP 650 MPa durante 3 min un smoothie de soja, observaron una reducción gradual durante el tiempo de almacenamiento del contenido en vitamina C desde 70 mg/100 mL a día 0, hasta 43 mg/100 mL a día 45. De manera similar, Jayathunge y col., (2015) observaron la reducción en el contenido de vitamina C desde 220 mg/100 mg a día 0, hasta 7 mg/100 mg a día 12, en un zumo de tomate tratado con 600 MPa durante 1 min.

En general, los TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa retuvieron peor el contenido en vitamina C que el TT 90 °C, a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Por esta razón, de todos los tratamientos del estudio el TT 90 °C fue el mejor, puesto que retuvo más el contenido en vitamina C.

#### 4.3.2.8. Determinación de compuestos fenólicos totales

Una vez procesado el gazpacho con los diferentes tratamientos empleados en el estudio, se estudiaron los cambios en el contenido de los compuestos fenólicos a lo largo del tiempo de almacenamiento (**Figura 4.36**).



**Figura 4.36.** Evolución en el contenido de compuestos fenólicos totales (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

A día 0, los contenidos en compuestos fenólicos de los TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa fueron de 0,75 y 0,78 g/L, respectivamente, siendo similares al control (0,78 g/L); por lo que estos tratamientos apenas los degradaron, ya que, emplearon temperaturas suaves. Sin embargo, también a día 0, el TT 90 °C redujo ligeramente más, que los tratamientos anteriores, el contenido en los compuestos fenólicos (0,7 g/L), debido al empleo de una mayor temperatura.

A pesar de ello, los compuestos fenólicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos a día 0.

Por esta razón, los resultados demuestran que, coincidiendo con lo encontrado en la bibliografía, los compuestos fenólicos fueron bastante resistentes a la presurización (Hurtado y col., 2015; Kieling, Barbosa-Cánovas y Prudencio, 2018; Bansal y col., 2018) y pasteurización (Marszalek y col., 2015; Siguemoto y col., 2019).

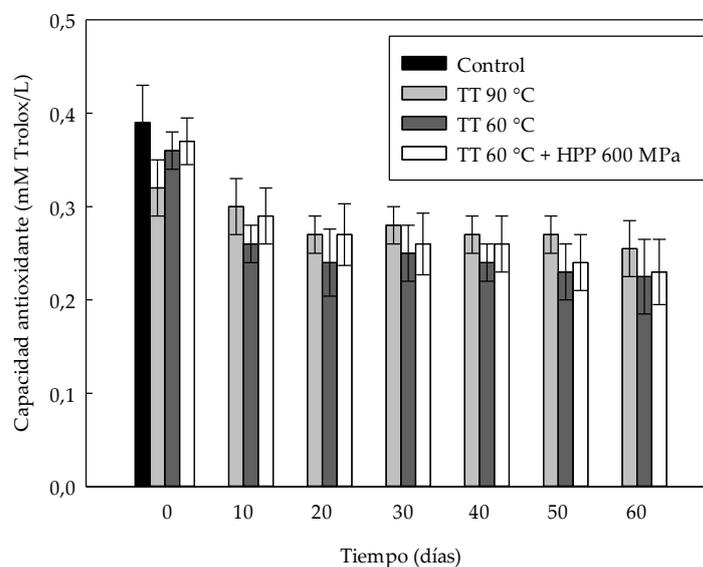
A partir del día 10, en todos los tratamientos disminuyó progresiva y gradualmente el contenido en compuestos fenólicos hasta el final del estudio de vida útil. A pesar de ello, el TT 90 °C conservó mejor, que el resto de tratamientos, el contenido en los compuestos fenólicos, puesto que fue más eficaz en la inhibición de POD (**Figura 4.28**). No obstante, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos a día 20, 40, 50 y 60. Por el contrario, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los TT 90 °C y TT 60 °C a día 10, y TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa a día 30.

Los resultados obtenidos concuerdan con Keenan y col., (2010), los cuales observaron una mayor pérdida en el contenido de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento, en tratamientos con HPP 450 MPa durante 3 min frente a TT 70 °C durante 10 min. De manera similar, otros autores también observaron la degradación en los compuestos fenólicos, a lo largo del tiempo de almacenamiento, en distintos zumos y purés vegetales tratados con HPP y/o TT (Liu y col., 2014; Błaszczak, Amarowicz y Górecki, 2017; Spira y col., 2018).

#### *4.3.2.9. Determinación de la capacidad antioxidante*

Desde el punto de vista de la actividad estructural y química, moléculas como la vitamina C o los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes naturales (Jayachandran, Chakraborty y Rao, 2015).

En la **Figura 4.37** se muestra la evolución durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (4 °C) de la capacidad antioxidante analizada tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.



**Figura 4.37.** Evolución en la capacidad antioxidante (mM Trolox/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a 4 °C durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT 90 °C fue pasteurizado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min. El TT 60 °C fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

A día 0, la capacidad antioxidante del gazpacho tratado con TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa (0,36 y 0,37 mM Trolox/L, respectivamente) apenas difirió del control (0,39 mM Trolox/L) puesto que emplearon temperaturas suaves que no consiguieron alterarla. Por el contrario, hubo una ligera disminución de la misma con el TT 90 °C (0,31 mM Trolox/L), ya que empleó mayor temperatura que los tratamientos anteriores. No obstante, la capacidad antioxidante no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre todos los tratamientos a día 0.

Sánchez-Moreno y col., (2005) tampoco encontraron cambios en la capacidad antioxidante en zumo de naranja después del tratamiento con HPP. Sin embargo, Bansal y col., (2018) observaron un ligero aumento en la capacidad antioxidante del zumo de lima dulce desde 67,3 hasta 69,21 (% DPPH), tras ser tratado con HPP 500 MPa durante 10 min. Estos mismos autores comprobaron la disminución en la capacidad antioxidante desde 67,3 hasta 62,1 (% DPPH), tras el TT 90 °C durante 1 min.

Entre los días 0 y 10, con todos los tratamientos del estudio, hubo una disminución en la capacidad antioxidante del gazpacho puesto que disminuyeron las concentraciones de vitamina C (**Figura 4.35**) y compuestos fenólicos (**Figura 4.36**) a causa de la actividad residual de POD (**Figura 4.28**). Además, la capacidad antioxidante de todos los tratamientos disminuyó progresivamente a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para los TT 90 °C, TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa, entre los días 10 y 60 del estudio de vida útil. Por el contrario, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre todos los tratamientos del día 0 y del resto de días hasta el final del estudio de vida útil (día 60).

Los resultados coinciden con los publicados por Błaszczak, Amarowicz y Górecki (2017), los cuales observaron una pérdida de la capacidad antioxidante a lo largo del tiempo de almacenamiento en un zumo de aronia tratado con HPP 600 MPa durante 15 min. Esto se puede deber a que cuando las condiciones de presurización aplicadas no son suficientes para la inactivación de las enzimas, las actividades residuales pueden favorecer la oxidación durante el tiempo de almacenamiento.

Por lo mencionado en los párrafos anteriores, se puede concluir que en el presente estudio el tiempo de almacenamiento afectó más a la capacidad antioxidante que los tratamientos empleados; además, de los tres tratamientos empleados, fue el TT 90 °C el que mejor conservó la capacidad antioxidante del gazpacho durante el tiempo de almacenamiento.

Los resultados concuerdan con el estudio de vida útil publicado por Keenan y col., (2010). Estos autores tras presurizar smoothies mostraron una mayor reducción de la capacidad antioxidante, sugiriendo, una vez más, que los enzimas oxidativos pueden contribuir a la reducción de la capacidad antioxidante, mientras que la inhibición térmica de estos enzimas ayudaría a estabilizar el estado antioxidante de los smoothies de frutas.

### 4.3.3. Análisis microbiológico del estudio de vida útil en gazpacho

#### 4.3.3.1. Mohos y levaduras

Las **Tablas 4.17** y **4.18** muestran los resultados de los recuentos de mohos y levaduras del gazpacho tratado con los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento.

Los valores de los recuentos de mohos y levaduras se mostraron inferiores al límite de detección (0,1 Log UFC/mL) durante el tiempo que duró el estudio de vida útil; sin embargo, el control mostró crecimiento de ambos grupos de microorganismos puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no se inactivaron los mismos. Esta ausencia de crecimiento se puede deber, además del efecto de los tratamientos, por el pH bajo del gazpacho (pH 4) el cual sensibiliza fuertemente a los microorganismos sometidos a HPP y/o temperaturas suaves o pasteurizaciones (Velázquez-Estrada y col., 2012).

Por tanto, los resultados indican que todos los tratamientos empleados en el estudio de vida útil fueron igual de efectivos para impedir el crecimiento a mohos y levaduras durante el tiempo de almacenamiento. De hecho, en ningún momento se aproximaron a los 6 Log UFC/mL necesarios para producir alteraciones sensoriales por fermentación tal y como afirmaron Thomas y col., (2004).

No obstante, hubo recuentos bajos en los controles de mohos (2,38 Log UFC/mL) y levaduras (2,61 Log UFC/mL), por lo que no se plantearon grandes dificultades a la hora de impedir su crecimiento con los tratamientos y mantenerlos por debajo del límite de detección durante el tiempo de almacenamiento.

**Tabla 4.17.** Evolución en el recuento microbiológico de mohos (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	2,38±1,2	<LD	<LD	<LD
10	n.d.	<LD	<LD	<LD
20	n.d.	<LD	<LD	<LD
30	n.d.	<LD	<LD	<LD
40	n.d.	<LD	<LD	<LD
50	n.d.	<LD	<LD	<LD
60	n.d.	<LD	<LD	<LD

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

**Tabla 4.18.** Evolución en el recuento microbiológico de levaduras (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	2,61±1,3	<LD	<LD	<LD
10	n.d.	<LD	<LD	<LD
20	n.d.	<LD	<LD	<LD
30	n.d.	<LD	<LD	<LD
40	n.d.	<LD	<LD	<LD
50	n.d.	<LD	<LD	<LD
60	n.d.	<LD	<LD	<LD

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Diversos estudios han comprobado la eficacia del HPP con temperaturas suaves en la inactivación de mohos y levaduras presentes de manera natural en los

zumos/purés y bebidas vegetales (Hartyáni, Dalmadi y Knorr, 2013; Chai y col., 2014; Liu y col., 2014; Andrés, Villanueva y Tenorio, 2016).

Shahabaz y col., (2016) analizaron el efecto del HPP sobre la calidad del zumo de manzana, observando que el tratamiento con HPP 500 MPa durante 1 min redujo en 5,8 Log UFC/mL a *S. cerevisiae*. Li y col., (2015) en un smoothie vegetal redujeron los recuentos de mohos y levaduras en 2,5 Log UFC/mL, tras el tratamiento con HPP 550 MPa durante 2-10 min. Moussa y col., (2017) en zumo de cactus, redujeron los recuentos de mohos y levaduras en 3 Log UFC/mL tras el tratamiento con HPP 600 MPa durante 10 min. Hurtado y col., (2017) con HPP 350 MPa durante 7 min, redujeron en 1,8 Log UFC/mL los recuentos de mohos y levaduras en un smoothie de frutas rojas, naranja, banana y lima. Hsu, Tan y Chi (2008) en zumo de tomate, redujeron los recuentos mohos y levaduras a 3,6-3,7 Log UFC/mL, respectivamente, tras ser tratado con 300-500 MPa durante 10 min.

#### 4.3.3.2. Bacterias acidófilas

La evolución en el recuento de bacterias acidófilas analizado tras los tratamientos desarrollados en el estudio durante el tiempo de almacenamiento se muestra en la **Tabla 4.19**. Este grupo microbiológico suele tratarse de bacterias capaces de desarrollarse en condiciones de bajo pH (< 4,6).

Los valores de los recuentos de bacterias acidófilas se mantuvieron por debajo del límite de detección (0,1 Log UFC/mL) a lo largo del estudio de vida útil; por el contrario, el control mostró un crecimiento muy elevado puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no se inactivaron las mismas.

Los resultados demuestran que todos los tratamientos empleados en el estudio fueron efectivos para impedir el crecimiento de bacterias acidófilas durante el almacenamiento. Esto se debe principalmente al efecto de los tratamientos, ya que, dentro de este grupo de microorganismos pueden encontrarse los acidofílicos o acidotolerantes capaces de crecer a pH menores (Yamazaki, Teduka y Shinano, 1996) o iguales (Mallidis y col., 1990) al ajustado en gazpacho (pH 4).

Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por Vercammen y col., (2012) en puré de tomate ajustado a pH 4,2 y 5, y tratado con HPP 100-800 MPa y un TT 60 °C. Estos autores observaron que el tratamiento con HPP junto con un TT 60 °C inactivó las esporas de los acidotermófilos *Alicyclobacillus acidoterrestris* y

*Bacillus coagulans*, ofreciendo perspectivas para reducir los problemas de deterioro en productos ácidos causados por estas bacterias.

**Tabla 4.19.** Evolución en el recuento microbiológico de bacterias acidófilas (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	5,65±1,3	<LD	<LD	<LD
10	n.d.	<LD	<LD	<LD
20	n.d.	<LD	<LD	<LD
30	n.d.	<LD	<LD	<LD
40	n.d.	<LD	<LD	<LD
50	n.d.	<LD	<LD	<LD
60	n.d.	<LD	<LD	<LD

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

#### 4.3.3.3. Coliformes totales y *E. coli*

Las **Tablas 4.20** y **4.21** muestran los resultados microbiológicos de los recuentos de coliformes totales y *E. coli*, respectivamente, para el gazpacho tratado con los tratamientos empleados en el estudio durante el tiempo de almacenamiento.

En los resultados obtenidos se observa que los recuentos de coliformes totales y *E. coli* estuvieron ausentes tras los distintos tratamientos y a lo largo del tiempo de almacenamiento, tal y como exige el Reglamento (UE) n° 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019; por el contrario, el control mostró un crecimiento elevado puesto que fue “sin tratamiento” y, por tanto, no se inactivaron los mismos.

Por lo tanto, todos los tratamientos del estudio fueron igual de eficaces para impedir el crecimiento de las bacterias patógenas más comunes en zumos/purés y bebidas vegetales.

**Tabla 4.20.** Evolución en el recuento microbiológico de coliformes (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	2,39±1,5	<LD	<LD	<LD
10	n.d.	<LD	<LD	<LD
20	n.d.	<LD	<LD	<LD
30	n.d.	<LD	<LD	<LD
40	n.d.	<LD	<LD	<LD
50	n.d.	<LD	<LD	<LD
60	n.d.	<LD	<LD	<LD

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

**Tabla 4.21.** Evolución en el recuento microbiológico de *E. coli* (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	0,69±0,4	<LD	<LD	<LD
10	n.d.	<LD	<LD	<LD
20	n.d.	<LD	<LD	<LD
30	n.d.	<LD	<LD	<LD
40	n.d.	<LD	<LD	<LD
50	n.d.	<LD	<LD	<LD
60	n.d.	<LD	<LD	<LD

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Los resultados confirman que es posible obtener un gazpacho libre de microorganismos patogénicos mediante la aplicación del TT 60 °C + HPP 600 MPa o incluso el TT 60 °C, sin aditivos antimicrobianos adicionales. Por esta razón, no fue necesario aplicar mayores temperaturas para mantener los estándares microbiológicos que, por otro lado, podrían provocar cambios sensoriales indeseables. De esta forma la calidad microbiológica en gazpacho se puede asegurar sin gran dificultad a través del HPP o incluso con un simple tratamiento térmico suave (TT 60 °C).

En otros trabajos, presiones entre 200 y 600 MPa con un rango de temperaturas suaves (20-70 °C), fueron eficaces en la inactivación de la mayoría de patógenos en fase vegetativa presentes en los zumos y bebidas vegetales (Bayindirli y col., 2006; Balasubramaniam y Farkas, 2008; Vega-Gálvez y col., 2014; Ng y col., 2019).

Berenhauser y col., (2018) estudiaron el efecto del CO<sub>2</sub> cambiando con el HPP en la inactivación de bacterias aerobias mesófilas y *E. coli* ATCC 25922 previamente inoculadas en leche humana. Estos autores observaron una disminución significativa en el recuento microbiano de bacterias mesofílicas aeróbicas y de *E. coli*. Sus resultados indicaron que el procesamiento de CO<sub>2</sub> con HPP fue eficaz para reemplazar el proceso actual de pasteurización de la leche humana utilizando bajas temperaturas.

Pokhrel y col., (2019) estudiaron la eficacia del HPP 200-500 MPa solo o en combinación con TT 35 y 50 °C y nisina (25 y 50 ppm) para la inactivación de *L. innocua* y *E. coli* en zumo de zanahoria. El procesamiento con HPP 500 MPa a 20 °C durante 2 min, sin nisina, dio lugar a una reducción de 4 y 5 Log UFC/mL en *L. innocua* y *E. coli*, respectivamente. Además, se observó sinergismo entre el HPP, la nisina y el TT en todos los tratamientos para inactivar ambos microorganismos.

Zhu y col., (2019) estudiaron el efecto del procesamiento no térmico con UVC y HPP sobre el contenido nutritivo (proteína, vitamina C, polifenoles y antioxidantes), las características de calidad (viscosidad y color) y la seguridad microbiológica en la leche de nuez tigre. Estos autores establecieron los parámetros de los tratamientos anteriores para conseguir una reducción de 5 Log UFC/mL en *E. coli* P36, *L. innocua* ATCC 51742 y *S. Typhimurium* WG49 inoculados en la leche de nuez tigre. Por tanto, el TT 60 °C durante 30 min, el HPP 500 MPa durante 2 min

y el UVC a 45,2 mJ/cm<sup>2</sup> consiguieron reducir en 5 Log UFC/mL cada uno de los tres patógenos mencionados anteriormente.

#### 4.3.3.4. Mesófilos aerobios totales

Los recuentos de los microorganismos mesófilos aerobios realizados tras los tratamientos desarrollados en el estudio de gazpacho se muestran en la **Tabla 4.22**.

**Tabla 4.22.** Evolución en el recuento microbiológico de mesófilos aerobios totales (Log UFC/mL) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	6,35±1,1 <sup>a</sup>	<LD	3,36±0,4 <sup>b</sup>	3,61±1 <sup>b</sup>
10	n.d.	3,61±0,8 <sup>b</sup>	3,21±0,7 <sup>b</sup>	3,14±0,4 <sup>b</sup>
20	n.d.	3,02±0,9 <sup>b</sup>	3,15±0,5 <sup>b</sup>	3,01±1 <sup>b</sup>
30	n.d.	3,72±1 <sup>b</sup>	3,45±1 <sup>b</sup>	3,19±0,8 <sup>b</sup>
40	n.d.	3,36±0,6 <sup>b</sup>	3,17±1 <sup>b</sup>	3,32±0,5 <sup>b</sup>
50	n.d.	3,67±1 <sup>b</sup>	3,77±0,5 <sup>b</sup>	3,61±0,9 <sup>b</sup>
60	n.d.	3,68±0,5 <sup>b</sup>	3,73±1 <sup>b</sup>	3,76±0,7 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas  $p \geq 0,05$  para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/mL.

n.d.: no determinado.

Según el Reglamento (UE) nº 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019, para productos alimentarios se requiere un nivel de microorganismos mesófilos aerobios por debajo de 5 Log UFC/mL. Estas condiciones se alcanzaron en todos los tratamientos del estudio durante el tiempo de almacenamiento, ya que, los mismos fueron igual de eficaces en la reducción de la carga microbiológica del gazpacho; por el contrario, el control mostró un crecimiento que superó el requisito (6,35 Log UFC/mL) puesto que fue "sin tratamiento" y, por tanto, no hubo nada que impidiera el crecimiento.

En otros estudios, el recuento de mesófilos aerobios totales también se encontró, a lo largo de almacenamiento, dentro del límite requerido gracias al efecto de los tratamientos (Vega-Gálvez y col., 2014; Scolari y col., 2015; Kieling, Barbosa-Cánovas y Prudencio, 2018) y a la actividad antimicrobiana del ajo (Juárez-Segovia y col., 2019).

Además, el pH bajo del gazpacho también constituye un factor crucial para su conservación, y tiene un papel determinante en la estabilidad microbiológica de este producto (Crawford y col., 1996).

#### 4.3.4. Análisis sensorial del estudio de vida útil en gazpacho

En la **Figura 4.38** se muestra la evolución durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (4 °C) del análisis sensorial del gazpacho analizado tras los distintos tratamientos empleados en el estudio.

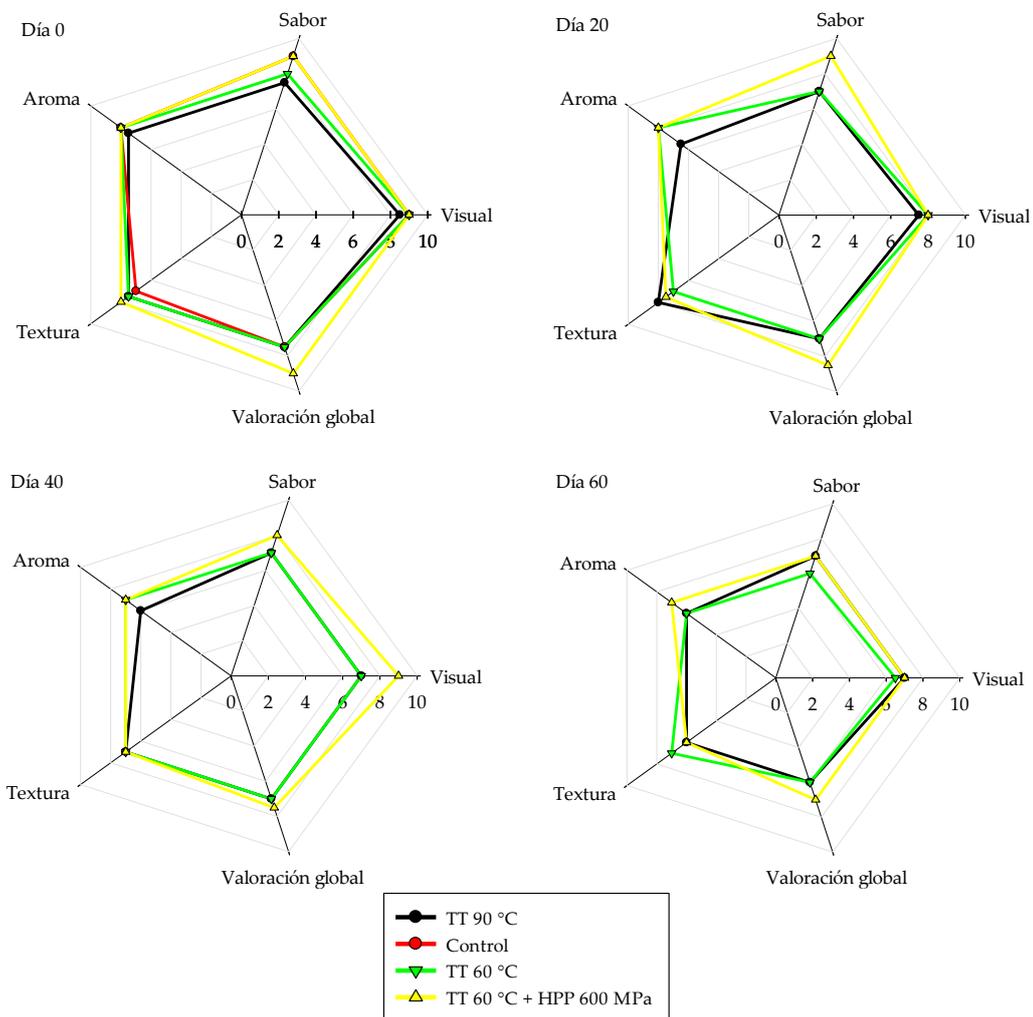
El gazpacho presenta un sabor complejo a causa de la mezcla de vegetales y condimentos que lo constituyeron (Plaza y col., 2006; Verde-Méndez y col., 2011). Este producto tiene características organolépticas tales como: un peculiar sabor, color, aroma y textura.

A día 0, los TT 60 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa no tuvieron consecuencias negativas sobre la calidad global del gazpacho. Por el contrario, también a día 0, tras el TT 90 °C hubo una pérdida en la puntuación del atributo de sabor respecto al control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la puntuación de este tratamiento (7,7) y la del TT 60 °C + HPP 600 MPa que obtuvo la puntuación más alta de sabor (9,1). Por otro lado, para el atributo de textura el TT 60 °C + HPP 600 MPa siguió siendo el que mayor puntuación obtuvo (8,1), frente al resto de tratamientos (7,8 y 7,7 para el TT 60 °C y TT 90 °C, respectivamente).

Por ello, a día 0, el gazpacho tratado con el TT 60 °C + HPP 600 MPa obtuvo mayor puntuación en la valoración global (9,2) que el control (7,8), TT 60 °C (7,8) y TT 90 °C (7,7).

A lo largo del tiempo de almacenamiento y para todos los tratamientos hubo una pérdida de calidad sensorial progresiva causada por la actividad enzimática (Ng y col., 2019) y la alteración microbiológica (Zhou y col., 2014). No obstante, el gazpacho tratado con el TT 60 °C + HPP 600 MPa retuvo los atributos sensoriales mejor que el resto de tratamientos del estudio, ya que, la aplicación de

HPP tiene pocas posibilidades de afectar a la estructura de pequeños compuestos moleculares del sabor, además si la temperatura previa a los tratamientos de presurización es suave ( $< 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), se reduce el riesgo de alteración de compuestos de sabor. Además, aunque los resultados de los recuentos microbiológicos fueron similares en los tres tratamientos, la aplicación de HPP pudo proporcionar un valor añadido a la estabilidad microbiológica (Zhu y col., 2019; Pokhrel y col., 2019).



**Figura 4.38.** Evolución del análisis sensorial para los atributos estudiados en las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4) almacenadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante el período de almacenamiento. El control fue la muestra sin tratamiento. El TT  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue pasteurizado durante 5 min. El TT  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue calentado durante 5 min. El TT  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue calentado durante 5 min y, posteriormente, presurizado con HPP 600 MPa durante 3 min.

Por lo mencionado anteriormente, podemos concluir que el gazpacho con el TT 60 °C + HPP 600 MPa fue el mejor sensorialmente, puesto que obtuvo la mayor puntuación en la valoración global para todos los puntos de muestreo evaluados a lo largo del tiempo de almacenamiento, escogiéndose como el tratamiento más adecuado.

En el estudio de vida útil del gazpacho concluimos a la vista de los resultados globales obtenidos, que el TT 60 °C + HPP 600 MPa fue el más idóneo de todos los tratamientos analizados en el estudio. Esto se debe a que mantuvo las mejores condiciones organolépticas y obtuvo resultados en los análisis microbiológicos que se encontraron dentro de los límites exigidos por Reglamento (UE) nº 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019.

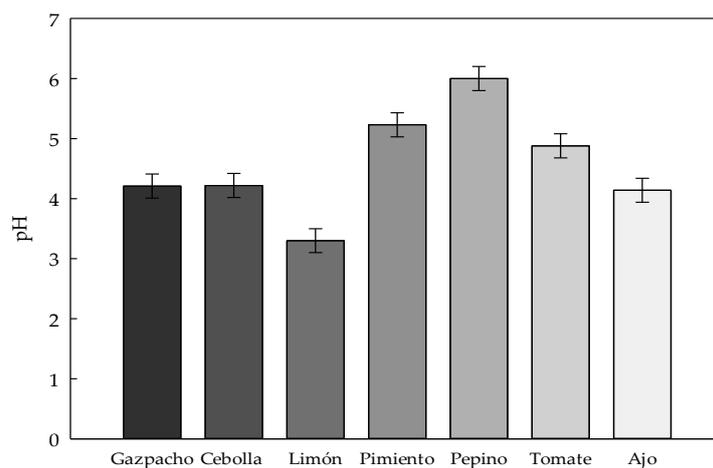
#### 4.4. "CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LOS SUBPRODUCTOS DEL GAZPACHO PARA PANIFICACIÓN"

##### 4.4.1. Análisis físico-químico de los subproductos del gazpacho

###### 4.4.1.1. pH

Los resultados del análisis el pH de los subproductos se muestra en la **Figura 4.39**.

Estos resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los valores de pH de los subproductos de gazpacho (4,2), cebolla (4,22) y ajo (4,14). El valor de pH del subproducto de gazpacho fue superior al descrito en gazpacho por Plaza y col., (2006) (3,8). En el caso de los subproductos de pimiento, pepino y tomate, los valores de pH fueron 5,23, 6 y 4,88, respectivamente. Estos resultados fueron similares a los descritos por Verde-Méndez y col., (2011) para pimiento, pepino y tomate, 6,15, 5,86 y 4,54, respectivamente. Sin embargo, el valor de pH del subproducto de limón fue 3,30, (mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) respecto al resto de valores de pH de los subproductos) siendo el valor más bajo de todos los subproductos que constituyen el subproducto de gazpacho.



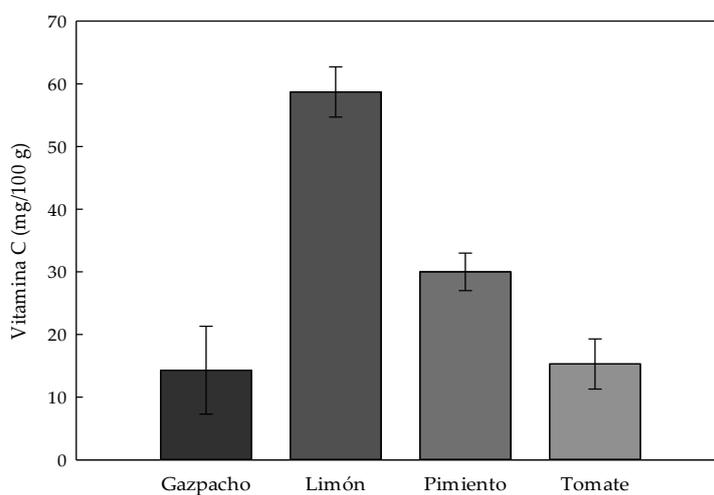
**Figura 4.39.** Valor del pH en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del subproducto de gazpacho.

#### 4.4.1.2. Nivel de vitamina C

Tal y como se aprecia en la **Figura 4.40**, el contenido en vitamina C de los subproductos de gazpacho (14,3 mg/100 g) y tomate (15,3 mg/100 g) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ), posiblemente debido a que el subproducto de gazpacho está constituido principalmente por subproducto de tomate.

Estos valores de vitamina C en subproductos de gazpacho y tomate son muy similares a los obtenidos por Verde-Méndez y col., (2011) en gazpacho (14,8 mg/100 g) y tomate (15,8 mg/100 g), respectivamente. Para los subproductos de pimiento y limón analizados, el contenido en vitamina C fue de 30 y 58,71 mg/100 g, respectivamente, mostrándose estadísticamente diferentes entre sí y respecto al resto de subproductos analizados ( $p \leq 0,05$ ); el subproducto de limón presentó la concentración más alta al proceder de una fruta cítrica, que son ricas en vitamina C (Soural, Šnurkovič y Bieniasz, 2019).

Estos resultados fueron diferentes a los descritos por Plaza y col., (2006) en pimiento (125 mg/100 g) y Paul y Shaha (2004) en limón (37 mg/100 g) puesto que emplearon las piezas enteras de los vegetales conteniendo mayor concentración de vitamina C.



**Figura 4.40.** Contenido de vitamina C (mg/100 g) en el subproducto de gazpacho y en algunos subproductos constituyentes del mismo.

#### 4.4.2. Análisis microbiológico de los subproductos del gazpacho

En la **Tabla 4.23** se muestran los recuentos de los microorganismos patógenos que se localizan con mayor frecuencia en frutas y verduras y, por tanto, en sus respectivos subproductos. Según exige el Reglamento (UE) nº 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019, se requiere ausencia de coliformes, *E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* en productos con fines alimentarios. Los recuentos de coliformes y *E. coli* en algunos subproductos frescos (gazpacho, ajo, pepino y pimiento) no cumplieron con el reglamento, por ello, antes de ser incorporados en la formulación de los grisines, se trataron con TT 110 °C durante 3 min, esterilizándose y convirtiéndose en seguros para formar parte de los grisines.

**Tabla 4.23.** Recuento microbiológico de patógenos para los subproductos del gazpacho y los subproductos constituyentes del mismo.

Subproductos	Coliformes totales (Log UFC/g)	<i>E. coli</i> (Log UFC/g)	<i>Salmonella spp.</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> (+/-)
<b>Gazpacho</b>	1,21±0,5 <sup>a</sup>	1,17±0,8 <sup>a</sup>	-
<b>Ajo</b>	1,10±0,7 <sup>a</sup>	1,11±0,1 <sup>a</sup>	-
<b>Cebolla</b>	<LD	<LD	-
<b>Limón</b>	<LD	<LD	-
<b>Pepino</b>	1,42±0,9 <sup>a</sup>	1,15±0,8 <sup>a</sup>	-
<b>Pimiento</b>	3,38±1,1 <sup>b</sup>	3,17±1,3 <sup>b</sup>	-
<b>Tomate</b>	<LD	<LD	-

<sup>a,b</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/g.

+/-: presencia/ausencia en 25 g.

La posible causa por la cual los recuentos microbiológicos de coliformes totales y *E. coli* en los subproductos “frescos” de gazpacho, ajo, pepino y pimiento no cumplieron con el límite exigido por el Reglamento (UE) nº 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019, puede ser la escasa limpieza de estos o incluso al tiempo o condiciones en las que fueron almacenados industrialmente hasta que se trataron y reincorporaron en la receta de grisines.

Autores como Kumar y col., (1998) o Saad y col., (2019) observaron que, a concentraciones de 10-20 g/L de extracto de ajo, se inhibe el crecimiento de los microorganismos y, a concentraciones más altas es germicida.

García y col., (2007) afirmaron que para extractos acuosos de ajo se observaban valores de halos de inhibición para *E. coli* y *S. aureus* ente 2-4 y 6-7 mm, respectivamente. Sin embargo, en el subproducto de ajo de este trabajo sí que se aprecia una elevada carga microbiana (coliformes totales y *E. coli*). Esto podría deberse a que este tipo de subproducto está constituido, en su mayoría, por la piel seca del ajo, en la cual no se han encontrado propiedades antisépticas, a diferencia del resto de las partes del ajo.

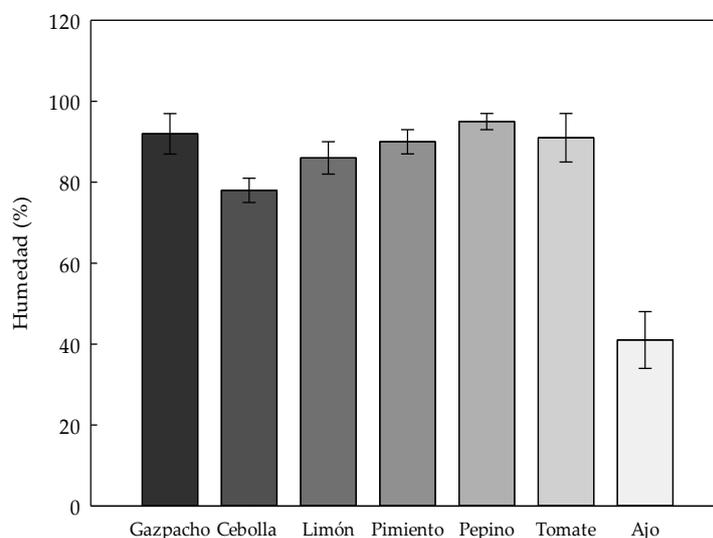
Por último, la ausencia de *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* puede deberse a su elevada sensibilidad al pH ácido que presentaron los subproductos (**Figura 4.39**).

#### 4.4.3. Análisis nutricional de los subproductos del gazpacho

##### 4.4.3.1. Humedad

En la **Figura 4.41** se muestran los valores de humedad (expresado en %) de los subproductos. Tal y como se puede apreciar, a excepción del subproducto de ajo (41%), puesto que está constituido por la piel seca baja en humedad, el contenido en humedad de los subproductos analizados fue similar entre sí; presentando porcentajes de humedad del 95% en subproducto de pepino, 91,96% en el subproducto de gazpacho, 91% en el subproducto de tomate, 90% en el subproducto de pimiento, 87% en el subproducto de limón y 78,71% en el subproducto de cebolla.

Analizando los valores de humedad de los presentes subproductos, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los subproductos de ajo y cebolla entre sí y entre el resto de los subproductos analizados.



**Figura 4.41.** Contenido de humedad (%) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

La humedad en subproductos de pimiento y tomate difiere de la descrita por Zou, Ma y Tian (2015) en semilla de pimiento picante (4,48%) y Silva y col., (2016) en orujo de tomate (67,53%), respectivamente.

Sin embargo, los porcentajes de humedad de los subproductos de pepino y limón fueron similares a los descritos por Litoriya, Gandhi y Talati (2014) en pepino Jwala (85,7%) y Paul y Shaha (2004) en limón entero (84%).

En el caso de los subproductos de cebolla y ajo analizados, el porcentaje fue menor al descrito por Yahaya, Uauri y Bagudo (2010) en cebolla entera (91,7%) y Sajid y col., (2014) en ajo entero (64,58%), respectivamente.

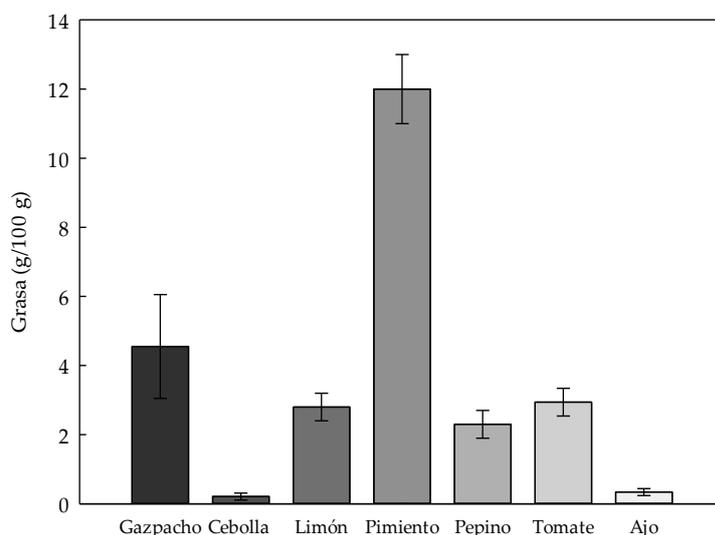
#### 4.4.3.2. Grasa

En la **Figura 4.42** se presentan los valores de grasa (expresados en g/100 g) de los subproductos.

El subproducto que presentó mayor contenido en grasa fue el de pimiento (12 g/100 g) debido a su elevado contenido en pieles y semillas ricas en materia grasa (Zou, Ma y Tian, 2015; Chouaibi y col., 2019); seguido por el subproducto de gazpacho (4,55 g/100 g). Por el contrario, en los subproductos de ajo (0,340 g/100 g)

y cebolla (0,21 g/100 g) fueron los que menos contenido en grasa presentaron, debido a que principalmente contenían pieles que son muy ricas en fibra (**Figura 4.45**).

Los contenidos en grasa de los subproductos de pepino, limón y tomate no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ). De igual modo, los contenidos en grasa de los subproductos de ajo y cebolla tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ). Por el contrario, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el contenido en grasa del subproducto de pimiento y el resto de los subproductos analizados.



**Figura 4.42.** *Contenido de grasa (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.*

El contenido en grasa de los subproductos de pimiento difiere del escrito por Zou, Ma y Tian (2015) en semilla de pimiento picante (23 g/100 g).

El contenido en grasa de los subproductos de pimiento, tomate, cebolla y limón difiere del descrito por Zou, Ma y Tian (2015) en semilla de pimiento picante (23 g/100 g), Silva y col., (2016) en orujo de tomate (14,5 g/100 g), Yahaya, Uauri y Bagudo (2010) en cebolla entera (11,11 g/100 g) y Paul y Shaha (2004) en limón entero (0,8 g/100 g), respectivamente.

En el caso del subproducto de ajo, el contenido de grasa fue ligeramente menor al descrito por Sajid y col., (2014) en ajo entero (0,52 g/100 g).

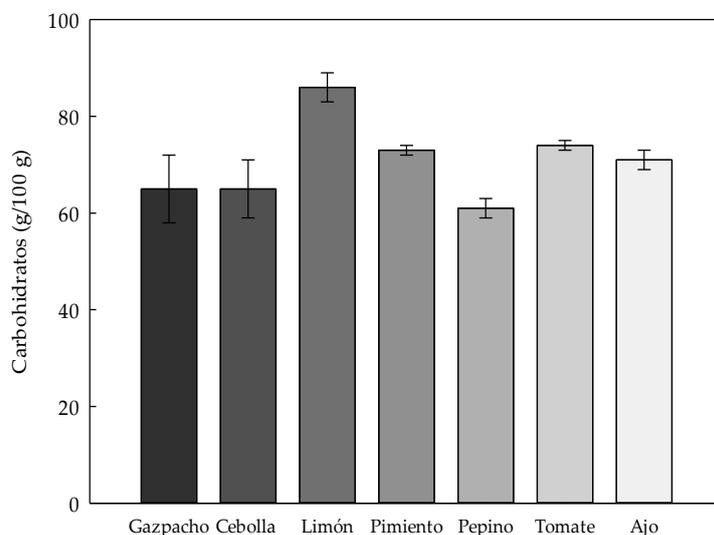
#### 4.4.3.3. Carbohidratos

En la **Figura 4.43** se presentan los valores de carbohidratos (expresados en g/100 g) de los subproductos.

El subproducto que presentó el mayor contenido en carbohidratos fue el de limón (86,11 g/100 g), seguido de los subproductos de pimienta (74,1 g/100 g), tomate (73,71 g/100 g) y ajo (71,01 g/100 g); por su parte, los contenidos en carbohidratos de los subproductos de pimienta, tomate y ajo no presentaron diferencias estadísticamente significativas sí ( $p \geq 0,05$ ).

Por el contrario, el subproducto de pepino (61,23 g/100 g) fue el que menos contenido en carbohidratos presentó, puesto que se obtuvo exclusivamente del pelado de la piel, que es rica en proteínas y fibra (**Figuras 4.44 y 4.45**). Los valores del contenido de carbohidratos en los subproductos de gazpacho (65 g/100 g) y cebolla (65 g/100 g) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido en carbohidratos de los subproductos de limón y pepino entre sí, y entre el resto de subproductos analizados.

Los valores de carbohidratos de los subproductos de limón, tomate y cebolla difieren de los descritos por Paul y Shaha (2004) en limón entero (10,80 g/100 g) y tomate amarelo (14,9 g/100 g), y Yahaya, Uauri y Bagudo (2010) en cebolla entera (64,53 g/100 g), respectivamente.



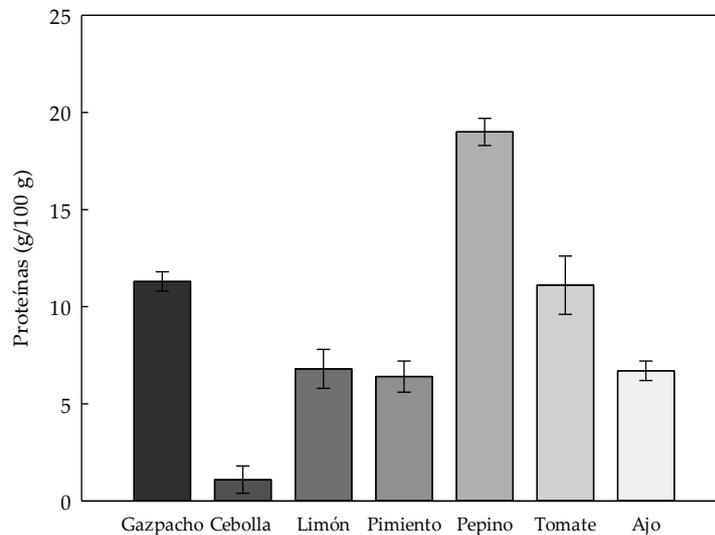
**Figura 4.43.** Contenido de carbohidratos (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

#### 4.4.3.4. Proteínas

En la **Figura 4.44** se presentan los valores de proteínas (expresados en g/100 g) de los subproductos.

El subproducto que presentó el mayor contenido en proteínas fue el de pepino (19 g/100 g), puesto que está constituido principalmente por las pieles del pelado de la hortaliza que son ricas en proteínas (Litoriya, Gandhi y Talati, 2014) y fibra (**Figura 4.45**); al contrario del subproducto de cebolla que mostró el contenido en proteínas más bajo de todos los subproductos del estudio, siendo de 1,11 g/100 g.

Por esta razón, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido en proteínas de los subproductos de cebolla y pepino entre sí, y entre el resto de subproductos analizados. Los contenidos en proteínas de los subproductos de gazpacho (11,34 g/100 g) y tomate (11,11 g/100 g) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ). De igual modo, también hubo similitud en el contenido en proteínas de los subproductos de limón (6,8 g/100 g), pimiento (6,4 g/100 g) y ajo (6,72 g/100 g), no presentando diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 4.44.** Contenido de proteínas (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

El contenido de proteínas en los subproductos de limón, tomate, pimiento, ajo, cebolla y pepino difiere de los descritos por Paul y Shaha (2004) en limón entero (0,9 g/100 g) y tomate amarelo (7,1 g/100 g), Zou, Ma y Tian (2015) en semilla de pimiento picante (21,29 g/100 g), Sajid y col., (2014) en ajo entero (7,87 g/100 g), Yahaya, Uauri y Bagudo (2010) en cebolla entera (6,48 g/100 g) y Litoriya, Gandhi y Talati (2014) en pepino Jwala (0,88 g/100 g), respectivamente.

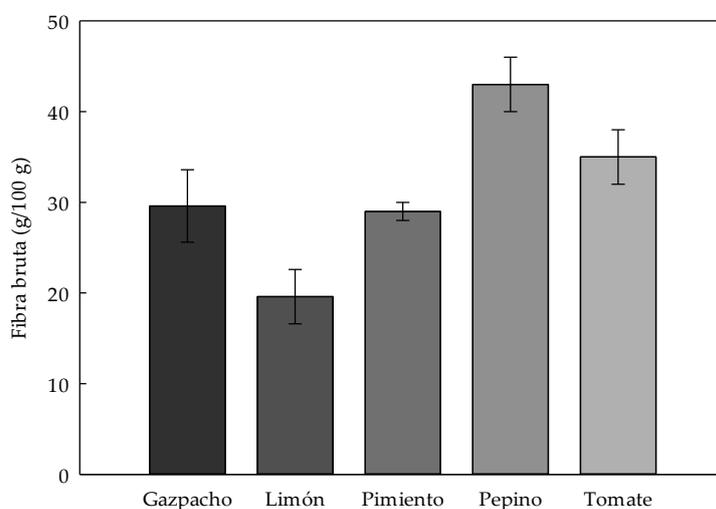
#### 4.4.3.5. Fibra bruta

En la **Figura 4.45** se presentan los valores de fibra bruta (expresados en g/100 g) de los subproductos.

Tal y como se puede observar, el subproducto que presentó mayor contenido en fibra bruta fue el de pepino (43 g/100 g) puesto que está constituido por la piel que rica en fibra y proteínas (**Figura 4.44**), seguido de los subproductos de tomate (35,1 g/100 g), gazpacho (29,6 g/100 g) y pimiento (29 g/100 g).

El de limón mostró el contenido en fibra bruta más bajo de todos los subproductos (19,64 g/100 g).

Los contenidos en fibra bruta de todos los subproductos analizados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 4.45.** Contenido de fibra bruta (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

El contenido de fibra bruta en los subproductos de pimiento, limón, tomate y pepino, fue diferente a los valores descritos por Zou, Ma y Tian (2015) en semilla de pimiento picante (38,76 g/100 g), Paul y Shaha (2004) en limón entero (1,6 g/100 g) y tomate amarelo (5 g/100 g), y Litoriya, Gandhi y Talati (2014) en pepino Jwala (6,7 g/100 g), respectivamente.

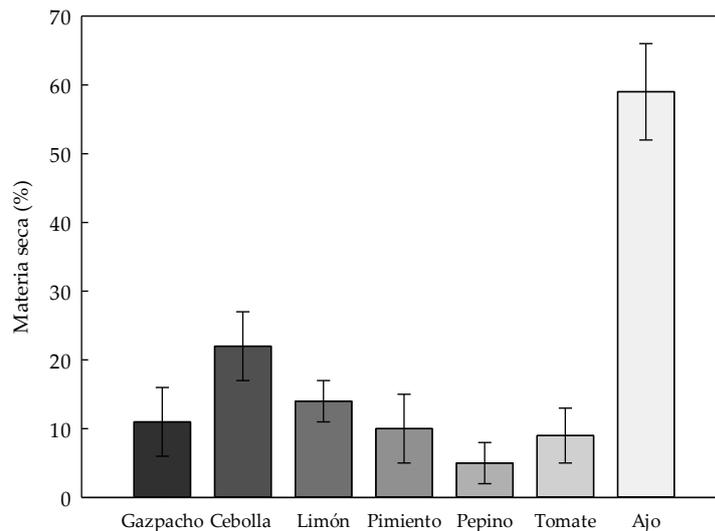
#### 4.4.3.6. Materia seca

En la **Figura 4.46** se presentan los valores de materia seca (expresados en g/100 g) de los subproductos.

El subproducto que presentó mayor contenido en materia seca fue el de ajo (59 g/100 g) debido a que está constituido principalmente por pieles secas que contienen muy poca cantidad de humedad (**Figura 4.41**); seguido del subproducto de cebolla (22 g/100 g) al que le ocurre algo similar, aunque estas pieles están más hidratadas. Por el contrario, fue el subproducto de pepino (5,04 g/100 g) el que mostró el contenido en materia seca más bajo, a causa de su elevada humedad (**Figura 4.41**).

Los contenidos en materia seca de los subproductos de gazpacho, limón, tomate y pimiento no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre

sí ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido en materia seca de los subproductos de ajo, cebolla y pepino entre sí, y entre el resto de subproductos.



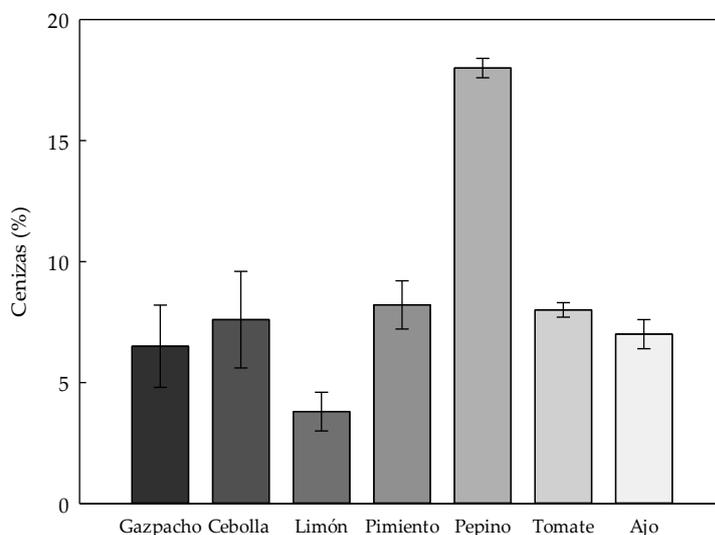
**Figura 4.46.** Contenido de materia seca (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

#### 4.4.3.7. Cenizas

En la **Figura 4.47** se presentan los valores de cenizas (expresados en g/100 g) de los subproductos.

Se observa que el subproducto que presentó el mayor contenido en cenizas fue el de pepino (18 g/100 g), seguido del pimiento (8,22 g/100 g), tomate (8 g/100 g), cebolla (7,63 g/100 g) y ajo (7,03 g/100 g). Por el contrario, el subproducto de limón (3,82 g/100 g) mostró el contenido en cenizas más bajo de los presentes subproductos.

Los contenidos en cenizas de los subproductos de gazpacho, cebolla, pimiento, tomate y ajo no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido en cenizas de los subproductos de limón y pepino entre sí, y entre el resto de subproductos.



**Figura 4.47.** Contenido de cenizas (g/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

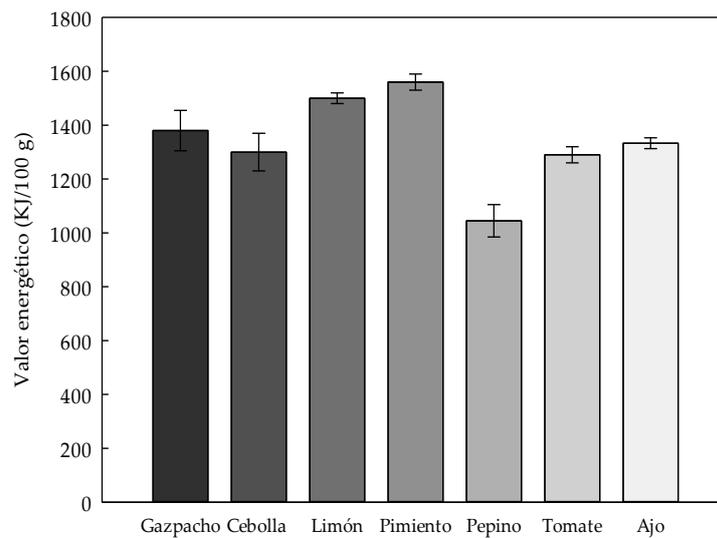
El contenido de cenizas en los subproductos de cebolla, pimiento, tomate y ajo, fue diferente a los valores descritos por Yahaya, Uauri y Bagudo (2010) en cebolla entera (4,26 g/100 g), Zou, Ma y Tian (2015) en semilla de pimiento picante (4,94 g/100 g), Silva y col., (2016) en orujo de tomate (3,53 g/100 g) y Sajid y col., (2014) en ajo entero (2,46 g/100 g), respectivamente.

#### 4.4.3.8. Valor energético

En la **Figura 4.48** se presentan los valores energéticos (expresados en KJ/100 g) de los subproductos.

Los valores energéticos de los subproductos de gazpacho (1380 KJ/100 g), cebolla (1300 KJ/100 g), tomate (1282 KJ/100 g) y ajo (1333 KJ/100 g) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ). De igual modo, los subproductos de limón (1500 KJ/100 g) y pimiento (1560 KJ/100 g) tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p \geq 0,05$ ); además fueron los que mayores valores energéticos presentaron a causa de su elevada cantidad de carbohidratos para el de limón, y de carbohidratos y grasa para el de pimiento.

Por su parte, el subproducto de pepino (1045 KJ/100 g) fue el que presentó el valor energético menor a causa de su baja cantidad de grasa y proteínas, mostrándose diferente estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ) frente al resto de subproductos analizados.



**Figura 4.48.** Valor energético (KJ/100 g) en el subproducto de gazpacho y en los distintos subproductos constituyentes del mismo.

#### 4.4.4. Aplicación de los subproductos del gazpacho en panificación (grisines)

##### 4.4.4.1. Análisis nutricional de los grisines

En la **Tabla 4.24** se presenta el valor energético (expresado en Kcal/100 g) de los diferentes grisines elaborados en el estudio, así como de sus contenidos de macronutrientes y sal (expresados en g/100 g de producto).

**Tabla 4.24.** Composición nutricional de los grisines elaborados en el estudio.

Tipos de grisines (envasados)	Energía (Kcal/100 g)	Fibra (g/100 g)	Proteínas (g/100 g)	Grasas (g/100 g)	Carbohidratos (g/100 g)	Sal (g/100 g)	Cenizas (g/100 g)
<b>Normal</b>	249±1,2 <sup>a</sup>	0,82±0,3 <sup>a</sup>	1,90±1,2 <sup>a</sup>	4,10±0,5 <sup>a</sup>	77,52±0,4 <sup>a</sup>	1,62±0,2 <sup>a</sup>	2,67±0,1 <sup>a</sup>
<b>Prototipo 1</b>	267±1 <sup>a</sup>	1,30±0,4 <sup>b</sup>	2,0±0,6 <sup>a</sup>	4,31±1,1 <sup>a</sup>	85,81±1,4 <sup>b</sup>	1,61±0,2 <sup>a</sup>	2,70±0,2 <sup>a</sup>
<b>Prototipo 2</b>	248±1,4 <sup>a</sup>	1,92±0,4 <sup>b</sup>	2,10±0,5 <sup>a</sup>	7,10±0,3 <sup>b</sup>	72,30±1,9 <sup>c</sup>	2,20±0,2 <sup>a</sup>	4,72±0,3 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

Hay que destacar como el contenido en cenizas de los grisines es significativamente mayor ( $p \geq 0,05$ ) en aquellos que incorporan mayor cantidad del subproductos de gazpacho en su formulación; presentando valores de cenizas de 4,72 g/100 g para los grisines prototipo 2, frente a los 2,7 g y 2,67 g/100 g para los grisines prototipo 1 y normales, respectivamente. Esto se explica por el aporte adicional de minerales que proporciona el subproducto del gazpacho, que contiene K, Na, Ca, Mg, Zn y Fe (Morales-Guzmán y col., 2017).

Con la cantidad de sal ocurre algo similar, pues se aprecian valores significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) de dicho parámetro en los grisines correspondientes con el prototipo 2 (2,2 g/100 g); no encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los valores que presentan los grisines normales y prototipo 1 (con 1,62 y 1,61 g/100 g, respectivamente).

En relación a la cantidad de grasa de los grisines se observa también un aumento del contenido de grasa por cada 100 g de producto acorde al incremento del uso de subproducto en su formulación, siendo significativamente superiores ( $p \geq 0,05$ ) los correspondientes al prototipo 2 (con valores de 7,1 g/100 g) frente a los encontrados en los normales y prototipo 1, cuyos valores fueron de 4,1 y 4,31 g/100 g, respectivamente. Este incremento en grasa se corresponde con la mayor cantidad de pieles y semillas de los vegetales contenidos en el subproducto de gazpacho (Zou, Ma y Tian, 2015; Chouaibi y col., 2019).

De igual modo ocurre para el contenido en fibra de los grisines, cuyos valores resultaron ser significativamente superiores ( $p \geq 0,05$ ) en los prototipos elaborados con subproducto de gazpacho (1,3 y 1,92 g/100 g para prototipos 1 y 2, respectivamente) en comparación con los normales, con valores de 0,82 g/100 g.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) ni en el contenido en proteínas de los grisines analizados, ni en su valor calórico.

Por último, hay que mencionar que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido en carbohidratos de los tres tipos de grisines, apreciando los mayores valores en las muestras correspondientes al prototipo 1 (85,8 g/100 g), seguida de los grisines normales (77,5 g/100 g) y los del prototipo 2 (72,3 g/100 g). Estas diferencias vienen determinadas por el diferente contenido en fibra, cenizas y grasa en cada una de las muestras.

La comparación de los valores nutricionales obtenidos de nuestras muestras, con el de otros grisines semejantes disponibles de manera habitual en el mercado, determinó que las muestras propias, tanto normales como los prototipos 1 y 2 presentan unos valores muy por debajo de los que se pueden encontrar en el etiquetado nutricional de los primeros, en cuanto a valor energético y a macronutrientes se refiere.

Así, los valores calóricos de los grisines normales, prototipo 1 y 2 (con valores de 2,49, 2,67 y 2,48 Kcal/100 g, respectivamente), fueron menores a los encontrados en los grisines con aceite de oliva marca Carrefour (con valores de 4,27 Kcal/100 g), para los de aceite de girasol Dal Cesto di Alice e Ital d'oro (que presentaron valores de 421 Kcal/100 g en los dos casos); y para aquellos grisines que muestran en su etiquetado la mención "con contenido en fibra", como los palitos de trigo con olivas y sésamo marca Grefusa (con 492 Kcal/100 g), los palitos de cereales con pipas marca Grefusa (con 505 Kcal/100 g), los artesanas activiΩ cereales y de espelta y avena, de marca Velarde, que presentaron valores de 534 y 513 Kcal/100 g, respectivamente.

En relación con el contenido en fibra, se observan también cantidades inferiores (de 0,82, 1,30 y 1,92 g/110 g en los grisines normales, prototipo 1 y 2, respectivamente) a todas las muestras del mercado analizadas; con valores de 3,9 y 4 g/100 g para los grisines con aceite de Carrefour, Dal Cesto di Alice e Ital d'oro, respectivamente, y de 6,2, 5 y 4,2 g/100 g para los palitos de olivas y sésamo, las de cereales con pipas y artesanas de cereales y de espelta y avena, respectivamente.

Los contenidos de grasa fueron ligeramente menores en los grisines del estudio (4,1, 4,31 y 7,1 g/100 g para normal, prototipo 1 y 2, respectivamente) frente a los elaborados con aceite de la marca Carrefour (7,7 g/100 g), Dal Cesto di Alice (10,6 g/100 g) e Ital d'oro (11 g/100 g). Y muy inferiores a los valores de las muestras

“con fibra” que fueron de 24, 27, 55 y 29 g de grasa/100 g para las muestras con olivas y sésamo, las de cereales y pipas, las de cereales y las de espelta y avena, respectivamente.

En este punto, hay que señalar que, la mayoría de los grisines de las diferentes marcas del mercado, utilizan en su composición el aceite de girasol, y/o el aceite de oliva, a diferencia del aceite de oliva virgen extra, utilizado para elaborar los grisines con subproducto de gazpacho; lo que puede suponer una diferencia competitiva en el mercado.

De igual modo, los contenidos de sal en los grisines normales, prototipo 1 y 2 (1,62, 1,61 y 2,2 g/100 g respectivamente) solo fueron superiores a los encontrados en los palitos con espelta y avena (con valores de 1,3 g/100 g), presentando valores o ligeramente menores o iguales al resto de los palitos: los de Carrefour (1,8 g/100 g), Dal Cesto di Alice (2,5 g/100 g), Ital d'oro (2,5 g/100 g), olivas y sésamo (3 g/100 g), cereales y pipas (2,1 g/100 g) y cereales (2 g/100 g).

En estos resultados se demuestra que la elaboración de grisines con subproductos de gazpacho en su formulación, especialmente el prototipo 2, puede ser una alternativa viable a los productos que ya existen en el mercado, al ser diferente en su composición, presentando un valor nutricional semejante a ellos.

#### 4.4.4.2. *Análisis de la textura en los grisines*

La importancia de la textura en el consumo de un producto alimentario varía dependiendo del tipo de alimento que vaya a ser consumido. Mientras que, para algunos podría ser crítica, mientras que para otros solo representa una simple sensación. Pero hay alimentos donde la textura es el criterio de calidad más importante, como en los aperitivos crujientes, bollería horneada, etc (Hleap-Zapata, González-Ochoa y Mora-Bonilla, 2017).

El equipo de análisis del perfil de textura (TPA) simula la masticación de una muestra de alimento por medio de un analizador de la textura; comprimiendo una muestra del tamaño de un mordisco, usando un dispositivo de doble acción ajustable al alimento para imitar la acción del diente.

Una de las características que engloba el concepto de textura es la fracturabilidad, que queda definida como “la primera caída significativa de la curva durante el primer ciclo de compresión de un producto de un alto grado de dureza

y bajo grado de cohesividad”, es decir, es la dureza con la cual el alimento se desmorona, cruje o revienta; y que queda expresada en unidades de fuerza (Newtons) (Zandonadi y col., 2012; O’Shea, Arendt y Gallagher, 2014; Morales-Guzmán y col., 2017).

Además, la AACC (Asociación Americana de químicos de cereales) desarrollo un método standard para evaluar las muestras de pan por deformación, estimando que la fuerza para comprimir una determinada muestra simula los apretones suaves que realiza el consumidor.

En la **Tabla 4.25** se muestran los valores de textura obtenidos para las distintas muestras de grisines elaborados; valores expresados en Newton para la dureza, y en milímetros para la deformación según dureza.

**Tabla 4.25.** *Análisis de la textura para los grisines del estudio.*

<b>Tipos de grisines</b>	<b>Dureza (N)</b>	<b>Dureza por deformación (mm)</b>
<b>Normal</b>	11,18±1,10 <sup>a</sup>	0,77±0,27 <sup>a</sup>
<b>Prototipo 1</b>	3,97±0,07 <sup>b</sup>	1,25±0,21 <sup>b</sup>
<b>Prototipo 2</b>	4,11±0,28 <sup>b</sup>	24,41±0,42 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup>Los valores de la tabla son la media de 3 repeticiones. Los datos que aparecen con las mismas letras no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) para el tratamiento evaluado (Test Tukey).

Tal y como se puede observar los valores de dureza fueron superiores en los grisines normales (11,18 N), seguidos de los prototipos 1 y 2, que mostraron valores de 3,97 y 4,12 N, respectivamente. Por otra parte, se observó un aumento significativo en los valores de deformación por dureza entre las muestras, alcanzando los mayores valores en los grisines de los prototipos 2, con 24,41 mm frente a los 0,77 y 1,25 mm, para los grisines normales y prototipo 1, respectivamente.

Estos resultados determinan unos gráficos de fracturabilidad que para los grisines normales presentaban un punto de pico muy definido, y sin apenas deformación por dureza, correspondiente a los alimentos crujientes. Mientras que, por el contrario, mostraban menores valores de dureza, siendo significativamente

superiores para la deformación por dureza en las muestras de los prototipos 2, determinando unos gráficos cuyo avance es más estable, en representación de un alimento menos crujiente o más blando; que necesitará más tiempo para poder romperlo, en vez de los crujientes, que necesitaría poca fuerza de ruptura.

#### 4.4.4.3. Análisis microbiológico de los grisines

En la **Tabla 4.26** se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos realizados en los grisines elaborados en el estudio.

**Tabla 4.26.** Recuento microbiológico de los grisines elaborados en el estudio.

<b>Tipos de grisines</b>	Mohos y levaduras (Log UFC/g)	Coliformes y <i>E. coli</i> (Log UFC/g)	<i>Salmonella spp.</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> (+/-)
<b>Normal</b>	<LD	<LD	-
<b>Prototipo 1</b>	<LD	<LD	-
<b>Prototipo 2</b>	<LD	<LD	-

<L.D.: menor de 0,1 Log UFC/g.

+/-: presencia/ausencia en 25 g.

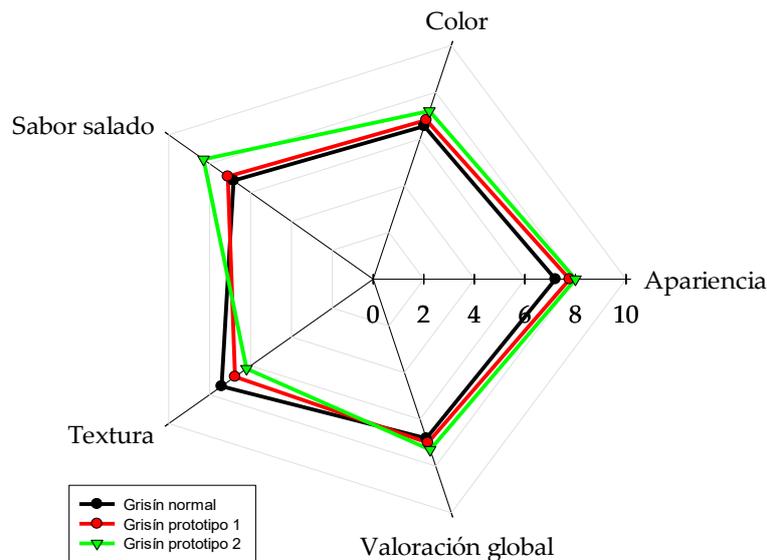
Tal y como se puede observar, no se aprecia crecimiento de ninguna bacteria patógena estudiada, ni tampoco de mohos y levaduras, en los grisines elaborados en el estudio.

Esto se debe a que el tratamiento de horneado al que fueron sometidos los grisines (TT 180 °C durante 30 min) fue lo suficientemente letal como para impedir la supervivencia de estos microorganismos (Lee y Kaletunç, 2002; Kim y col., 2012). Por este motivo los resultados se encuentran dentro los límites requeridos por el Reglamento (UE) nº 2019/229 de la Comisión, de 7 de febrero de 2019, convirtiéndose en aptos y seguros para su consumo y comercialización.

#### 4.4.4.4. Análisis sensorial de los grisines

Un aspecto importante en el control de calidad de los alimentos es el del análisis de sus propiedades sensoriales: la apariencia, el aroma, el sabor y la textura

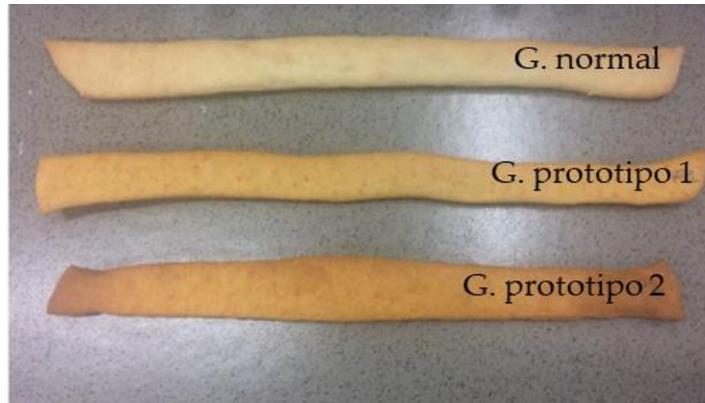
(Capriles y Arêas, 2014). En la **Figura 4.49** se representan los perfiles sensoriales de los grisines elaborados en el estudio. Estos perfiles reflejan en un diagrama de araña, los valores de las puntuaciones medias otorgadas por los componentes del panel de cata para los atributos sensoriales establecidos.



**Figura 4.49.** Análisis sensorial para los atributos estudiados en los grisines elaborados en el estudio.

Respecto al sabor salado, las puntuaciones de menor a mayor corresponden al grisín normal, prototipo 1 y prototipo 2. La apreciación del sabor salado por parte de los panelistas expertos se corresponde al mayor aporte de subproducto de gazpacho, por ello, fue el grisín prototipo 2 el que presentó el mayor sabor salado. En relación con la textura, se aprecia que los grisines normales son los más crujientes, seguidos de los grisines prototipo 1 y 2. Esto se puede deber a que los grisines con subproducto de gazpacho presentaron mayor contenido en fibra determinando menos pérdida por evaporación y retención de agua (Valencia y Román, 2006).

La valoración del color fue menor en los grisines normales, frente a los grisines prototipo 1 y 2, que presentaron un color rojizo-anaranjado más intenso (**Figura 4.50**) aportado por el subproducto de gazpacho; incluso con la presencia de partículas sólidas fueron más atractivos que los grisines normales.



**Figura 4.50.** *Imagen de los diferentes grisines elaborados en el estudio.*

Con respecto a la apariencia general, las muestras mejor valoradas fueron las correspondientes con el prototipo 2; ya que esta apariencia se encuentra condicionada principalmente por el color de las mismas, y son los grisines prototipo 2 los que más color presentaron al incorporar mayor cantidad de subproducto de gazpacho.

## **V - CONCLUSIONES**



## V - CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados en la Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. POD de tomate fue caracterizada cinéticamente, obteniéndose valores de  $K_M$ ,  $V_m$  y  $K_{si}$  para  $H_2O_2$  de 477,26 mM, 721,53  $\mu M/min$  y 0,37 mM, respectivamente; y valores de  $K_M$  y  $V_m$  para ABTS<sup>•+</sup> de 0,65 mM y 3,85  $\mu M/min$ , respectivamente. Del mismo modo, en PME de tomate, los valores de  $K_M$  y  $V_m$  obtenidos para la pectina cítrica fueron de 0,54 mM y 436,12  $\mu M/min$ , respectivamente. En PG de tomate, los valores de  $K_M$  y  $V_m$  obtenidos para el ácido galacturónico fueron de 0,036 mM y 544,84  $\mu M/min$ , respectivamente.

Queda demostrado que POD de tomate fue inactivada con 90 °C durante 5 min; a pH de 2,5 a 3,5 con temperaturas de 55 a 90 °C durante 5 min; y a pH de 2,5 a 3 con temperaturas de 40 a 90 °C durante 5 min. De igual modo, PME de tomate fue inactivada a 90 °C durante 5 min, y a pH 3,5 con 70 °C durante 5 min. En el caso de los tratamientos combinados con HPP, POD de tomate fue inhibida más eficazmente conforme se redujo el pH, aumentó la temperatura, la presión y el número en ciclos de presión, resultando inactivada a temperaturas  $\geq 65$  °C con HPP 600 MPa durante 3 ciclos (3 min/ciclo), y a pH  $\leq 4$  con HPP  $\geq 400$  MPa durante 3 ciclos (3 min/ciclo).

2. En puré de tomate todos los tratamientos del estudio resultaron eficaces para inhibir la actividad enzimática de las tres principales enzimas alterantes (POD, PME y PG); comprobándose que estas tres enzimas son más termorresistentes que barorresistentes. El TT 90 °C fue el que mejores resultados obtuvo inhibiendo la actividad enzimática de estas tres enzimas. No obstante, se seleccionó el TT 60 °C + HPP 600 MPa como el mejor tratamiento del estudio, puesto que fue el que mejores resultados proporcionó a nivel microbiológico y sensorial, consiguiendo alargar satisfactoriamente hasta dos meses la vida útil comercial del puré de tomate. Por estos motivos, los TT 90 °C y TT 60 °C + HPP 600 MPa fueron escogidos para seguir evaluándolos en el estudio de vida útil de gazpacho.

En gazpacho el tratamiento que mejores resultados obtuvo inhibiendo la actividad POD fue el TT 90 °C. A pesar de ello, se volvió a escoger el TT 60 °C + HPP 600 MPa como el mejor tratamiento del estudio, puesto que proporcionó los mejores resultados a nivel microbiológico y sensorial, consiguiendo alargar de nuevo hasta dos meses la vida útil comercial del gazpacho.

3. La caracterización analítica de los subproductos mostró un pH muy similar a las frutas y verduras de los que provienen, un contenido en vitamina C ligeramente inferior, y una cantidad de grasas, proteínas, carbohidratos y fibra adecuada para su incorporación en productos de panadería/pastelería. Se elaboraron 2 tipos de grisines incorporando en la receta diferentes cantidades de subproductos de gazpacho, y utilizando AOVE como fuente de grasa.

Todos los grisines elaborados con subproductos de gazpacho presentaron valores nutricionales diferentes al resto de grisines comerciales, presentado sin embargo, menor cantidad de grasa y sal.

Los grisines que incorporaron mayor cantidad de subproductos de gazpacho obtuvieron las mejores valoraciones tanto nutricionales como sensoriales (en la textura y en el panel de cata).

## **VI - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## VI – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abid, Y., Azabou, S., Jridi, M., Khemakhem, I., Bouaziz, M., Attia, H. (2017).** Storage stability of traditional tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Food Chem.*, 233, 476-482.

**Achir, N., Dhuique-Mayer, C., Hadjal, T., Madani, K., Pain, J.P., Dornier, M. (2016).** Pasteurization of citrus juices with ohmic heating to preserve the carotenoid profile. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 397–404.

**Aganovic, K., Smetana, S., Grauwet, T., Toepfl, S., Mathys, A., Van Loey, A., Heinz, V. (2017).** Pilot scale thermal and alternative pasteurization of tomato and watermelon juice: an energy comparison and life cycle assessment. *Journal of Cleaner Production*, 141, 514–525.

**Ahmed, S.T., Islam, M.M., Bostami, R.A.B.M., Mun, H.S., Kim, Y.J., Yang, C.J. (2015).** Meat composition, fatty acid profile and oxidative stability of meat from broilers supplemented with pomegranate (*Punica granatum L.*) by-products. *Food Chem.*, 188, 481-488.

**Al-Baali, G., Abdul, A.G., Farid, M.M. (2006).** Sterilization of food in retort pouches. Springer Science + Business Media, LLC. New York, EEUU.

**Al-Bagmi, M.S., Khan, M.S., Ismael, M.A., Al-Senaidy, A.M., Bacha, A.B., Husain, F.M., Alamery, S.F. (2018).** An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 301-307.

**Alba, M., Pérez-Andrés, J.M., Harrison, S.M., Brunton, N.P., Burgess, C.M., Tiwari, B.K. (2019).** High pressure processing on microbial inactivation, quality parameters and nutritional quality indices of mackerel fillets. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 55, 80-87.

**Al-Jammaas, O.H., Sultan, S.H., Mahmood, W.A. (2019).** “Characterization of pectin methylesterase from *Aspergillus niger*.” *Tikrit Journal for Agricultural Sciences*, 19, 66-74.

**Alpas, H., Alma, L., Bozoğlu, F., (2003).** Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 619-623.

**Andrés, V.,** Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Villanueva, M.J., Tenorio, M.D. (2016). High hydrostatic pressure treatment and storage of soy smoothies: colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. *Food Science and Technology*, 69, 123–130.

**Anese, M.,** Nicoli, M.C., Dall'Aglio, G., Lerici, C.R. (1995). Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Food Biochemistry*, 18, 285-293.

**Anthon, G.E.,** Sekine, Y., Watanabe, N., Diane, M. Barrett. (2002). Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6153-6159.

**Asavasanti, S.,** Ersus, S., Ristenpart, W., Stroeve, P., Barrett, D.M. (2010). Critical electric field strengths of onion tissues treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 75, 433-443.

**Bahçeci, S.K.,** Serpen, A., Gökmen, V., Akar, J. (2005). Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *J. Food Eng.* 66, 187–192.

**Balasubramaniam, V.M.,** & Farkas, D. (2008). High pressure food processing. *Food Science and Technology International*, 14, 413-418.

**Balasubramaniam, V.M.,** Ting, E.Y., Stewart, C.M., Robbins, J.A. (2007). Recommended laboratory practices for conducting high pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 299-306.

**Balny, C.,** & Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Rev. Intl.* 9, 611–28.

**Bansal, V.,** Jabeen, K., Rao, P.S., Prasad, P., Yadav, S.K. (2018). Effect of high pressure processing (HPP) on microbial safety, physicochemical properties, and bioactive compounds of whey based sweet lime (whey lime) beverage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 454–465.

**Barba, F.J.,** Esteve, M.J., Frigola, A. (2010). Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10070-10075.

**Barba, F.J.,** Esteve, M.J., Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50, 545-549.

**Barba**, F.J., Jäger, H., Meneses, N., Esteve, M.J., Frígola, A., Knorr, D. (2012). Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high pressure and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 18-24.

**Barbosa-Cánovas**, G.V., & Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos nonthermal processing of food. *Scientia Agropecuaria*, 1, 81-93.

**Barrett**, D.M., Beaulieu, J.C., Shewfelt, R. (2010). Color, flavor, texture, and nutritional quality of fresh cut fruits and vegetables: desirable levels, instrumental and sensory measurement, and the effects of processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 369–389.

**Basak**, S., Ramaswamy, H.S., Simpson, B.K. (2001). High pressure inactivation of pectin methylesterase in orange juice using combination treatments. *J. Food Biochem.*, 25, 509–526.

**Bayindirli**, A., Alpas, H., Bozoğlu, F., Hizal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganism and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17, 52-58.

**Belloir**, C., Singh, V., Daurat, C., Siess, M.H., Le Bon, A.M. (2006). Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct and indirect acting genotoxic agents in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 827–834.

**Beltrán**, E., Pla, R., Yuste, J., Mor-Mur, M. (2003). Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64, 19-25.

**Berenhauser**, A.C., Soares, D., Komora, N., De Dea Lindner, J., Schwinden Prudêncio, E., Oliveira, J.V., Block, J.M. (2017). Effect of high pressure carbon dioxide processing on the inactivation of aerobic mesophilic bacteria and *Escherichia coli* in human milk. *Journal of Food*, 16, 122–126.

**Bigliardi**, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends Food. Sci. Technol.*, 31, 118-129.

**Błaszczak**, W., Amarowicz, R., Górecki, A. R. (2017). Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 141–147.

**Bou, R., Llauger, M., Joosse, R., García-Regueiro, J.A.** (2019). Effect of high hydrostatic pressure on the oxidation of washed muscle with added chicken hemoglobin. *Food Chemistry*, 292, 227–236.

**Briones-Labarca, V., Pérez-Won, M., Zamarca, M., Aguilera-Radic, J.M., Tabilo-Munizaga, G.** (2012). Effects of high hydrostatic pressure on microstructure, texture, colour and biochemical changes of red abalone (*Haliotis rufecens*) during cold storage time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 42–50.

**Briones-Labarca, V., Pérez-Won, M., Zamarca, M., Aguilera-Radic, J.M., Tabilo-Munizaga, G.** (2012). Effects of high hydrostatic pressure on microstructure, texture, colour and biochemical changes of red abalone (*Haliotis rufecens*) during cold storage time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 42–50.

**Brutti, A., Rovere, P., Cavallero, S., D'Amelio, S., Danesi, P., Arcangeli, G.** (2010). Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*, 21, 331–333.

**Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., Sellahewa, J., Szabo, E.A., Johnson, R.L., Stewart, C.M.** (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 135-149.

**Butz, P., Fernández-García, A., Lindauer, R., Dieterich, S., Bognár, A., Tauscher, B.** (2003). Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering*, 56, 233-236.

**Cabanes, J., Escribano, J., Gandía-herrero, F., García-Carmona, F., Jiménez-Atiénzar, M.** (2007). Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. c.v. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane bound forms. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10446–10451.

**Cano, M.P., Hernández, A., Ancos, B.** (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, 62, 85–88.

**Cao, X., Bi, X., Huamg, W., Wu, J., Hu, X., Liao, X.** (2012). Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 181-190.

**Capriles, V.D., & Arêas, J.A.G.** (2014). Novel approaches in gluten free breadmaking: interface between food science, nutrition, and health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 871–890.

**Cardona-Gálvez, M., Díaz-Lorenzo, T., Morejón-Martí, P.** (2008). Temas de higiene de los alimentos. Editorial Ciencias Médicas. Capítulo 17, pp. 249-264. La Habana. Cuba.

**Carreño, J.M., Gurrea, M.C., Sampedro, F., Carbonell, J.V.** (2010). Effect of high hydrostatic pressure and high pressure homogenisation on *Lactobacillus plantarum* inactivation kinetics and quality parameters of mandarin juice. *European Food Research and Technology*, 232, 265–274.

**Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Carpi, G., Galassi, S.** (2000). Effects of high hydrostatic pressure processing and of glucosa catalase addition on the color stability and sensorial score of grape juice. *Food Science Technology International*, 6, 17-23.

**Chai, C., Lee, J., Lee, Y., Na, S., Park, J.** (2014). A combination of TiO<sub>2</sub>-UV photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate *Bacillus cereus* in freshly squeezed *Angelica keiskei* juice. *Food Sci. Technol.*, 55, 104–109.

**Chakraborty, S., Kaishik, N., Srinivasa, P., Misrha, H.N.** (2014). High pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 578-596.

**Chakraborty, S., Rao, P.S., Mishra, H.N.** (2015). Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high pressure and thermal treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 57–68.

**Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., Basak, T.** (2013). Microwave food processing: a review. *Food Research International*, 52, 243-261.

**Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C.** (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colourimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.

**Chang, Y.H., Wu, S.J., Chen, B.Y., Huang, H.W., Wang, C.Y.** (2017). Effect of high pressure processing and thermal pasteurization on overall quality parameters of white grape juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3166–3172.

**Cheftel, J.C.** (1992). Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. *High Pressure and Biotechnology*, C., Balny, R., Hayashi, K., Heremans, P. Masson (ed), pp. 195-209. Editions John Libbey Eurotext, Montrouge.

**Cheftel, J.C.** (1995). Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology international*, 1, 75-90.

**Cheftel, J.C., & Culioli, J.** (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46, 211-236.

**Chien, S.Y., Sheen, S., Sommers, C., Sheen, L.Y.** (2018). Combination effect of high pressure processing and essential oil (*Melissa officinalis* Extracts) or their constituents for the inactivation of *Escherichia coli* in ground beef. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 359-370.

**Choi, S., Park, S., Kim, Y., Kim, B.S., Beuchat, L.R., Hoikyung, K., Ryu, J.H.** (2015). Reduction of *Salmonella enterica* on the surface of eggshells by sequential treatment with aqueous chlorine dioxide and drying. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 84–87.

**Chouaibi, M., Rezig, L., Hamdi, S., Ferrari, G.** (2019). Chemical characteristics and compositions of red pepper seed oils extracted by different methods. *Industrial Crops and Products*, 128, 363–370.

**Chung, J.W., Kim, S.D., Bernhardt, R., Pyun, J.C.** (2005). Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (hHBV). *Sens. Actuators*, 111, 416–422.

**Chutia, H., Kalita, D., Mahanta, C.L., Ojah, N., Choudhury, A.J.** (2019). Kinetics of inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in tender coconut water by dielectric barrier discharge plasma. *Food Science and Technology*, 101, 625-629.

**Contador, R., González-Cebrino, F., García-Parra, J., Lozano, M., Ramírez, R.** (2014). Effects of hydrostatic high pressure and thermal treatments on two types of pumpkin puree and changes during refrigerated storage. *Journal of food processing and preservation*, 38, 704-712.

**Crawford, Y.J., Murano, E.A., Olson, D.G. Shenoy, K.** (1996). Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 59, 711-715.

**Crelier, S., Robert, M.C., Claude, J., Juillerat, M.A.** (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat and pressure induced inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5566–5575.

**Crelier, S., Robert, M.C., Juillerat, M.A.** (1999). Effect of high pressure treatment on the texture and enzyme activities of selected vegetables. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, pp. 413–416. Berlin: Springer-Verlag.

**D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., Bellincampi, D.** (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase inhibiting proteins and pectic oligomers in plant pathogen interactions. *Proteins and Proteomics*, 1696, 237–244.

**Daher, D., Le Gourrierec, S., Pérez-Lamela, C.** (2017). Effect of high pressure processing on the microbial inactivation in fruit preparations and other vegetable based beverages. *Agriculture*, 7, 72.

**Dahili, L.A., Kelemen-Horváth, I., Feczko, T.** (2015). 2,4-Dichlorophenol removal by purified horseradish peroxidase enzyme and crude extract from horseradish immobilized to nano spray dried ethyl cellulose particles. *Process Biochemistry*, 50, 1835–1842.

**Darvishi, H., Khostaghaza, M.H., Najafi, G.** (2013). Ohmic heating of pomegranate juice: electrical conductivity and pH change. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12, 101–108.

**de Jesús, A.L.T., Leite, T.S., Cristianini, M.** (2018). High isostatic pressure and thermal processing of açai fruit (*Euterpe oleracea* Martius): effect on pulp color and inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase. *Food Research International*, 105, 853–862.

**De Lamo-Castellví, S., Roig-Sagués, A.X., Capellas, M., Hernández-Herrero, M., Guamis, B.** (2005). Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 337–342.

**Denès, J.M., Baron, A., Drilleau, J.F.** (2000). Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (c.v. Golden Delicious). *Science of food and agriculture*, 80, 1503–1509.

**Deshaware, S., Gupta, S., Singhal, R., Variyar, P.S.** (2019). Influence of different pasteurization techniques on antidiabetic, antioxidant and sensory quality of debittered bitter melon juice during storage. *Food Chemistry*, 285, 156–162.

**Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004).** New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.

**Díaz-Cruz, C.A., Regalado-González, C., Morales-Sánchez, E., Velázquez, G., González-Jasso, E., Amaya-Llano, S.L. (2016).** Thermal inactivation kinetics of partially purified mango pectin methylesterase. *Food Sci. Technol.*, 36, 282-285.

**Dikasso, D., Lemma, H., Urga, K., Debella, A., Addis, G., Tadele, A., Yirsaw, K. (2002).** Investigation on the antibacterial properties of garlic (*Allium sativum*) on pneumonia causing bacteria. *Ethiop Med. J.*, 40, 241-249.

**Dillon, S.A., Burmi, R.S., Lowe, G.M., Billington, D., Rahman, K. (2003).** Antioxidant properties of aged garlic extract: an *in vitro* study incorporating human low density lipoprotein. *Life Sciences*, 72, 1583-1594.

**dos Santos, C.T., Gomes, P.D.P., Bonomo, F.R.C., Franco, M. (2012).** Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chem.*, 133, 1299-1304.

**Duvetter, T., Sila, D.N., Van Buggenhout, S., Jolie, R., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2009).** Pectins in processed fruit and vegetables: part I stability and catalytic activity of pectinases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 8, 75-85.

**Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Woedtke, V., Brandenburg, R., von dem Hagen, T., Weltmann, K.D. (2011).** Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44, 13002.

**Eisenmenger, M.J., & Reyes-De-Corcuera, J.I. (2009).** High pressure enhancement of enzymes: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 331-347.

**Esteve, M.J., & Frígola, A. (2007).** Refrigerated fruit juices: quality and safety issues. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 103-139.

**Etzbach, L., Pfeiffer, A., Schieber, A., Weber, F. (2018).** Effects of thermal pasteurization and ultrasound treatment on the peroxidase activity, carotenoid composition, and physicochemical properties of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) puree. *Food Science and Biotechnology*, 100, 69-74.

**Evelyn, Filipa, Silva, V.M. (2019).** Heat assisted HPP for the inactivation of bacteria, moulds and yeasts spores in foods: log reductions and mathematical models. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 143-156.

**Fachin, D.,** Van Loey, A., Indrawati, L., Ludikhuyze, L., Hendrickx, M. (2002). Thermal and high pressure inactivation of tomato polygalacturonase: a kinetic study. *J. Food Sci*, 67, 1610–5.

**Fachin, D.,** Van Loey, A.M., Nguyen, B.L., Verlent, I., Indrawati, Hendrickx, M.E. (2003). Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4, 135–142.

**Fernández-García, A.,** Butz, P., Bognér, A., Tauscher, B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange lemon carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213, 290-296.

**Fortea, M.I.,** López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Carreño, J., Núñez-Delicado, E. (2009). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson Seedless*). *Food Chemistry*, 113, 1008–1014.

**Fortea, M.I.,** López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Zafrilla, M.P., Martínez-Cachá, A., Núñez-Delicado, E. (2011). Kinetic characterization and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. *Food Chem.*, 127, 1091–1096.

**Fortea, M.I.,** Pellicer, J.A., Serrano-Martínez, A., López-Miranda, S., Lucas-Abellán, C., Núñez-Delicado, E. (2012). Red Cabbage (*Brassica oleracea*) as a new source of high thermostable peroxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 10641–10648.

**Franck, M.,** Perreault, V., Suwal, S., Marciniak, A., Bazinet, L., Doyen, A. (2019). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant activity. *Food Research International*, 115, 467-473.

**Frankel, E.,** Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of by-products as alternative sources of polyphenols. *J. Agric Food Chem.*, 61, 5179-5188.

**Fu, Y.C.** (2004). Fundamentals and industrial applications of microwave and radio frequency in food processing. En: Food processing: Principles and applications. J. S. Smith, & Y. H. Hui (Eds.). Blackwell, Iowa, EEUU.

**Funtenberger, S.,** Dumay, E., Cheftel, J.C. (1995). Pressure aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin isolate in different pH 7 buffers. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 410-418.

**Gabriel, A.A., & Nakano, H.** (2009). "Inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in phosphate buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments." *Food Control*, 20, 443-446.

**Gaenzle, M.G., & Vogel, R.F.** (2001). On line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. *Systematic Applied Microbiology*, 24, 477-485.

**Galanakis, C.M.** (2013). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: a view point of opportunities and challenges. *Food Bioprod. Process*, 91, 575-579.

**Ganessingh, V., Sahibdeen, R., Maharaj, R.** (2018). An evaluation of the impact of novel processing technologies on the phytochemical composition of fruits and vegetables. *Phytochemicals Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention*, 12, 189-208.

**García, R., & Herrera, F.** (2007). Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 5, 68-79.

**García-Palazón, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P., Zabetakis, I.** (2004). The effects of high hydrostatic pressure on  $\beta$ -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria ananassa*). *Food Chemistry*, 88, 7-10.

**Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M., Camardella, L.** (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim Biophys Acta Proteins and Proteomics*, 1696, 245-252.

**Góngora-Nieto, M.M., Sepulveda, D., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G., Swanson, B.** (2002). Food processing by pulsed electric fields: treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel Wissenschaft und technologie*, 35, 375-388.

**Goodner, J.K., Bräddok, R.J., Parish, M.E. Sims, C.A.** (1999). Cloud stabilization of orange juice by high pressure processing. *Journal of Food Science*, 64, 699-700.

**Górnaś, P.** (2015). Unique variability of tocopherol composition in various seed oils recovered from by-products of apple industry: rapid and simple determination of all four homologues ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) by RP-HPLC/FLD. *Food Chem.*, 172, 129-134.

**Gouma, M., Gayán, E., Raso, J., Condón, S., Álvarez, I.** (2015). Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UVC light and in combination with mild heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 146-155.

**Gross, K.C.** (1982). *Hortic. Sci.*, 17, 933-934.

**Hagerman, A.E., & Austin, P.J.** (1986). Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 440-444.

**Hartyáni, P., Dalmadi, I., Knorr, D.** (2013). Electronic nose investigation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculated apple and orange juice treated by high hydrostatic pressure. *Food Control*, 32, 262-269.

**He, R., He, H.Y., Chao, D., Ju, X., Aluko, R.** (2013). Effects of high pressure and heat treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein isolate. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1344-1353.

**Hiner, A.N.P., Hernández-Ruiz, J., Arnao, M.B., García-Cánovas, F., Acosta, M.** (1996). A comparative study of the purity, enzyme activity and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 655-662.

**Hleap-Zapata, J.I., González-Ochoa, J.M., Mora-Bonilla, M.F.** (2017). A sensory evaluation of red tilapia (*Oreochromis spp.*) sausages to which earthworm (*Eisenia foetida*) flour has been added. *Orinoquia*, 21, 15-25.

**Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F., Knorr, D.** (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43, 99-107.

**Houska, M., Strohalm, J., Kocurova, K., Totusek, J., Lefnerova, D., Tiska, J., Vrchotova, N., Fiedlerova, V., Holasova, M., Gabrovska, D., Paulickova, I.** (2006). High pressure and foods fruit/vegetable juices. *Journal of Food Engineering*, 77, 386-398.

**Hsu, K., Tan, F., Chi, H.** (2008). Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of pressurised tomato juice during refrigerated storage. *Food Science and Technology*, 41, 367-375.

**Huang, H.W., Lung, H.M., Yang, B.B., Wang, C.Y.** (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40, 250–259.

**Huppertz, T., Vasiljevic, T., Zisu, B., Deeth, H.** (2019). Novel processing technologies. *Whey Proteins*, 1, 281–334.

**Hurtado, A., Guàrdia, M.D., Picouet, P., Jofré, A., Ros, J.M., Bañón, S.** (2017). Stabilization of red fruit based smoothies by high pressure processing. Part A. Effects on microbial growth, enzyme activity, antioxidant capacity and physical stability. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 770–776.

**Hurtado, A., Picouet, P., Jofré, A., Guàrdia, M.D., Ros, J.M., Bañón, S.** (2015). Application of high pressure processing for obtaining “fresh-like” fruit smoothies. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 2470-2482.

**Illera, A.E., Sanz, M.T., Trigueros, E., Beltrán, S., Melgosa, R.** (2018). Effect of high pressure carbon dioxide on tomato juice: inactivation kinetics of pectin methylesterase and polygalacturonase and determination of other quality parameters. *Journal of Food Engineering*, 239, 64–71.

**Jafari, S.M., Ghanbari, V., Dehnad, D., Ganje, M.** (2017). Neural networks modeling of *Aspergillus flavus* growth in tomato paste containing microencapsulated olive leaf extract. *Journal of Food Safety*, 38, e12396.

**Jayachandran, L.E., Chakraborty, S., Rao, P.S.** (2015). Effect of high pressure processing on physicochemical properties and bioactive compounds in litchi based mixed fruit beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 1–9.

**Jayathunge, K.G.L.R., Grant, I.R., Linton, M., Patterson, M.F., Koidis, A.** (2015). Impact of long term storage at ambient temperatures on the total quality and stability of high pressure processed tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 1–8.

**Jayathunge, K.G.L.R., Stratakos, A.C., Delgado Pando, G., Koidis, A.** (2019). Thermal and non thermal processing technologies on intrinsic and extrinsic quality factors of tomato products: a review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, e13901.

**Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E.** (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research*, 345, 2583-2595.

**Juárez-Enríquez, E., Salmerón-Ochoa, I., Gutiérrez-Méndez, N., Ramaswamy, H. S., Ortega-Rivas, E.** (2015). Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultra high hydrostatic pressure. *Food Science and Technology*, 62, 915-919.

**Juárez-Segovia, K.G., Díaz-Darcía, E.J., Méndez-López, M.D., Pina-Canseco, M.S., Pérez-Santiago, A.D., Sánchez-Medina, M.A.** (2019). Efecto de extractos crudos de ajo (*Allium sativum*) sobre el desarrollo *in vitro* de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. *Polibotánica*, 47, 99-111.

**Jurado-Penagos, A., & García-Perdomo, H.A.** (2015). Efectividad de los micronutrientes en la prevención del cáncer de próstata. *Revista de la Facultad de Medicina*, 62, 65-72.

**Kadkhodae, R., & Povey, M.J.W.** (2008). Ultrasonic inactivation of *Bacillus*  $\alpha$ -amylase. I. effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 133-142.

**Kalamaki, M.S., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S.** (2006). Pectic enzymes in tomatoes. *Food Biochemistry and Food Processing*, 12, 271-290.

**Kalchayanand, N., Frethem, C., Dunne, P., Sikes, A., Ray, B.** (2002). Hydrostatic pressure and bacteriocin triggered cell wall lysis of *Leuconostoc mesenteroides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 33-40.

**Kalt, W.** (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70, 11-19.

**Kangur, L., Timpmann, K., Zeller, D., Masson, P., Peters, J., Freiberg, A.** (2019). Structural stability of human butyrylcholinesterase under high hydrostatic pressure. *Proteins and Proteomics*, 1867, 107-113.

**Kayalvizhi, V., & Antony, U.** (2014). Microbial and physico chemical changes in tomato juice subjected to pulsed electric field treatment. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 3382-3391.

**Keenan, D.F., Brunton, N.P., Gormley, T.R., Butler, F.** (2011). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 601-607.

**Keenan**, D.F., Brunton, N.P., Gormley, T.R., Butler, F., Tiwari, B.K., Patras, A. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 551-556.

**Keenan**, D.F., Rößle, C., Gormley, T.R., Butler, F., Brunton, N.P. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothie. *Food Science and Technology*, 45, 50-57.

**Keener**, K.M. (2008). Atmospheric non equilibrium plasma. *Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering*, 1, 1-5.

**Kidron**, M., Harel, M., Mayer, A.M. (1978). Catechol oxidase activity in grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 219, 30-35.

**Kieling**, D.D., Barbosa-Cánovas, G.V., Prudencio, S.H. (2018). Effects of high pressure processing on the physicochemical and microbiological parameters, bioactive compounds, and antioxidant activity of a lemongrass lime mixed beverage. *J. Food Sci. Technol.*, 56, 409-419.

**Kim**, J., Diao, J., Shepherd, M.W., Singh, R., Heringa, S.D., Gong, C., Jiang, X. (2012). Validating thermal inactivation of *Salmonella* spp. in fresh and aged chicken litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1302-1307.

**Knirsch**, M.C., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira Soares Vicente, A.A., Vessoni Penna, T.C. (2010). Ohmic heating: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 436-441.

**Kovačević**, B.D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Jambrak, R.A., Herceg, Z. (2016). Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chemistry*, 190, 317-323.

**Kumar**, M., & Berwal, J.S. (1998). Sensitivity of food pathogens to garlic (*Alium sativum*). *J. Appl. Microbiol.*, 84, 213-215.

**Kumar**, S., Khadka, M., Mishra, R., Kohli, D., Upadhaya, S. (2017). Effects of conventional and microwave heating pasteurization on physiochemical properties of pomelo (*Citrus maxima*) juice. *Journal of Food Processing & Technology*, 8, 7.

**Lado**, B.H., & Yousef, A.E. (2002). Alternative food preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433-440.

**Landl, A.,** Abadias, M., Sárraga, C., Viñas, I., Picouet, P.A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified granny smith apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 557-564.

**Lavelli, V.,** Sri-Harsha, P.S.C., Torri, L., Zeppa, G. (2014). Use of winemaking byproducts as an ingredient for tomato puree: the effect of particle size on product quality. *Food Chem.*, 152, 162-168.

**Lee, J., & Kaletunc, G.** (2002). Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5379–5386.

**Lee, N.Y., & Koo, J.G.** (2019). Effects of high hydrostatic pressure on quality changes of blends with low protein wheat and oat flour and derivative foods. *Food Chemistry*, 271, 685–690.

**Li, R.,** Wang, Y., Wang, S., Liao, X. (2015). A comparative study of changes in microbiological quality and physicochemical properties of N<sub>2</sub> infused and N<sub>2</sub> degassed banana smoothies after high pressure processing. *Food Bioprocess Technol.*, 8, 333–342.

**Liavoga, A., & Matella, N.J.** (2012). Enzymes in quality and processing of tropical and subtropical fruits. In: Siddiq M, editor. Wiley Blackwell. pp. 35–51. Tropical and subtropical fruits: postharvest physiology, processing and packaging. Oxford, UK.

**Litoriya, N.S.,** Gandhi, K., Talati, J.G. (2014). Nutritional composition of different chilli (*Capsicum annuum L.*) varieties. *Indian J. Agric. Biochem.*, 27, 91-92.

**Liu, F.,** Wang, Y., Li, R., Bi, X., Liao, X. (2014). Effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on antioxidant activity, antioxidant compounds and color of mango nectars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 35-43.

**López-Alarcón, C., & Denicola, A.** (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical cellular based assays. *Anal. Chim. Acta.*, 763, 1-10.

**López-Malo, A.,** Palou, E., Jiménez-Fernández, M., Alzamora, S. M., Guerrero, S. (2005). Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering*, 67, 87-93.

**Lorente, J., Valero, M., de Ancos, B., Martí, N., García, S.** (2011). Aspectos industriales. En: El Libro del zumo. ASOZUMOS, Asociación Española de Fabricantes de Zumos. ISBN: 978-84-92928-11-8.

**Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M.T., Zafrilla, P.M., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delicado, E.** (2008). Orac fluorescein assay to determine the oxygen radical absorbance capacity of resveratrol complexed in cyclodextrins. *J. Agric. Food. Chem.*, 56, 2254-2259.

**Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Denys, I.S., Hendrickx, M.E.** (2001). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. In: ultra high pressure treatments of foods. pp. 115–66. New York, EEUU: Springer.

**Ly-Nguyen, B., Van Loey, A.M., Fachin, D., Verlent, I., & Hendrickx, M.E.** (2002a). Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (c.v. Cavendish). *Biotechnology and bioengineering*, 78, 683-691.

**Ly-Nguyen, B., Van Loey, A.M., Fachin, D., Verlent, I., Hendrickx, M.E.** (2002b). Partial purification, characterization, and thermal and high pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (*Daucus carota* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5437–5444.

**Majerskaa, J., Michalskab, A., Figiela, A.** (2019). A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 207–219.

**Mallidis, C.G., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G., Katsabotxakis, C.** (1990). Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 25, 442–448.

**Malone, A.S., Shellhammer, T.H., Courtney, P.D.** (2002). Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4357-4363.

**Marra, F., Zhang, L., Lyng, J.G.** (2009). Radio frequency treatment of foods: review of recent advances. *Journal of Food Engineering*, 91, 497-508.

**Marszałek, K., Doesburg, P., Starzonek, S., Szczepańska, J., Woźniak, Ł., Lorenzo, J.M., Skąpskaa, S., Rzoskac, S., Barba, F.J.** (2019). Comparative effect of supercritical carbon dioxide and high pressure processing on structural changes and activity loss of oxidoreductive enzymes. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 29, 46-56.

**Marszałek, K., Woźniak, Ł., Skąpska, S., Mitek, M.** (2017). High pressure processing and thermal pasteurization of strawberry purée: quality parameters and shelf life evaluation during cold storage. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 832–841.

**Masegosa, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., Sánchez-Íñiguez, F., Ramírez, R.** (2014). Effect of processing by hydrostatic high pressure of two ready to heat vegetable meals and stability after refrigerated storage. *Food Science and Technology International*, 20, 605-15.

**Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Zapata-Revilla, M.A., Tenorio-Sanz, M.D.** (2010). Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *Food Science and Technology*, 43, 1467-1470.

**Mc Guire, R.** (1992). Reporting of objective colour measurements. *Hort. Sci.*, 27, 1254-1255.

**Melo-Sabogal, D.V., Torres-Grisales, Y., Serna-Jiménez, J.A., Torres-Valenzuela, L.S.** (2015). Aprovechamiento de pulpa y cáscara de plátano (*Musa paradisiaca* spp.) para la obtención de maltodextrina. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13, 76-85.

**Mendoza, V.A.B., Zambrano, O.R., Ganchozo, N.M., Murillo, J.P.M.** (2018). Percentages of gum guar and passion fruit juice in the physicochemical and organoleptic quality of néctar. *Agroind. Sci.*, 8, 21-25.

**Mihretu, F.G., & M.N. Bhalekar.** (2016). Changes in biochemical constituents of tomato juice during storage. *Food Science and Quality Management*, 50, 1-12.

**Morales-de la Peña, M., Salinas-Roca, B., Escobedo-Avellaneda, Z., Martín-Belloso, O., Welti-Chanes, J.** (2018). Effect of high hydrostatic pressure and temperature on enzymatic activity and quality attributes in mango puree varieties (c.v. Tommy, Atkins and Manila). *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1211–1221.

**Morales-Guzmán, V., Morales-Calva, E., Gallardo-Sandoval, A., Ortega-Rangel, L.** (2017). Evaluación de rendimiento y calidad de física galleta esponjada producida en Xicotepec de Juárez, Puebla. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 7, 7-9.

**Mosahev, V.V.,** Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Blany, C. (1994). Exploring the effect of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Tibtech*, 12, 493-501.

**Mosqueda-Melgar, J.,** Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O. (2008). Combination of high intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf life of melon and watermelon juices. *Food Microbiology*, 25, 479-491.

**Mossel, D.A.A.,** Moreno, B., Struijk, C.B. (2005). Principios generales en los que se basa la garantía de la inocuidad, la calidad microbiológica y la aceptabilidad de los alimentos. *Microbiología de los alimentos*, 8, 295-299.

**Moussa-Ayoub, T.E.,** Jäger, H., Knorr, D., El-Samahy, S.K., Kroh, L.W., Rohn, S. (2017). Impact of pulsed electric fields, high hydrostatic pressure, and thermal pasteurization on selected characteristics of *Opuntia dillenii cactus* juice. *Food Sci. Technol.*, 79, 534–542.

**Murad, H.A., & Azzaz, H.H.** (2011). Microbial pectinases and ruminant nutrition. *Research Journal of Microbiology*, 6, 246-269.

**Naderi, N.,** House, J.D., Pouliot, Y., Doyen, A. (2017). Effects of high hydrostatic pressure processing on hen egg compounds and egg products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 707–720.

**Nakamura, A.,** Itaki, C., Saito, A., Yonezawa, T., Aizawa, K., Hirai, A., Sukanuma, H., Miura, T., Mariya, Y., Haghdoost, S. (2017). Possible benefits of tomato juice consumption: a pilot study on irradiated human lymphocytes from healthy donors. *Nutrition Journal*, 16, 27.

**Ng, S.K.,** Tan, T.B., Tan, P.F., Chong, G.H., Tan, C.P. (2019). Effect of high pressure processing on the microbiological, physicochemical and enzymatic properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) bulb. *Food Research*, 3, 213–220.

**Nicastro, H.L.,** Ross, S.A., Milner, J.A. (2015). Garlic and onions: their cancer prevention properties. *Cancer Prevention Research*, 8, 181–189.

**Nicoletti, M.** (2012). Nutraceuticals and botanicals: overview and perspectives. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 63, 2-6.

**Nienaber, U., & Shellhammer, T.H.** (2001a). High pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66, 328-331.

**Nienaber, U., & Shellhammer, T.H.** (2001b). High pressure processing of orange juice: combination treatments and a shelf life study. *Journal of Food Science*, 66, 332-336.

**Noma, S., Tomita, C., Shimoda, M., Hayakawa, I.** (2004). Response of *Echerichia coli* O157:H7 in apple and orange juices by hydrostatic pressure treatment with rapid decompression. *Food Microbiology*, 21, 469-473.

**Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F., López-Nicolás, J.M.** (2005). Effect of organic farming practices on the level of latent polyphenoloxidase in grapes. *J. Food Sci.*, 70, 74-78.

**Nuñez-Mancilla, Y., Pérez-Won, M., Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Di Scala, K.** (2013). Osmotic dehydration under high hydrostatic pressure: effects on antioxidant activity, total phenolics compounds, vitamin C and colour of strawberry (*Fragaria vesca*). *Food Science and Technology*, 52, 151-156.

**O'Donnell, C.P., Tiwari, B.K., Bourke, P., Cullen, P.J.** (2010) Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 358-367.

**O'Shea, N., Arendt, E., Gallagher, E.** (2014). State of the art in gluten free research. *J. Food Sci.*, 79, 1067-1076.

**Obeng, F.A., Gyasi, P.B., Olu-Taiwo, M., Ayeh-kumi, F.P.** (2018). Microbial assessment of tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) sold at some central markets in Ghana. *Biomed Res. Int.*, article ID 6743826.

**Odriozola-Serrano, I., Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O.** (2013). Pulsed electric fields processing effects on quality and health related constituents of plant based foods. *Trends in Food Science & Technology*, 29, 98-107.

**Ogawa, H., Fukuhisa, K., Kubo, Y., Fukumoto, H.,** (1990). Pressure inactivation of yeasts, molds and pectinesterase in satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison of heat sanitation. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1219-1225.

**Onsa, G.H., Bin-Saari, N., Selamat, J., Bakar, J.** (2004). Purification and characterization of membrane bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*, 85, 365- 376.

**Orruno, E.,** Apenten, R.O., Zabetakis, I. (2001). The role of beta glucosidase in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry (*Fragaria ananassa* c.v. Elsanta). *Flavour Frag. J.*, 16, 81–84.

**Oyane, I.,** Takeda, T., Oda, Y., Sakata, T., Furuta, M., Okitsu, K., Maeda, Y., Nishimura, R. (2009). Comparison between the effects of ultrasound and  $\gamma$  rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: analyses of cell membrane permeability and DNA or RNA synthesis by flow cytometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 532-536.

**Ozen, B.F.,** & Floros, J.D. (2001). Effects of emerging food processing techniques on the packaging materials. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 60–67.

**Pal, R.S.,** Vandana, A.K., Agrawal, S. (2016). Purification and characterization of pectin methylesterase from Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* c.v. Hayward). *International Food Research Journal*, 23, 161-166.

**Patras, A.,** Brunton, N.P., Pieve, S.D., Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 308-313.

**Paul, D.K.,** & Shaha, R.K. (2004). Nutrients, vitamins and minerals content in common citrus fruits in the northern region of Bangladesh. *Pakistan Journal of biological Sciences*, 7, 238-242.

**Pellicer, J.A.,** Lucas-Abellán, C., Serrano-Martínez, A., López-Miranda, S., Núñez-Delicado, E., Fortea, M. I. (2016). Kinetic characterization and thermal properties of two acidic peroxidases from white cabbage (*Brassica Oleracea* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 40, 480–489.

**Pellicer, J.A.,** Navarro, P., Hernández-Sánchez, P., Gómez-López, V.M. (2019). Structural changes associated with the inactivation of lipoxygenase by pulsed light. *Food Science and Technology*, 113, e108332.

**Pérez-López, A.J.,** del Amor, F.M., Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., Núñez-Delicado, E. (2007). Influence of agricultural practices on the quality of sweet pepper fruits as affected by the maturity stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2075-2080.

**Pérez-Vicente**, A., Serrano, P., Abellán, P., García-Viguera, C. (2004). Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 639–644.

**Petrier**, C., Combet, E., Mason, T. (2007). Oxygen induced concurrent ultrasonic degradation of volatile and non volatile aromatic compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 117-121.

**Plaza**, L., Sánchez-Moreno, C., Elez-Martínez, P., de Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. (2006). Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization. *European Food Research and Technology*, 223, 487-493.

**Pokhrel**, P.R., Toniazzo, T., Boulet, C., Oner, M.E., Sablani, S., Tang, J., Barbosa-Cánovas, G.V. (2019). Inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in carrot juice by combining high pressure processing, nisin, and mild thermal treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 93-102.

**Polydera**, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstitutes orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60, 21-29.

**Polydera**, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2005). Quality degradation kinetics of pasteurized and high pressure processed fresh navel orange juice: nutritional parameters and shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 60, 1-9.

**Poojary**, M.M., & Passamonti, P. (2015). Extraction of lycopene from tomato processing waste: kinetics and modeling. *Food Chem.*, 173, 943-950.

**Porretta**, S., Bizzi, A., Ghizzoni, C. Vicini, E., (1995). Effects of high pressure treatments on the quality of tomato juice. *Food Chemistry*, 52, 35-41.

**Preetha**, P., Varadharaju, Z.N., Kennedy, J., Malathi, D., Shridar, B. (2015). Evaluation of non thermal process for decontamination of orange juice using a pulsed light system. *Intl. J. Food. Ferment. Technol.* 5, 121-128.

**Primo**, M.S., Ceni, G.C., Marcon, N.S., Antunes, O.A.C., Oliveira, D., Oliveira, J.V. (2007). Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves. *J. Supercrit Fluid*, 43, 283–290.

**Quaglia, G.B.,** Gravina, R., Paperi, R., Paoletti, F. (1996). Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green pears. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 29, 552-555.

**Ramaswamy, H.,** & Marcotte, M. (2005). Food processing: principles and Applications. CRC Press. Taylor & Francis Group. ISBN: 978020348524.

**Ramaswamy, H.,** & Tang, J. (2008). Microwave and radio frequency heating. *Food Science and Technology International*, 14, 423-427.

**Raso, J.,** & Barbosa-Cánovas, G.V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 265-285.

**Rastogi, N.K.** (2003). Application of high intensity pulsed electric fields in food processing. *Food Reviews International*, 19, 229-251.

**Repajić, M.,** Kovačević, D.B., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Kušt, J., Čošić, Z., Levaj, B. (2015). The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry marasca (*Prunus cerasus* c.v. Marasca) juice. *Food Science and Technology*, 62, 894-900.

**Rivera-Camelo, A.P.,** Restrepo, P., Narváez-Cuenca, C.E. (2004). Polifenoloxidasas y peroxidasa de pulpa de uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*). *Rev. Colomb. Quim.*, 33, 57-66.

**Roda, A.,** & Lambri, M. (2019). Food uses of pineapple waste and by-products: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 1009-1017.

**Rodríguez, S.M.B.,** Megías, M.S., Baena, M.B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?. *Rev. Esp. Salud. Pública*, 77, 317-331.

**Rodríguez-López, J.N.,** Espín, J.C., Del Amor, F., Tudela, J., Martínez, V., Cerdá, A., García-Cánovas, F. (2000). Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melon* L.) cultivated under different salinity conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1537-1541.

**Rodríguez-López, J.N.,** Fenoll, L.G., García-Ruiz, P.A., Varón, R., Tudela, J., Thorneley, R.N., García-Cánovas, F. (2000). Stopped flow and steady state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*, 39, 10497-10506.

**Rojas, M.L.,** Miano, A.C., Augusto, P.E.D. (2017). Ultrasound processing of fruit and vegetable juices. *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation*, 7, 181-199.

**Romero-Rodríguez, M.A., Vázquez-Oderiz, M.L., López-Hernández, J., Lozano, J. S.** (1992). Determination of vitamin C and organic acids in various fruits by HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 30, 433–437.

**Ross, Z.M., O’Gara, E.A., Hill, D.J., Sleightholme, H.V., Maslin, D.J.** (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 475-480.

**Rubens, P., Goossens, K., Heremans, K.** (1997). Pressure induced gelatinisation of different starch types: a FTIR study. High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, pp. 191-194 (Ed.) K. Leuven, Bélgica.

**Ruiz-Cano, D., Pérez-Llamas, F., Frutos, M.J., Arnao, M.B., Espinosa, C., López-Jiménez, J.A.** (2014). Chemical and functional properties of the different byproducts of artichoke (*Cynara scolymus L.*) from industrial canning processing. *Food Chem.*, 160, 134-140.

**Ruiz-Moreno, M.J., Raposo, R., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno-Rojas, J.M.** (2015). Valorization of grape stems. *Ind. Crops Prod.*, 63, 52-157.

**Saad, S.M., Shaltout, F.A., Elroos, N.A.A., El-nahas, S.B.** (2019). Antimicrobial effect of some essential oils on some pathogenic bacteria in minced meat. *J. Food Sci. Nutr. Res.*, 2, 012-020.

**Sadilova, E., Stintzing, F.C., Kammerer, D.R., Carle, R.** (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42, 1023–1033.

**Sadilova, E., Stintzing, F.C., Kammerer, D.R., Carle, R.** (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42, 1023–1033.

**Sajid, M., Butt, M.S., Shehzad, A., Tanweer, S.** (2014). Chemical and mineral analysis of garlic: a golden herb. *Pakistan Society of Food Scientists and Technologists*, 24, 108-110.

**Salazar-González, C., San Martín-González, M.F., López-Malo, A., Sosa-Morales, M.E.** (2012). Recent studies related to microwave processing of fluid foods. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 31-46.

**Saldo, J., Sendra, E.Y., Guamis, B. (2000).** High pressure for accelerating ripening of goat's milk cheese: proteolysis and texture. *Journal of Food Science*, 65, 636-640.

**Samborska, K., Eliasson, L., Marzec, A., Kowalska, J., Piotrowski, D., Lenart, A., Kowalska, H. (2019).** The effect of adding berry fruit juice concentrates and by-product extract to sugar solution on osmotic dehydration and sensory properties of apples. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 1827-1938.

**San Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (2002).** Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 627-645.

**Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M. P. (2006).** Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical scavenging capacity. *Food Chemistry*, 98, 749-756.

**Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. (2006).** Impact of high pressure and traditional thermal processing of tomato purée on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 171-179.

**Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. (2005).** Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice and comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4403-4409.

**Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A.M., Barbosa-Cánovas, G.V. (1997).** La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos, *Alimentaria*, 35, 33-43.

**Schluter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., Engel, K.H., Holzhauser, T., Knorr, D., Eisenbrand, G. (2013).** Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 920-927.

**Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., Lambri, M. (2015).** Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperatura on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control*, 47, 166-174.

**Sentandreu, E., Carbonell, L., Carbonell, J.V., Izquierdo, L. (2005).** Effects of heat treatment conditions on fresh taste and on pectinmethylesterase activity of chilled mandarin and orange juices. *Food Science and Technology International*, 11, 217-222.

**Serrano-Martínez, A., Fortea, M.I., del Amor, F.M., Núñez-Delicado, E. (2008).** Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, 107, 193–199.

**Seyderhelm, I., Boguslovski, S., Michaelis, G., Knorr, D. (1996).** Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61, 308-310.

**Shahbaz, H.M., Yoo, S., Seo, B., Ghafoor, K., Un Kim, Y., Lee, D.U., Park, J. (2016).** Combination of TiO<sub>2</sub>-UV photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate bacterial pathogens and yeast in commercial apple juice. *Food Bioprocess Technol.*, 9, 182–190.

**Shapla, U.M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M.I., Gan, S.H. (2018).** 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12, 1-35.

**Sharma, A.K., Kumar, R., Azad, Z.A.A., Adsule, P.G. (2015).** Use of fine wine lees for value addition in ice cream. *J. Food Sci. Technol.*, 52, 592-596.

**Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M. (2012).** Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 45–60.

**Sharma, N.R., Sasankan, A., Singh, A., Soni, G. (2011).** Production of polygalacturonase and pectin methyl esterase from agrowaste by using various isolates of *Aspergillus niger*. *Insight Microbiology*, 1, 1-7.

**Siguemoto, É.S., Purgatto, E., Hassimotto, N.M.A., Gut, J.A.W. (2019).** Comparative evaluation of flavour and nutritional quality after conventional and microwave assisted pasteurization of cloudy apple juice. *Food Science and Technology*, 111, 853-860.

**Silva, D.C.J., de França, P.R.L., Converti, A., Porto, T.S. (2019).** Pectin hydrolysis in cashew apple juice by *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase covalently immobilized on calcium alginate beads: a kinetic and thermodynamic study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 820-827.

**Silva**, Y.P., Borba, B.S., Reis, M.G., Caliari, M., Ferreira, T.A. (2016). Tomato industrial waste as potential source of nutrients. *XXV Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a ávore que sustenta a vida*.

**Singh**, P.K., Kumar, S., Kumar, P., Baht, Z.F. (2012). Pulsed light and pulsed electric field emerging non thermal decontamination of meat. *American Journal of Food Technology*, 7, 506-516.

**Soto-Reyes**, N., Rojas-Laguna, R., Sosa-Morales, M.E. (2012). Modelación del calentamiento dieléctrico (microondas y radiofrecuencia) en sistemas alimenticios modelo. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 19-31.

**Soural**, I., Šnurkovič, P., Bieniasz, M. (2019). L-ascorbic acid content and antioxidant capacity in less known fruit juices. *Czech J. Food Sci.*, 37, 359-365.

**Spira**, P., Bisconsin-Junior, A., Rosenthal, A., Monteiro, M. (2018). Effects of high hydrostatic pressure on the overall quality of pêra rio orange juice during shelf life. *Food Science and Technology International*, 24, 507–518.

**Sreedevi**, P., Jayachandran, L.E., Rao, P.S. (2019). Kinetic modelling of high pressure induced inactivation of polyphenoloxidase in sugarcane juice (*Saccharum officinarum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1.

**Stajčić**, S., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Mandić, A., Četojević-Simin, D. (2015). Tomato waste: carotenoids content, antioxidant and cell growth activities. *Food Chem.*, 172, 225-232.

**Stinco**, C.M., Szczepańska, J., Marszałek, K., Pinto, C.A., Inácio, R.S., Mapelli-Brahm, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Saraiva, J.A., Meléndez-Martínez, A.J. (2019). Effect of high pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. *Food Chemistry*, 299, 125112.

**Stoforos**, N.G., Crelier, S., Robert, M.C., Taoukis, P.S. (2002). Kinetics of tomato pectin methylesterase inactivation by temperature and high pressure. *Journal of food science*, 67, 1026-1031.

**Suarez-Jacobo**, A., Rufer, C.E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., Saldo, J. (2011). Influence of ultra high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, 127, 447-454.

**Šukalović, H.T.V., Vuletić, M., Marković, K., Antić, C.T., Vučinić, Ž.** (2015). Comparative biochemical characterization of peroxidases (class III) tightly bound to the maize root cell walls and modulation of the enzyme properties as a result of covalent binding. *Protoplasma*, 252, 335–343.

**Sun, X.D., & Holley, R.A.** (2010). High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75, 17–23.

**Suzuki, A., Homma, N., Fukuda, N., Hirao, K., Uryu, T., Ikeuchi, Y.** (1994). Effects of high pressure treatment on the flavour related components in meat. *Meat Science*, 37, 369-379.

**Szczepańska, J., Barba, F.J., Skąpska, S., Marszałek, K.** (2019). High pressure processing of carrot juice: Effect of static and multipulsed pressure on the polyphenolic profile, oxidoreductases activity and colour. *Food Chem.*, 307, 125549.

**Tedjo, W., Eshtiaghi, M.N., Knorr, D.** (2000). Impact of supercritical carbon dioxide and high pressure on lipoxygenase and peroxidase activity. *J. Food Sci.*, 65, 1284–1287.

**Terefe, N.S., Buckow, R., Versteeg, C.** (2014). Quality Related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, Part 1: high pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 24-63.

**Terefe, N.S., Matthies, K., Simons, L., Versteeg, C.** (2009). Combined high pressure mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 52-60.

**Terefe, N., Yang, Y., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C.** (2010). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 52-60.

**Tholozan, J.L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M., Tissier, J.P.** (2000). Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 202-212.

**Thomas, L.V., Ingrama, R.E., Yub, S., Delves-Broughtona, J.** (2004). Investigation of the effectiveness of ascopyrone P as a food preservative. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 319-323.

**Tian**, G.W., Chen, M.H., Zaltsman, A., Citovsky, V. (2006). Pollen specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Developmental Biology*, 294, 83–91.

**Tomas-Barberan**, F.A., & Espin, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853–876.

**Toralles**, R.P., Vendruscolo, J.L., Vendruscolo, C.T., del Pino, F.A.B., Antunes, P.L. (2005). Properties of polyphenoloxidase and peroxidase from granada clingstone peaches. *Braz. J. Food Technol.*, 8, 233-242.

**Torres**, J.A. & Velázquez, G. (2008). Hydrostatic pressure processing of foods. In S. Jun & J. Irudayaraj (Eds.), *Food Processing Operations Modeling: Design and Analysis* (Second ed., pp. 173-212). Mexico.

**Torres**, J.A., & Velázquez, G. (2005). Commercial opportunities & research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67, 95-112.

**Trodler**, P., & Pleiss, J. (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *Struct. Biol.*, 8, 1–10.

**Trujillo**, F.J., & Geveke, D.J. (2014). Nonthermal processing by radio frequency electric fields. En: *emerging technologies for food processing*. Da Wen Sun (Ed.). National University of Ireland, Dublin, Ireland.

**Tseng**, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chem.*, 138, 356-365.

**Uemura**, K., Takahashi, C., Kobayashi, I. (2010). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in soybean milk by radio frequency flash heating. *Journal of Food Engineering*, 100, 622-626.

**Ulmer**, H.M., Gaenzle, M.G., Vogel, R.F. (2000). Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Cienc. Tecnol. Aliment. Applied Environmental Microbiology*, 66, 3966-3973.

**Vadivambal**, R., & Jayas, D.S. (2010). Non uniform temperature distribution during microwave heating of food materials-a review. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 161-171.

**Valencia, F.E., & Román M.O.** (2006). Physicalchemical and functional characterization of three commercial concentrates from dietary fiber. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 13, 54-60.

**Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., Morales, G.** (2014). Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?. *Rev. Chil. Nutr.*, 41, 198-204.

**Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., Lizama, V.** (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80, 509–516.

**Van Buggenhout, S., Sila, D., Duvetter, T., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E.** (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: part III texture engineering. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 8, 105–117.

**Varela-Santos, E., Ochoa-Martinez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J.E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., Morales-Castro, J.** (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf life of pomegranate juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 13–22.

**Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M.J., Galotto, M.J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., Di Scala, K.** (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, colour, phenolic acids and antioxidant capacity of cape gooseberry Pulp (*Physalis peruviana L.*). *Food Science and Technology*, 58, 519-526.

**Velázquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., Guamis-López, B., Roig-Sagués, A.X.** (2012). Impact of ultra high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: a comparative study against conventional heat pasteurization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 13, 100–106.

**Vercammen, A., Vivijs, B., Lurquin, I., Michiels, C.W.** (2012). Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 162–167.

**Verde-Méndez, C.M., Rodríguez-Rodríguez, E.M., Díaz-Romero, C., Sánchez-Mata, M.C., Matallana-González, M.C., Torija-Isasa, M.E.** (2011). Vitamin C and organic acid contents in spanish “gazpacho” soup related to the vegetables used for its elaboration process. *Journal of Food*, 9, 71–76.

**Verlent, I., Hendrickx, M., Verbeyst, L., Van Loey, A. (2007).** Effect of temperature and pressure on the combined action of purified tomato pectinmethylesterase and polygalacturonase in presence of pectin. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1141–1146.

**Verlent, I., Van Loey, A., Smout, C., Duvetter, T., Hendrickx, M.E. (2004).** Purified tomato polygalacturonase activity during thermal and high pressure treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 63–71.

**Vervoort, L., Van der Plancken, J., Graumet, T., Timmermans, R.A.H., Mastwijk, H. C., Matser, A.M., Hendrickx, M.E., Van Loey, A.V. (2011).** Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 466-477.

**Vicente, A.R., Manganaris, G.A., Sozzi, G.O., Crisosto, G.H. (2009).** Nutritional quality of foods and vegetables. Eds. Postharvest Handling: A Systems Approach (pp. 57-106). New York, USA.

**Villamonte, G., Simonin, H., Duranton, F., Chéret, R., de Lamballerie, M. (2013).** Functionality of pork meat proteins: impact of sodium chloride and phosphates under high pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 15–23.

**Wang, H., Reitmeier, C.A., Glatz, B.A., Carriquiry, A.L. (2003).** Mixed model analysis of sensory characteristics of irradiated apple cider. *Journal of Food Science*, 68, 1498-1503.

**Wasim, S.M., & Singh, J.P. (2015).** Compositional alterations in tomato products during storage. *Res. J. Chem. and Environ.*, 19, 82-87.

**Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C.E., Guerrero-Beltrán, J.Á. (2009).** High pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 457–462.

**Wibowo, S., Essel, E.A., de Man, S., Bernaert, N., Van Droogenbroeck, B., Grauwet, T., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2019).** Comparing the impact of high pressure, pulsed electric field and thermal pasteurization on quality attributes of cloudy apple juice using targeted and untargeted analyses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 64-77.

**Xu, C., Yagiz, Y., Marshall, S., Li, Z., Simonne, A., Lu, J.** (2015). Application of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace extract to reduce carcinogenic acrylamide. *Food Chem.*, 182, 200-208.

**Yahaya, Y., Uauri, U., Bagudo, B.** (2010). Study of nutrient content variation in bulb and stalk of onions (*Allium Sepa*) cultivated in Aliero, Aliero, Kebbi State, Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 18, 83-89. **Yamazaki, K., Teduka, H., Shinano, H.** (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 543-545.

**Zandonadi, R.P., Botelho, R.B.A., Gandolfi, L., Ginani, J.S., Montenegro, F.M., Pratesi, R.** (2012). Green banana pasta: an alternative for gluten free diets. *J. Acad. Nutr. Diet.*, 112, 1068-1072.

**Zell, M., Lyng, J.G., Morgan, D.J., Cronin, D.A.** (2009). Development of rapid response thermocouple probes for use in a batch ohmic heating system. *Journal of Food Engineering*, 93, 344-347.

**Zhao, L., Wang, Y., Qiu, D., Liao, X.** (2013). Effect of ultrafiltration combined high pressure processing on safety and quality features of fresh apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3246-3258.

**Zhou, C.L., Liu, W., Yuan, C., Song, Y., Chen, D., Ni, Y.Y., Li, Q.H.** (2014). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical chemical characteristics of pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 24-34.

**Zhu, X., Guo, W., Wu, X.** (2012). Frequency and temperatura dependent dielectric properties of fruit juices associated with pasteurization by dielectric heating. *Journal of Food Engineering*, 109, 258-266.

**Zhu, Y., Elbrhami, A.A., Popović, V., Koutchma, T., Warriner, K.** (2019). Comparative effects of thermal, high hydrostatic pressure, and UVC processing on the quality, nutritional attributes, and inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Listeria* introduced into tiger nut milk. *Journal of Food Protection*, 82, 971-979.

**Zou, Y., Ma, K., Tian, M.** (2015). Chemical composition and nutritive value of hot pepper seed (*Capsicum annuum*) grown in northeast region of China. *Food Science and Technology*, 35, 659-663.



## **VII - ANEXOS**



## VII - ANEXOS

**ANEXO 1:** Azúcar minoritario (maltosa) del estudio de vida útil en el puré de tomate.

**Tabla 7.1.** Evolución en la concentración de maltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

**ANEXO 2:** Azúcar minoritario (isomaltosa) del estudio de vida útil en el puré de tomate.

**Tabla 7.2.** Evolución en la concentración de isomaltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

**ANEXO 3:** Azúcar minoritario (sorbitol) del estudio de vida útil en el puré de tomate.

**Tabla 7.3.** Evolución en la concentración de sorbitol (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 3,8), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 70 °C + HPP 400 MPa	<sup>2</sup> TT 65 °C + HPP 500 MPa	<sup>2</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 70/65/60 °C y presurizado a 400/500/600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

**ANEXO 4:** Azúcar minoritario (maltosa) del estudio de vida útil en el gazpacho.**Tabla 7.4.** Evolución en la concentración de maltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

**ANEXO 5:** Azúcar minoritario (isomaltosa) del estudio de vida útil en el gazpacho.

**Tabla 7.5.** Evolución en la concentración de isomaltosa (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.

<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.

<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.

**ANEXO 6:** Azúcar minoritario (sorbitol) del estudio de vida útil en el gazpacho.**Tabla 7.6.** Evolución en la concentración de sorbitol (g/L) para las muestras control y bajo tratamiento (ambas ajustadas a pH 4), almacenadas a 4 °C durante el estudio de vida útil.

Vida útil (días)	*Control	<sup>1</sup> TT 90 °C	<sup>2</sup> TT 60 °C	<sup>3</sup> TT 60 °C + HPP 600 MPa
0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
10	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
20	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
30	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
40	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
50	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0
60	n.d.	<1,0	<1,0	<1,0

\*Control: sin tratamiento.

<sup>1</sup>Pasteurizado a 90 °C durante 5 min.<sup>2</sup>Calentado a 60 °C durante 5 min.<sup>3</sup>Calentado a 60 °C y presurizado a 600 MPa durante 5 y 3 min, respectivamente.

n.d.: no determinado.











