



# **EFEECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE EL GAZPACHO Y ZUMO DE UVA**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTORA EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

LAMYA DAUDI  
BELLATERRA, 2004



**C.E.R. PLANTA DE TECNOLOGIA DELS ALIMENTS**



Membre de:



**XARXA DE CENTRES  
DE SUPORT  
A LA INNOVACIÓ  
TECNOLÒGICA**

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS  
ALIMENTS**

**EFECTO DE LAS ALTAS  
PRESIONES HIDROSTÁTICAS  
SOBRE EL GAZPACHO Y ZUMO  
DE UVA**

MEMORIA PRESENTADA PARA  
OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

LAMYA DAOUDI  
BELLATERRA, 2004

BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, Catedrático de Tecnología de los Alimentos, y  
ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Profesor Titular de Tecnología de los Alimentos  
de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HACEN CONSTAR: Que la licenciada en Biología LAMYA DAOUDI ha realizado,  
bajo su dirección, en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat  
Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado “Efecto de las altas presiones hidrostáticas  
sobre el gazpacho y el zumo de uva” que presenta para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del  
Vallès), el 28 de Septiembre del 2004.

Buenaventura Guamis López  
Mesa

Antonio José Trujillo

*“La sabiduría de los sabios y la  
experiencia de los años se conservan por  
medio de las citas”*

*Benjamín Disraeli*

*A la memoria de mi madre*

*Quiero dedicar este trabajo a todos mis  
amigos, a toda mi familia, especialmente, a  
mi padre y mi marido Oscar, por su apoyo,  
cariño y comprensión permanente.*

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización del presente trabajo implicó un conjunto de esfuerzos, superando dificultades de voluntad, de adaptación y de perseverancia. Quiero agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra me han acompañado durante este largo camino.

En primer lugar, a Buenaventura Guamis, por la dirección de este trabajo, por la financiación económica, por su confianza, por su paciencia,... y su amistad. A él mi más profundo agradecimiento.

A Toni Trujillo por todo el tiempo dedicado, por orientarme en el trabajo, por el rigor científico, por darme consejos y ánimos para continuar hasta finalizar este trabajo, por sus criterios realistas y concisos, y sobre todo por su apoyo y amistad.

A Vicky Ferragut por su ayuda en la elaboración de una parte importante de este trabajo, por dedicarme parte de su tiempo y por su empuje.

A Josep Yuste por enseñarme y orientarme a mi llegada a este departamento, pero sobre todo por su bondad y sus grandes cualidades tanto a nivel personal como profesional.

A Ramón Gervilla por su ayuda en la elaboración e interpretación de las estadísticas, por estar siempre ahí cuando lo necesitas y por su amistad.

A Joan Miquel Quevedo por su ayuda, su apoyo, su disponibilidad, su colaboración, y sobre todo por hacer que todo sea más fácil y llevadero en la planta piloto.

A Martín Buffa y Jordi Saldo por su ayuda y sugerencias estadísticas y por los agradables momentos de amistad que me han dado.

A Bibi, Sonia y Laura, por los buenos momentos compartidos, por hacerme sentir como en familia, por ser mis confidentes, por su apoyo incondicional y su gran amistad.

A Marta Capellas, Elena Beltrán, Reyes Plà, Montse Mor-Mur, Tomás López, Mar Serra, Silvia De Lamo, Isha Normahomed, Esther Sendra, y tantos otros y otras compañeros de Facultad que han permitido que todo este tiempo sea más agradable.

A Anna Puig por su inestimable y desinteresada ayuda al realizar e interpretar los resultados de microbiología de los vinos. También le agradezco su amistad.

Al personal del INCAVI y en especial a Enric Bartra y Fina Capdevilla por su disponibilidad y colaboración en el análisis del vino.

A José Juan Rodríguez del Dpto. de Higiene y a la Dra. Calvo del Dpto. de Microbiología de la Facultat de Veterinària de la UAB, por su ayuda en la identificación de las cepas microbianas presentes tanto en el gazpacho como en el zumo de uva.

Al Dpto.de Tecnología dels Aliments de la Universitat de Lleida, especialmente a Olga Martín, por acogerme en su unidad investigadora para aprender técnicas de cuantificaciones enzimáticas.

En fin, a todos, mi más sincero reconocimiento.

# ÍNDICE DE MATERIAS

<b>I. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>1</b>
1.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS GENERALES .....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DELGAZPACHO.....	5
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL ZUMO DE UVA.....	6
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS EN EL ESTUDIO DE APTITUD A LA VINIFICACIÓN DE ZUMOS DE UVA TRATADOS POR ALTAS PRESIONES Y OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE CLARIFICACIÓN .....	7
1.5. PLAN DE TRABAJO .....	8
1.5.1. Gazpacho.....	8
1.5.2. Zumo de uva.....	9
1.5.3. Vinos jóvenes .....	10
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
2. 1. LAS ALTAS PRESIONES .....	13
2. 1. 1. Historia y generalidades.....	13
2. 1. 2. Fundamentos y definiciones.....	14
2. 2. EQUIPOS DE TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN .....	16
2. 3. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS CONSTITUYENTES DE LOS ALIMENTOS.....	18
2. 3. 1. Agua .....	18
2. 3. 2. Lípidos .....	19
2. 3. 3. Hidratos de carbono .....	20
2. 3. 4. Proteínas .....	20
2. 3. 5. Enzimas .....	22
2. 3. 6. Vitaminas .....	28
2. 4. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS MICROORGANISMOS .....	29
2. 5. APLICACIONES DE LAS ALTAS PRESIONES EN ALIMENTOS .....	31
2. 5. 1. Aplicaciones en zumos de frutas y vegetales .....	31
2. 5. 2. Aplicación de las altas presiones en productos lácteos y derivados .....	33
2. 5. 3. Aplicación de las altas presiones en la carne, la carne de ave y sus derivados ..	33
2. 5. 4. Aplicación de las altas presiones en ovoproductos.....	34
2. 5. 5. Aplicación de las altas presiones en pescados y derivados.....	35
2. 6. EL GAZPACHO .....	35
2. 7. EL ZUMO DE UVA.....	39

2. 7. 1. Aspectos generales de la uva y métodos de clarificación.....	39
2. 7. 2. Composición del zumo de uva .....	42
2. 7. 3. Técnicas de conservación del zumo de uva .....	43
2. 7. 4. Algunas aplicaciones de las altas presiones sobre el zumo de uva.....	45
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
3. 1. EL GAZPACHO .....	49
3. 1. 1. La materia prima .....	49
3. 1. 2. Formulación.....	49
3. 1. 3. Preparación del gazpacho .....	49
3. 1. 4. Tratamientos de alta presión.....	51
3. 1. 5. Análisis enzimático .....	52
3. 1. 5. 1. Extracción de la PME.....	52
3. 1. 5. 2. Medida y expresión de la actividad de la PME .....	53
3. 1. 5. 3. Extracción de la PPO y POD.....	53
3. 1. 5. 4. Medida y expresión de las actividades PFO y POD.....	54
3. 1. 6. Análisis microbiológico .....	54
3. 1. 6. 1. Recuentos microbianos en el gazpacho.....	54
3. 1. 7. Análisis físico-químico.....	54
3. 1. 7. 1. Medida del pH .....	54
3. 1. 7. 2. Determinación de la proteína.....	54
3. 1. 7. 3. Determinación del extracto seco.....	54
3. 1. 7. 4. Análisis de grados Brix.....	55
3. 1. 7. 5. Análisis de color del gazpacho .....	56
3. 1. 7. 6. Evaluación reológica .....	57
3. 1. 7. 7. Análisis organoléptico del gazpacho .....	57
3. 1. 7. 8. Análisis estadístico .....	57
3. 2. ZUMO DE UVA Y ELABORACIÓN DEL VINO.....	60
3. 2. 1. Procedencia y almacenamiento de la uva .....	60
3. 2. 2. Elaboración del zumo de uva.....	60
3. 2. 3. Clarificación del zumo de uva .....	62
3. 2. 4. Tratamiento de altas presiones.....	62
3. 2. 5. Elaboración del vino.....	63
3. 2. 6. Análisis microbiológico .....	64
3. 2. 6. 1. Recuentos microbianos en el zumo de uva.....	64

3. 2. 6. 2. Análisis microbiológico en el vino.....	65
3. 2. 6. 3. Aislamiento del ADNmt y análisis de restricción RFLP-mtDNA .....	65
3. 2. 7. Análisis de composición de los zumos de uva y de los vinos.....	67
3. 2. 7. 1. Análisis de pH .....	67
3. 2. 7. 2. Grados Brix .....	67
3. 2. 7. 3. Acidez total.....	67
3. 2. 7. 4. Densidad .....	67
3. 2. 8. <i>Análisis de color</i> .....	68
3. 2. 8. 1. Ensayo de oxidación.....	68
3. 2. 9. <i>Análisis sensorial de los zumos de uva y vinos</i> .....	69
3. 2. 10. <i>Análisis estadístico</i> .....	69
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. GAZPACHO .....</b>	<b>71</b>
4.1. COMPOSICIÓN DEL GAZPACHO.....	73
4.2. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LOS VEGETALES DEL GAZPACHO.....	73
4.3. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN Y LA TEMPERATURA SOBRE LAS ACTIVIDADES PME, PFO Y POD.....	77
4.4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO (4 °C) SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL GAZPACHO PRESURIZADO A DIFERENTES PRESIONES Y TIEMPOS A 45 Y 50 °C .....	82
4.5. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LA CONSERVACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL GAZPACHO.....	85
4.6. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN EN EL COLOR DEL GAZPACHO.....	88
4.8. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DEL GAZPACHO.....	92
4.7. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL GAZPACHO.....	97
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ZUMO DE UVA .....</b>	<b>101</b>
5.1. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE CLARIFICACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LOS ZUMOS DE UVA.....	102
5.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE ALTAS PRESIONES SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL ZUMO DE UVA.....	104
5.3. INFLUENCIA DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EN LOS ZUMOS DE UVA .....	107
5.4. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ZUMO DE UVA DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO.....	110

5.5. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE EL COLOR DE LOS ZUMOS DE UVA Y SU EVOLUCIÓN DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO .....	114
5.6. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LOS ZUMOS DE UVA.....	119
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. APTITUD A LA VINIFICACIÓN DE LOS ZUMOS DE UVA TRATADOS POR ALTA PRESIÓN.....</b>	<b>124</b>
6.1. VINIFICACIÓN Y CINÉTICA DE FERMENTACIÓN.....	126
6.2. CARACTERIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA CEPA DE LEVADURA INOCULADA EN LOS ZUMOS DE UVA.....	127
6.3. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN DE LOS VINOS OBTENIDOS A PARTIR DE ZUMOS DE UVA TRATADOS POR ALTA PRESIÓN Y ZUMOS CONTROL.....	129
6.4. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DEL COLOR .....	131
6.5. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS VINOS .....	134
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>136</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>144</b>

**I. ANTECEDENTES,  
OBJETIVOS Y PLAN DE  
TRABAJO**

## 1. 1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS GENERALES

En las últimas décadas el mercado ha evolucionado considerablemente debido al desarrollo de numerosas tecnologías para la conservación de los alimentos. Actualmente el consumidor es cada vez más exigente, demandando alimentos de mejor calidad, similares a sus equivalentes frescos naturales, con buenas características nutricionales, sanos y que garanticen su seguridad alimentaria.

La necesidad de producir alimentos siguiendo estrictos parámetros de calidad ha llevado a aplicar nuevas tecnologías de conservación alternativas a las tradicionales, las cuales basándose esencialmente en tratamientos térmicos intensos con el objetivo de inactivar microorganismos y enzimas, causan pérdidas en las características organolépticas y del valor nutricional de los alimentos (Hayashi, 1989).

El gazpacho, el zumo de uva y el vino son productos perecederos y de gran complejidad debido a su pH ácido, y muy apreciados por sus características organolépticas y nutricionales. El gazpacho dispone de unas características organolépticas peculiares de sabor, aroma y color debido a la variedad de vegetales que lo componen. Estas características se ven afectadas por enzimas como la pectinmetilesterasa (PME), la polifenoloxidasa (PFO) y la peroxidasa (POD), así como por alteraciones microbiológicas que llevan a la descomposición del producto. El zumo de uva, por su parte, está expuesto a grandes alteraciones microbiológicas debido especialmente a su alto contenido en azúcares, así como a pérdidas de color, sabor y aroma. El vino es un producto delicado y está expuesto a un rápido pardeamiento debido a los compuestos fenólicos y flavonoides contenidos en él, lo que lleva también a alteraciones en su aroma y sabor.

La aplicación de las altas presiones hidrostáticas se muestra como una tecnología interesante en el tratamiento y conservación en refrigeración de estos productos con la posibilidad de incrementar su vida útil, sin alterar sus propiedades nutricionales y organolépticas. En el caso de los vinos, los tratamientos químicos y térmicos que se efectúan en otros productos alimentarios

líquidos para su conservación no son válidos, debido a la pérdida de calidad gustativa y aromática que se detecta después del tratamiento. Una alternativa consistiría en partir de zumos de uva de alta calidad microbiológica y organoléptica para la elaboración de vinos de calidad.

La Unitat de Tecnologia dels Aliments y desde 1993 el Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERTA) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) ha participado en dos proyectos europeos sobre alta presión, uno en el programa AIR (referencia AIR-CT92-0296) titulado “High hydrostatic pressure treatment, its impact on spoilage organisms, biopolymer activity, functionality and nutrient composition of food systems” y otro en el programa FAIR (referencia FAIR-CT96-1113) con título “High pressure treatment of liquid foods and derived”.

Como parte del trabajo realizado en los años 1996-99 en el proyecto europeo FAIR CT96:1113EU, el grupo investigador de la UAB incluyó una serie de experiencias donde se estudiaron los efectos de los tratamientos de alta presión en zumos de frutas y en gazpacho.

En el presente trabajo se recogen los resultados obtenidos en el estudio de la aplicación de las altas presiones en gazpacho y zumo de uva.

Los principales objetivos de este trabajo experimental fueron:

- **Estudiar el efecto de las altas presiones sobre la conservación del gazpacho en refrigeración manteniendo en lo posible sus características físico-químicas y organolépticas.**
- **Investigar el efecto de las altas presiones sobre la conservación del zumo de uva obtenido por diferentes métodos de clarificación, manteniendo en lo posible sus características físico-químicas y organolépticas.**
- **Estudiar la aptitud de vinificación de zumos de uva tratados por altas presiones y obtenidos por diferentes métodos de clarificación.**

Para ello se fijaron las combinaciones de presión, temperatura y tiempo, adecuadas para cada producto, con el fin de conseguir una inactivación microbiana y enzimática suficiente para la conservación de estos productos en condiciones de refrigeración.

Los estudios y objetivos específicos para cada producto se exponen a continuación.

## **1. 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS EN EL GAZPACHO**

- **Establecer una formulación de gazpacho**

Estudiar las características físico-químicas de dos marcas industriales para poder escoger una formulación adecuada para la elaboración de un gazpacho fresco y de gran calidad.

- **Investigar la inactivación enzimática**

Fijar las combinaciones de presión, tiempo y temperatura adecuados para inactivar las enzimas responsables del pardeamiento y la desestabilización del gazpacho (PME, PFO, POD).

- **Estudiar la inactivación microbiana**

Establecer las condiciones más adecuadas de tratamiento para la inactivación de los microorganismos responsables del deterioro del gazpacho.

- **Evaluar el efecto de los tratamientos de alta presión sobre la conservación del producto**

Comprobar la conservación en refrigeración del gazpacho por tratamientos de alta presión combinados con temperaturas moderadas (hasta 50 °C), y estudiar el efecto de estos tratamientos sobre sus propiedades organolépticas (color, sabor, aroma, etc.).

- **Estudiar el efecto de la alta presión sobre las características reológicas del gazpacho**

Evaluar el efecto de los tratamientos de alta presión sobre las propiedades reológicas del gazpacho y su evolución durante el almacenamiento.

### **1. 3. OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL ZUMO DE UVA**

- **Estudiar la aplicación de la técnica más adecuada de clarificación al zumo de uva para su posterior tratamiento por alta presión**

Comparar dos métodos de clarificación de zumo de uva, la microfiltración y la clarificación por enzimas pectolíticas, mediante análisis de composición, microbiológicos y sensoriales.

- **Determinar el efecto del tratamiento sobre la composición del zumo de uva y su evolución**

Comprobar el efecto de los diferentes tratamientos de altas presiones sobre las propiedades físico-químicas del zumo de uva a lo largo de 60 días de almacenamiento en refrigeración.

- **Evaluar el efecto de las altas presiones sobre la estabilización microbiológica del producto**

Buscar las combinaciones de presión, temperatura y tiempo adecuadas para conseguir una estabilización microbiológica, aumentando la vida útil y mejorando la calidad del zumo de uva.

- **Investigar el efecto del tratamiento sobre la calidad sensorial del zumo de uva**

Determinar el efecto de los diferentes tratamientos de altas presiones sobre las propiedades organolépticas del zumo de uva (sabor, aroma y color) durante un periodo de conservación de 60 días en refrigeración.

#### **1. 4. OBJETIVOS ESPECIFICOS EN EL ESTUDIO DE APTITUD A LA VINIFICACIÓN DE ZUMOS DE UVA TRATADOS POR ALTAS PRESIONES Y OBTENIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE CLARIFICACIÓN**

- **Estudiar la cinética de fermentación durante la vinificación de los zumos de uva obtenidos por diferentes métodos de clarificación y tratados por alta presión**

Valorar las condiciones de fermentación mediante medidas de densidad relativa y azúcares solubles de los mostos a 18 °C durante 15 días.

- **Caracterizar los vinos jóvenes mediante análisis físico-químico**

Estudiar la composición de los vinos jóvenes obtenidos a partir de zumos de uva presurizados y compararlos con sus correspondientes vinos controles

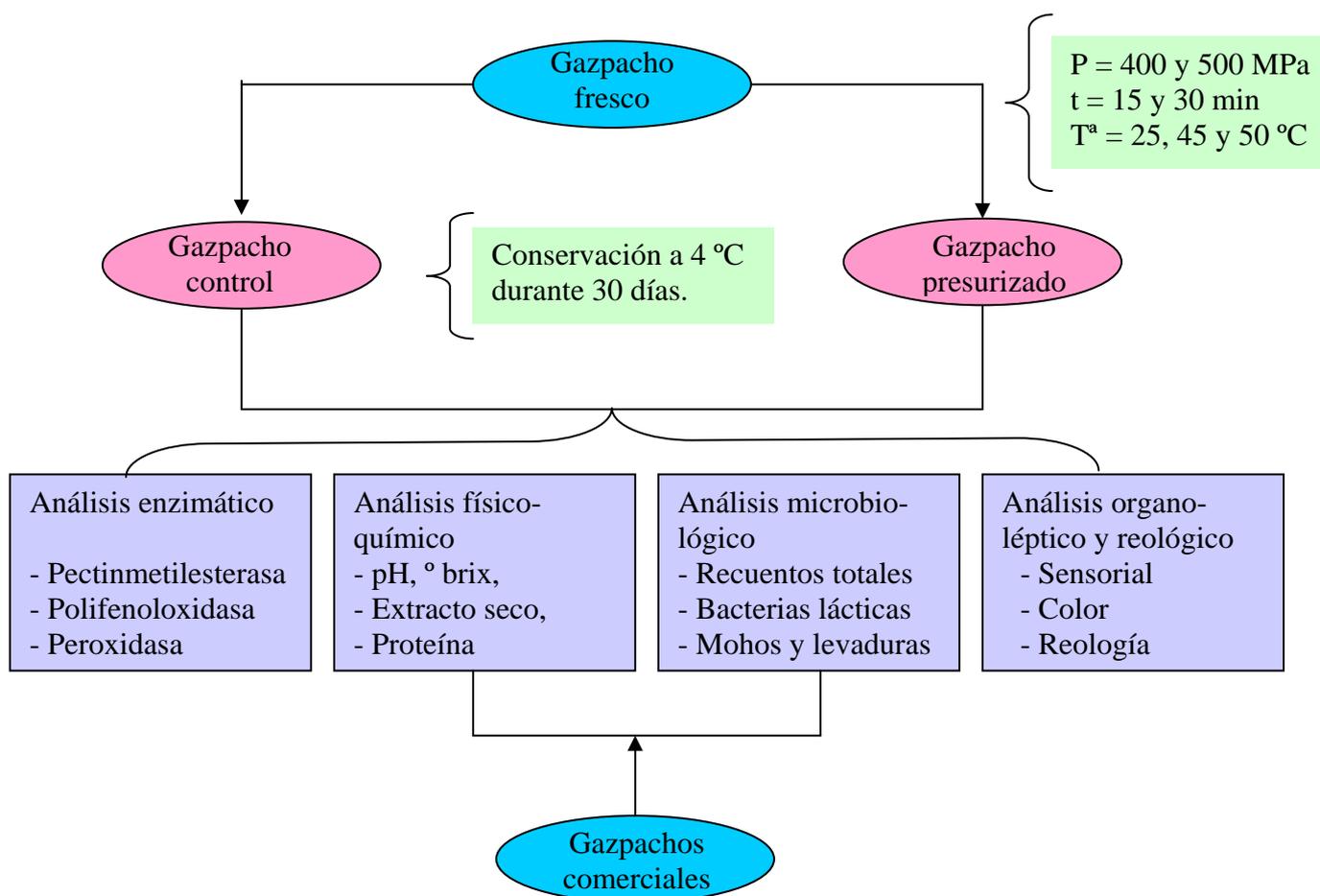
- **Caracterizar los vinos jóvenes mediante análisis organoléptico**

Estudiar el efecto de los zumos de uva presurizados sobre las características organolépticas y de color de los vinos jóvenes.

## 1. 5. PLAN DE TRABAJO

### 1. 5. 1. Gazpacho

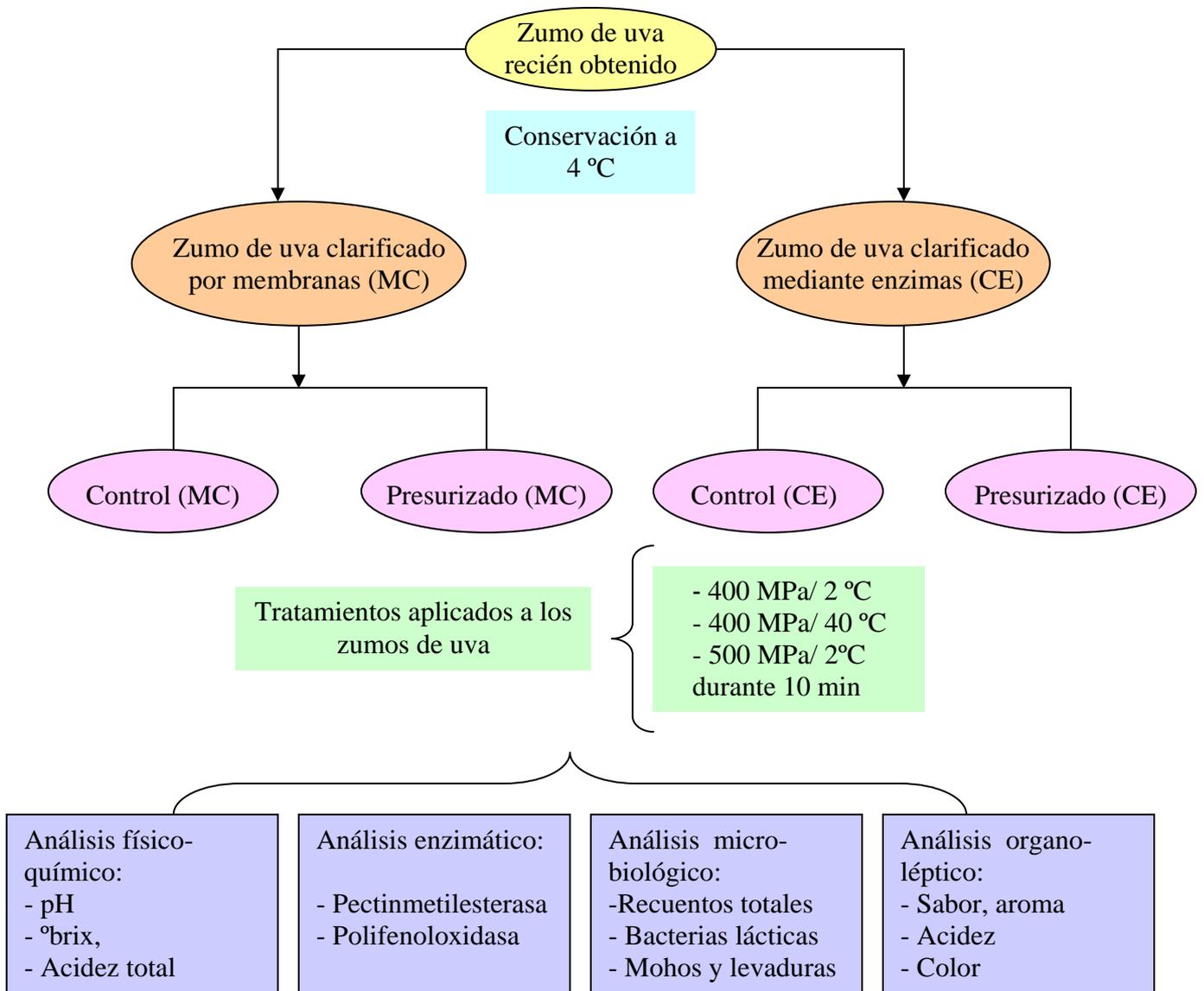
En este trabajo se ha realizado el estudio de un gazpacho fresco preparado en laboratorio a partir de vegetales en su punto óptimo de maduración. Así mismo, se comparó su formulación y tiempo de conservación con dos gazpachos comerciales. La Figura I. 1 muestra el plan de trabajo seguido a la preparación del gazpacho y los análisis realizados para su estudio.



**Figura I. 1.** Plan de trabajo desarrollado en el gazpacho

### 1. 5. 2. Zumo de uva

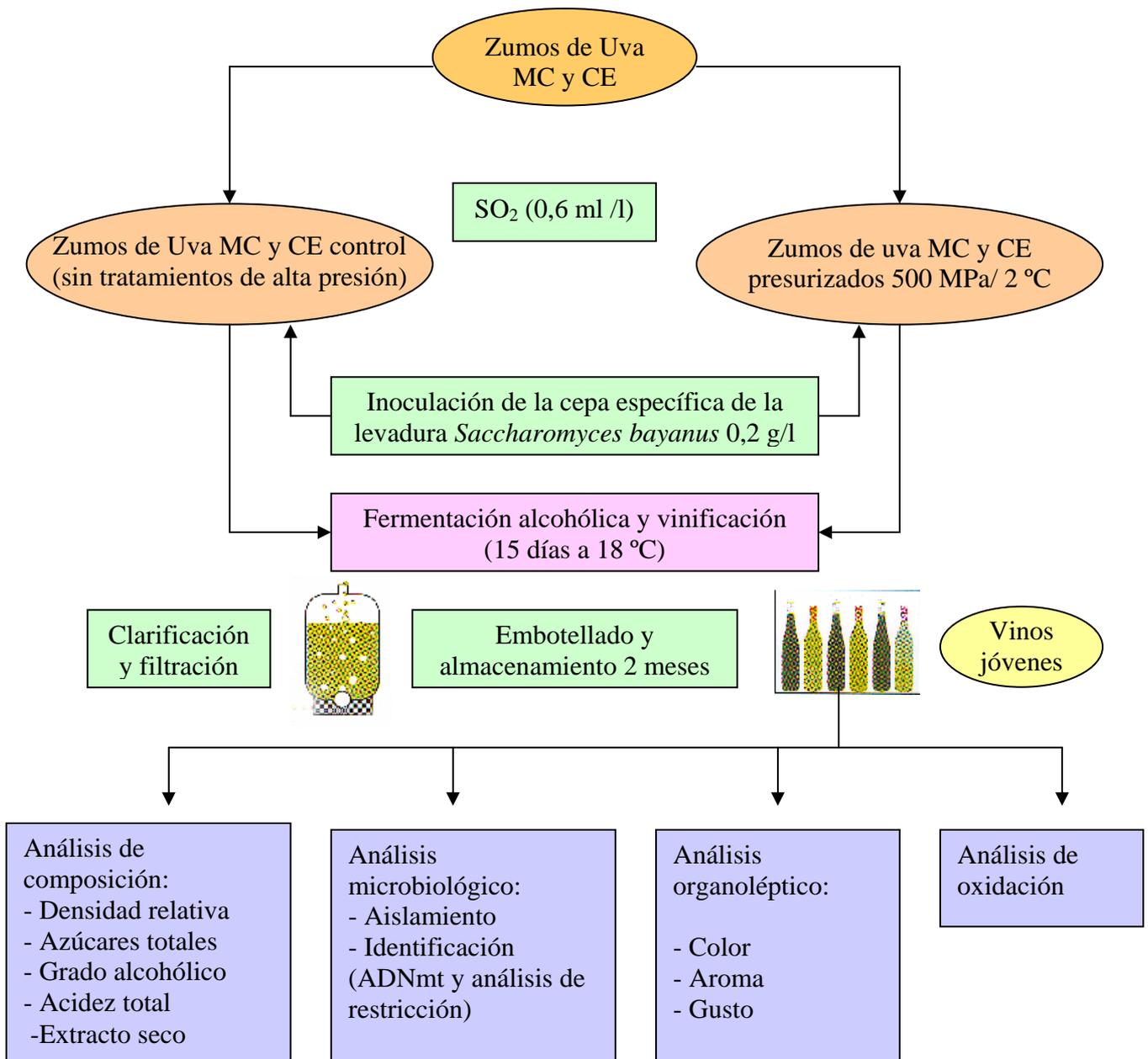
Se partió de un zumo de uva blanca (variedad Parellada) recién obtenido y se emplearon dos métodos diferentes para su clarificación. Para este estudio se realizaron diferentes análisis en los dos lotes de zumo de uva. La Figura I. 2 muestra el plan de trabajo seguido en el análisis y estudio del zumo de uva.



**Figura I. 2.** Plan de trabajo desarrollado en el zumo de uva

### 1. 5. 3. Vinos jóvenes

Los vinos jóvenes fueron obtenidos a partir de zumos de uva MC y CE controles y tratados por altas presiones mediante la inoculación de una cepa de levadura específica. El plan de trabajo seguido para la elaboración de los vinos se muestra en el siguiente diagrama de flujo (Figura I. 3).



**Figura I. 3.** Plan de trabajo desarrollado en el estudio de aptitud a la vinificación del zumo de uva presurizado

## **II. INTRODUCCIÓN**

## 2. 1. LAS ALTAS PRESIONES

### 2. 1. 1. Historia y generalidades

La tecnología de las altas presiones es ampliamente conocida desde hace más de tres décadas en el campo de la ciencia de los materiales inorgánicos, donde se combinan presiones a partir de 100 MPa con temperaturas del orden de 1000 °C, para la producción de cerámicas, aleaciones de metales y la creación de materiales sintéticos (Hoover *et al.*, 1989). Su aplicación en el procesado de los alimentos ha adquirido especial importancia en las dos últimas décadas, si bien su utilidad en este campo ya fue señalada por el grupo de investigadores de Bert H. Hite en el año 1899 (citado por Hoover *et al.*, 1989) a partir de los estudios sobre los efectos de las altas presiones (hasta 1000 MPa) en la conservación de leche, carne y zumos de frutas. Bridgman en el año 1914 (citado por Hoover *et al.*, 1989) estudió el efecto de la alta presión sobre la clara del huevo, observando que, la desnaturalización proteica de la clara del huevo se produce de forma irreversible a partir de 300 MPa y se intensifica con el aumento de la presión y el tiempo de tratamiento.

Durante mucho tiempo, los problemas tecnológicos derivados de la manipulación a tan elevadas presiones supusieron un freno para el desarrollo de la técnica, pero una vez superadas las dificultades gracias a los avances realizados en la industria de materiales, y atendiendo a la creciente demanda de productos seguros, sometidos a un procesado mínimo y libres de aditivos, se ha retomado el interés por la utilización de la alta presión en el procesado de alimentos.

En la década de los ochenta, la Universidad y la industria japonesas apoyadas por el Ministerio de Agricultura, fueron pioneras en el desarrollo de la alta presión para su utilización en la industria alimentaria. En 1992 los primeros productos tratados por alta presión salieron al mercado y a finales de 1995 ya eran 7 las compañías que comercializaban productos (mermeladas, zumos de fruta, salsas, vino de arroz, pastel de arroz) tratados por esta tecnología (Hayashi, 1997). Actualmente se producen a pequeña escala preparados de frutas, confituras de

fresa, kiwi y manzana, salsas, gelatinas, zumos de frutas y calamar crudo. El interés por esta tecnología emergente se extendió a algunos países de Europa. En Francia se comercializan algunos zumos de frutas y en EUA fue lanzada con gran éxito en el mercado una crema de guacamole. En España, Espuña (Olot, Girona) actualmente produce un jamón cocido loncheado y tapas tratados por altas presiones.

Los resultados obtenidos durante los últimos años sobre la inactivación de los microorganismos y enzimas producida por la aplicación de altas presiones, invitan al desarrollo de esta tecnología, debido a su efecto no destructivo del contenido nutricional y de las características sensoriales (Morlid, 1981; Knorr *et al.*, 1992; Farkas, 1986; Hoover *et al.*, 1989; Hayashi, 1989).

## 2. 1. 2. Fundamentos y definiciones

Se entiende por altas presiones, las presiones comprendidas entre 100 y 1000 MPa<sup>1</sup>. Ya que normalmente el medio utilizado para transmitir la presión es el agua, este tratamiento se le conoce como altas presiones hidrostáticas.

Existen dos principios fundamentales en los que se basa la aplicación de las altas presiones (Cheftel, 1991):

a) El primero indica que la presión se transmite de manera uniforme e instantánea a través de todo el material biológico tratado por alta presión, tratándose así de un proceso isostático. Este proceso evita la presencia de zonas sobretratadas, así como la deformación del producto, y hace que éste sea más homogéneo.

b) El segundo se refiere al principio de Le Chatelier que indica que los fenómenos acompañados de una disminución de volumen (reacciones químicas, modificación de las conformaciones moleculares) son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Según este principio, la aplicación de la alta presión

---

<sup>1</sup>1 MPa = 9,869 atm = 10 bar = 10,197 kg/cm<sup>2</sup>

desplaza el equilibrio de un proceso hacia el estado que ocupa menos volumen. En principio en una macromolécula proteica, la formación de enlaces de hidrógeno, la ruptura de interacciones hidrófobas y también de pares de iones, son acompañados de una restricción de volumen favorecida por la presión (Cheftel, 1991). Sin embargo, otros estudios suponen que los puentes de hidrógeno son prácticamente insensibles a la presión (Gross y Jaenicke, 1994; Mozhaev, 1994).

Los efectos de la disociación iónica son favorecidos en general por el fenómeno de electrostricción. Así, la presión causa la separación de las cargas eléctricas, ya que el agua se organiza de manera más compacta alrededor de las cargas iónicas y de los centros polarizados de las moléculas, lo que causa una reducción del volumen total (Cheftel, 1991).

Se ha observado que los enlaces covalentes tienen baja compresibilidad y no se ven afectados por presiones inferiores a 1000-2000 MPa (Hayashi, 1992; Tauscher, 1995). De esta manera la estructura de las biomoléculas de bajo peso molecular (hidratos de carbono, péptidos y lípidos) y la estructura primaria de las moléculas no se ven modificadas (Cheftel, 1992; Mozahev *et al.*, 1994; Heremans, 1995). Es conocido también que diferentes reacciones de Maillard (por ejemplo xilosa-lisina) son reducidas o inhibidas bajo presión (Cheftel, 1995). La alta presión también contribuye a la disociación de los grupos ácidos de las cadenas laterales de los aminoácidos y a la ruptura de los puentes salinos intramoleculares (Cheftel, 1992; Heremans, 1995).

El tratamiento de alta presión puede ser combinado con otros tipos de tratamientos para aumentar la inactivación microbiana, y sobre todo enzimática, sin alterar la calidad organoléptica del producto (Farr, 1990). Por ejemplo el uso de temperaturas moderadas se considera un tratamiento apropiado para combinar con la alta presión.

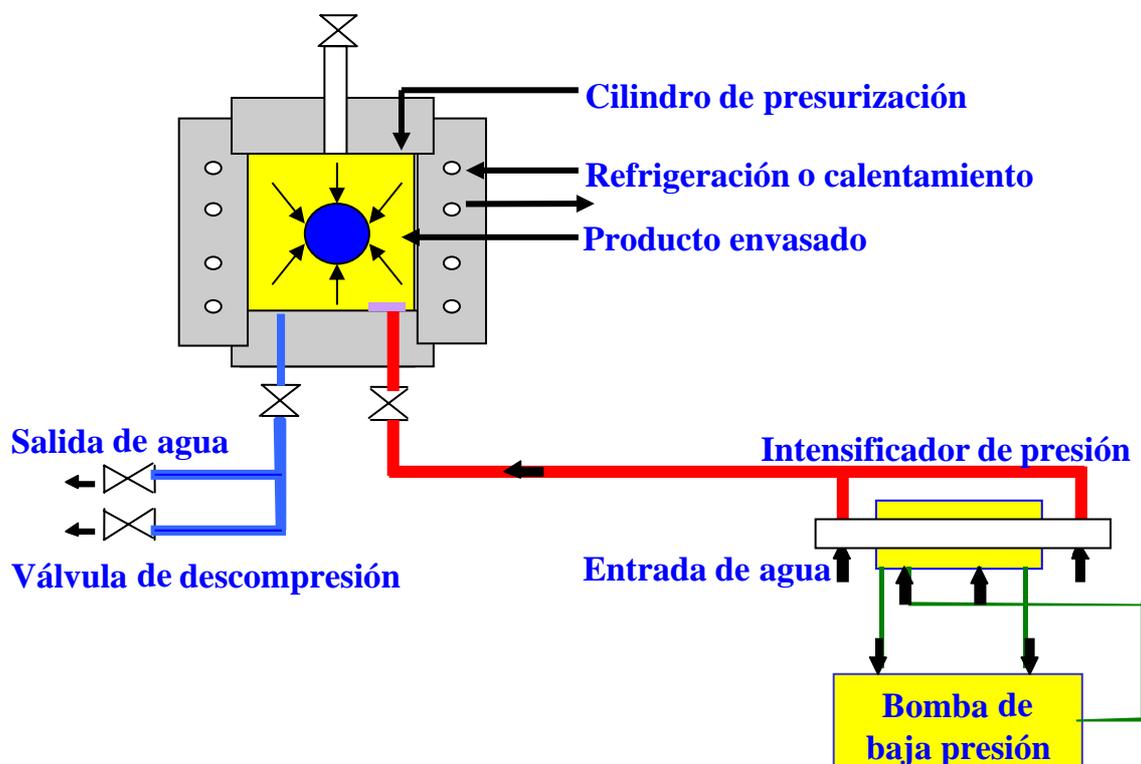
El comportamiento de la alta presión sobre diferentes sistemas alimentarios demuestra la utilidad de la aplicación de esta técnica en la conservación de los alimentos, que además de extender su vida útil, y mejorar la textura, mantiene el sabor, el aroma, las vitaminas y otros nutrientes naturales en muchos productos (Cheftel, 1991; Bognár *et al.*, 1993 y Takahashi *et al.*, 1993).

En este contexto se podría decir que es un proceso destinado a la producción de alimentos de alta calidad.

## 2. 2. EQUIPOS DE TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN

El tratamiento de alta presión se puede realizar en dos tipos de equipos en función del producto a tratar; normalmente se utiliza el tipo discontinuo para productos líquidos o sólidos ya envasados, y el tipo semicontinuo para líquidos no envasados.

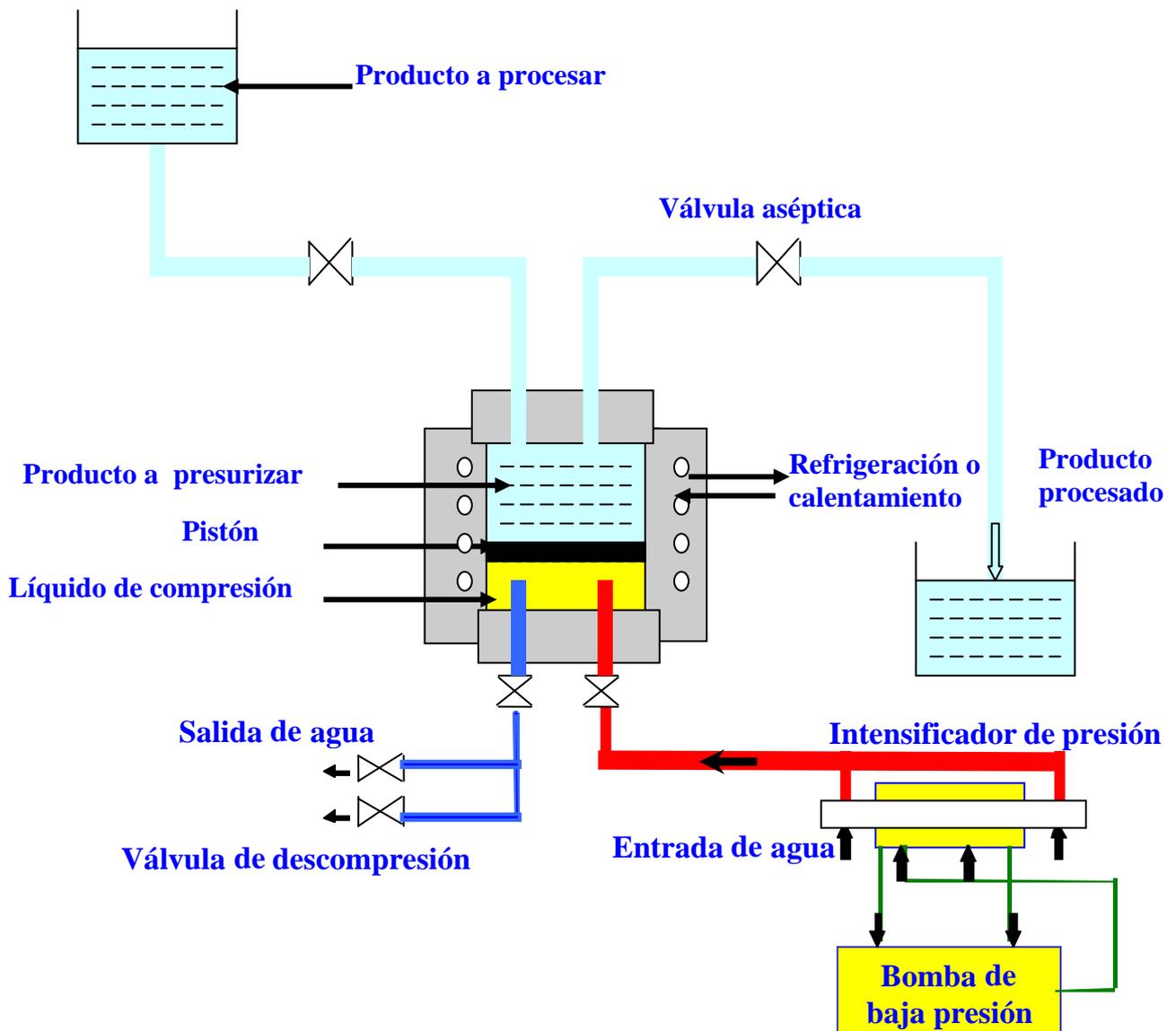
Los equipos de alta presión discontinuos consisten en un cilindro de acero inoxidable con una pared gruesa y resistente que contiene en su interior el líquido de compresión (agua o una mezcla de agua y aceite). Este líquido es impulsado desde un depósito de agua hasta el recipiente de tratamiento (Figura II. 1).



**Figura II. 1.** Sistema discontinuo para el tratamiento de alta presión de alimentos envasados.

El producto ya envasado se introduce dentro del cilindro, y una vez se realiza la carga, un par de bombas inyectan agua dentro del cilindro hasta alcanzar la presión adecuada, manteniendo la presión durante el tiempo necesario para el tratamiento, y pasar finalmente a la descompresión.

Los equipos de tipo semicontinuo son utilizados con productos alimentarios que pueden ser bombeados (Figura II. 2).



**Figura II. 2.** Sistema semicontinuo para el tratamiento de productos líquidos a granel.

La compresión, de tipo directa, es generada mediante la presurización de un medio sobre la parte final de un pistón. En este caso el alimento está en contacto directo con el acero de la cámara, así que éste debe ser de un material que no experimente corrosión durante su utilización y que sea adecuado para entrar en contacto con los alimentos. Una bomba presuriza el agua, que se encuentra separada del alimento por el pistón. El alimento una vez presurizado se evacua de la cámara utilizando una válvula aséptica de alta presión.

Estos equipos tienen mejor rendimiento volumétrico y mejor aprovechamiento de la energía utilizada, con el inconveniente de un coste inicial mayor. El coste por volumen de alimento tratado disminuye en gran medida al utilizar máquinas con cilindros de elevado volumen. El primer equipo semicontinuo de altas presiones con una capacidad de 4 tm/h fue introducido por Wakayma Nokoyo Food Industry Co. Ltd. en Japón.

## **2. 3. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS CONSTITUYENTES DE LOS ALIMENTOS**

### **2. 3. 1. Agua**

La presión modifica muchas propiedades del agua. El volumen del agua disminuye un 4 % a 100 MPa y un 15 % a 600 MPa a una temperatura de 22 °C (Cheftel, 1992). Los alimentos con alta humedad y poco gas reaccionan a una compresión similar a la del agua. Esta disminución de volumen implica un aumento de la densidad y, como consecuencia, los coeficientes de difusión de los solutos disminuyen.

La compresión adiabática del agua causa un aumento de 2 a 3 °C por cada 100 MPa, aumento que depende de la temperatura inicial del agua y de la velocidad de compresión. Este cambio es reversible cuando se realiza la descompresión ya que se produce una disminución de la temperatura de la misma magnitud (Cheftel y Culioli, 1997).

El punto de fusión del agua disminuye con el incremento de la presión: es de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 70 MPa y  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 200 MPa. A presiones superiores a 1000 MPa y a temperatura ambiente se produce formación de hielo.

El pH del agua también disminuye bajo presión, pasando de 7 a 6,27 cuando la presión aumenta de 0,1 MPa a 1000 MPa.

La presión tiene un efecto importante sobre las fases de transición del agua (cristalización–fusión) que puede mantenerse en estado líquido a  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta una presión de 210 MPa. En general los cristales de hielo que se forman bajo presión, son de tamaño inferior a los formados convencionalmente por la congelación. En estas condiciones se produce menos pérdida de agua, una estructura más homogénea y sobre todo un producto de mejor textura (Deuchi y Hayashi, 1992; Cheftel y Culioli, 1997; Fuchigami y Teramoto, 1997; Fuchigami *et al.*, 1997 y 1998). Estas observaciones tienen algunas consecuencias prácticas sobre todo en el campo de la tecnología de los alimentos congelados y el almacenaje de alimentos a temperaturas de congelación sin llegar a congelarlos (Cheftel, 1992). Otra aplicación práctica es la descongelación de muestras biológicas bajo presión a bajas temperaturas (entre  $-20$  y  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), siendo la descongelación rápida y uniforme.

### **2. 3. 2. Lípidos**

La temperatura de fusión de los lípidos, en especial de los triglicéridos, aumenta con la presión de manera reversible en más de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por cada 100 MPa. Por este motivo, los lípidos en estado líquido a temperatura ambiente pueden cristalizar bajo presión. La presión causa la formación de cristales densos y más estables que tienen un nivel de baja energía y alta temperatura de fusión. Esto puede explicar algunas de las causas de destrucción de los microorganismos por la presión debido a los cambios cristalinos en los fosfolípidos de la membrana celular (Cheftel, 1995).

El aumento de la presión puede producir un aumento de la oxidación de los lípidos insaturados del alimento. Se ha observado que el tratamiento de alta presión en alimentos de alto contenido proteico como la carne y pescado produce un incremento de la oxidación lipídica. Se cree que este aumento de oxidación está relacionado con la desnaturalización de las proteínas causada por la presión, quedando libres iones metálicos que catalizarían la oxidación lipídica (Beltrán *et al.*, 2002).

### **2. 3. 3. Hidratos de carbono**

A pesar de los pocos trabajos que existen sobre el efecto de la alta presión sobre los hidratos de carbono, los autores coinciden en afirmar que los azúcares simples no resultan afectados por este tratamiento (Cheftel, 1992). Las reacciones de condensación de Maillard son inhibidas por la aplicación de la alta presión entre 50 y 200 MPa (Sangronis *et al.*, 1997). En consecuencia el desarrollo del sabor y del color típicos de esta reacción no se producen.

La alta presión afecta la transición sol-gel de los polisacáridos, formándose geles diferentes a los obtenidos por aplicación de calor (Gekko, 1992; Mozahev *et al.*, 1994). En cuando a los granos de almidón, éstos gelatinizan bajo presión a temperaturas más bajas de las habituales (Hayashi y Hayashida, 1989). Rubens *et al.* (1997) observaron que los almidones se inflaban bajo presión pero su estructura no se veía modificada.

### **2. 3. 4. Proteínas**

Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto de la presión sobre la estructura y las propiedades funcionales de las proteínas (Gross y Jaenicke, 1994; Mozahev *et al.*, 1994; Cheftel, 1995). En ellos se concluye, de forma general, que las modificaciones de las proteínas se deben a cambios en las interacciones intra e intermoleculares entre grupos funcionales de los aminoácidos. Ohmiya *et al.*

(1989) resaltan efectos como el aumento de las interacciones hidrofóbicas a presiones de 300 y 400 MPa, debido a la alta compresibilidad del agua libre comparada con la de los puentes de hidrógeno. Por otra parte, los grupos sulfhidrilo pueden oxidarse dando lugar a puentes disulfuro en presencia de oxígeno (Funtenberger *et al.*, 1995), aunque en muchos casos parece que este tipo de enlaces son los responsables de mantener la estructura de algunas proteínas debido a su gran estabilidad frente a la presión (Balny y Masson, 1993). En general, la aplicación de presiones superiores a 100-200 MPa a temperatura ambiente, provocan la disociación de macroestructuras en subunidades, así como, el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares, según el caso. Por otra parte, cuando la presión y concentración proteica es elevada, las interacciones antes mencionadas, causadas por las altas presiones, conducen a agregaciones y gelificaciones de los sistemas biológicos. En general, los efectos que sufren las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas pueden ser reversibles, aunque dependiendo de factores como la temperatura, pH y otros, pueden tener lugar de forma irreversible (Heremans, 1995; Cheftel, 1995).

A pesar de los aspectos generales mencionados anteriormente, existen otros factores, como la temperatura y composición del medio, que pueden hacer variar considerablemente los resultados de la aplicación de las altas presiones (Kunugi y Tanaka, 1997).

Diversos estudios han mostrado que los geles formados bajo presión a partir de proteínas como la clara del huevo, actomiosina y las proteínas de la soja, son muy diferentes de los geles obtenidos por calor, en relación a las características físico-químicas y morfológicas. Los geles producidos bajo presión son menos firmes pero más elásticos y extensibles, lisos y brillantes (Denda y Hayashi, 1992; Yoshika *et al.*, 1992, Tausher, 1995), y el color y el aroma iniciales se conservan mejor que en los geles obtenidos por altas temperaturas (Cheftel, 1992).

### 2. 3. 5. Enzimas

Las enzimas son catalizadores complejos constituidos por proteínas globulares que aceleran la velocidad de las reacciones químicas. Los mecanismos por los cuales la alta presión afecta a las enzimas son similares a los descritos para las proteínas.

La alta presión induce cambios en la velocidad de las reacciones que catalizan las enzimas, así como cambios estructurales (Balny y Masson, 1993). La función enzimática puede verse afectada de diversas maneras; la inactivación puede ser parcial o total, reversible o irreversible dependiendo del tipo de enzima, del nivel de presión, del tiempo y de la temperatura o del pH del medio (Morild, 1981; Hara *et al.*, 1990). Sin embargo, también se ha descrito la activación de algunas enzimas por efecto de la alta presión (Anese *et al.*, 1995; Cano *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que la eficiencia de la alta presión en la inactivación de enzimas se puede incrementar mediante la aplicación de ciclos de presión. Se trata de aplicaciones sucesivas de altas presiones produciendo una mayor inactivación enzimática y una menor actividad residual que la obtenida después de la aplicación de un proceso de presión continuo durante el mismo tiempo total del tratamiento (Basak y Ramaswamy, 2001).

En un trabajo realizado por Seyderhelm *et al.* (1996) sobre el efecto de alta presión sobre algunas enzimas en tampón fosfato, observaron que la sensibilidad a la presión en orden ascendente fue: lipoxigenasa, lactoperoxidasa, pectinesterasa, lipasa, fosfatasa, catalasa, polifenoloxidasa y peroxidasa. El aumento en la temperatura del tratamiento indujo una mayor inactivación de estas enzimas.

Algunas enzimas son baroresistentes y su función no se ve alterada por la alta presión. Así, Asaka y Hayashi (1991) y Ko *et al.* (1990) no observaron fenómenos de desnaturalización de la ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  al ser tratada por alta presión. También observaron un efecto baroprotector tanto por parte de los componentes del alimento, así como de algunos ingredientes sobre diversas enzimas estudiadas.

Por otra parte la alta presión podría afectar a nivel de la interacción sustrato-enzima. Si el sustrato es una macromolécula, la alta presión podría modificar la conformación de la macromolécula o su disociación en subunidades afectando su actividad que haría más fácil o difícil el ataque del enzima (Balny y Masson, 1993).

Enzimas como la pectinmetilesterasa, la polifenoloxidasas y la peroxidasa son muy resistentes a la presión (Cheftel, 1995). Estas enzimas las podemos encontrar frecuentemente en los vegetales y frutas. Ya que parte del trabajo se dedica a estudiar estas enzimas, es oportuno dedicarles un espacio en esta introducción.

- ***Las pectinmetilesterasas***

Las pectinas son heteropolisacáridos estructurales que se encuentran en las paredes o membranas de las células primarias de la mayoría de las plantas superiores, y contienen grandes proporciones de ácido  $\alpha$ -1,4-D-galacturónico parcialmente esterificado con grupos metilo.

Las pectinmetilesterasas (PME; EC 3.1.1.11) forman un complejo con las pectinas mediante interacciones electrostáticas. Durante la extracción de los zumos, los enzimas liberados actúan sobre las pectinas hidrolizando los grupos del éster metílico formando metanol, pectinas de bajo metoxilo y ácido galacturónico.

La PME es la enzima principal responsable del problema común asociado a los zumos cítricos y zumos vegetales, sobre todo los productos derivados del tomate (frescos, congelados, concentrados), causándoles pérdida de turbidez, gelificación, así como pérdida de consistencia en algunos casos (Joyslyn y Pilnik, 1961). La proporción de pectinas disueltas en el producto contribuye a la viscosidad y al cuerpo del mismo. La viscosidad depende de la concentración, del grado de la polimerización de las pectinas, del pH y de las sales existentes en el medio.

Actualmente los tratamientos de estabilización térmica que se aplican sobre productos durante su transformación permiten detener este proceso enzimático. La pasteurización alta (90 °C, 1 min) es el método convencional utilizado para la inactivación de la PME en diferentes productos (Eagerman y Rouse, 1976). Sin embargo, este tratamiento afecta negativamente la calidad de los zumos modificando sus características organolépticas y nutricionales (Reynold, 1963).

Numerosos trabajos han estudiado la aplicación de las altas presiones como proceso tecnológico alternativo a los tratamientos térmicos para la inactivación de la PME y la conservación de los zumos de cítricos, sopas vegetales y productos derivados del tomate (Ogawa *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1993; Porretta *et al.*, 1995; Hernández y Cano, 1998; Tangwongchai *et al.*, 2000).

La inactivación total de la PME en zumos de cítricos por alta presión requiere un tiempo de 10 min a 1000 MPa a temperatura ambiente, o el uso de temperaturas moderadas (50 °C) a 600 MPa durante 10 min (Ogawa *et al.*, 1990). Basak y Ramaswamy (1996) investigaron la inactivación de la PME en zumo de naranja fresco, concentrado y congelado, aplicando presiones de 100 a 400 MPa en un intervalo de tiempo de 0 a 720 min. El zumo (12,6 °Brix) fue ajustado a pH 3,2 y 3,7, y el zumo concentrado fue ajustado a 10, 20, 30 y 40 °Brix a pH 3,7, además le fue añadido una PME (enzima purificada de origen no especificado), después de sufrir un tratamiento térmico previo para inactivar enzimas endógenas. Los autores detectaron dos tipos de efectos de inactivación enzimática, el primero lo denominaron “muerte instantánea” y dependía directamente de la presión aplicada. Este efecto aumentaba proporcionalmente con el aumento de la presión. Mientras que el segundo dependía del tiempo del tratamiento; la inactivación era proporcional al aumento del tiempo de tratamiento. Por otra parte, los autores observaron que la inactivación fue más alta a pH bajo y que la inactivación de la PME está claramente influenciada por los sólidos solubles en el zumo concentrado. En este sentido, el aumento de los sólidos solubles en el zumo tuvo un efecto protector de la PME contra la presión. Marshall *et al.* (1985) observaron que la PME es muy resistente a la presión cuando se encuentra bajo altas

concentraciones de azúcares, como es el caso de zumos de frutas concentrados (60-65 °Brix).

Seyderhelm *et al.* (1996) estudiaron la inactivación por alta presión de la PME (enzima purificada de origen no especificado) en tampón tris-(hidroximetil)-amino-metano (pH 7) a 45 °C, observando que tratamientos a 900 MPa durante 2 min y a 800 MPa durante 5 min, permitían su inactivación total.

Ogawa *et al.* (1990) mostró que los tratamientos de presión a 600 MPa durante 10 min son capaces de inactivar parcialmente e irreversiblemente hasta el 90% de la PME en zumo de naranja. El zumo se mostró más estable durante el almacenamiento y el transporte en refrigeración. Irwe y Olsson (1994) confirmaron estos mismos resultados. Otro estudio realizado por Goodner *et al.* (1999) sobre la estabilidad de zumo de naranja, también confirmó los resultados comentados anteriormente, mostrando además que los tratamientos a 800-900 MPa durante tiempos ultracortos son muy efectivos en la estabilización del zumo. Así, un tratamiento de estas características aplicado durante 1 s, mantuvo estable el zumo durante 80 días, mientras que tratamientos más largos (1-10 min) lo mantuvieron estable durante 90 días a temperaturas de refrigeración (4 °C).

Los trabajos existentes sobre el efecto de las altas presiones sobre la PME de los productos derivados del tomate indican que esta enzima es muy resistente a la presión. Crelier *et al.* (1995) observaron que la PME del tomate es muy baroresistente. Esta enzima fue menos estable bajo presión en presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  o en tampón acético-acetato (pH 3,5-4,5) que en agua, y su estabilidad bajo presión se incrementó con el aumento del pH. La inactivación de la PME del tomate también se produce a bajas presiones y temperaturas moderadas (59-60 °C). Tongwongchai *et al.* (2000) mostró que la PME (enzima purificada de origen no especificado) fue muy barotolerante a todos los valores de pH estudiados (4-9), perdiendo el 10, 20 y 40 % de su actividad después de tratamientos de 200, 400 y 600 MPa, respectivamente durante 20 min. Este estudio indica que no hubo efecto del pH en la interacción presión y pH, y que la inactivación se debe únicamente a la presión aplicada. Sin embargo, Hernández y Cano (1998) indicaron que la actividad PME del puré de tomate presurizado a 150 MPa a 30 °C durante 15 min se redujo en un 35 % de su actividad inicial.

- ***Las polifenoloxidasas***

Las polifenoloxidasas (PFO; EC 1.14.18.1) son muy abundantes en el reino vegetal y existen bajo muchas formas, siendo responsables de numerosas reacciones químicas que provocan el pardeamiento de vegetales, produciendo por lo tanto el deterioro del color y también del sabor de algunos alimentos (Gomes y Ledward, 1996).

Se han utilizado diferentes métodos para inhibir las reacciones de deterioro de las PFO en los alimentos de origen vegetal, como la exclusión de oxígeno (Berk, 1976) o también la adición de antioxidantes como el ácido ascórbico o dióxido de sulfuro (Golan-Goldhirsh y Whitaker, 1984) que son utilizados en diferentes países como aditivos en la industria alimentaria. La inactivación de esta enzima también puede ser llevada a cabo por tratamientos térmicos (Schwimmer, 1981).

Se han realizado diversos estudios sobre la inactivación de la PFO por altas presiones en diferentes tipos de alimentos de origen vegetal. Asaka y Hayashi (1991) observaron un incremento de la actividad enzimática de la PFO de una variedad de pera sometida a tratamientos de altas presiones entre 200-500 MPa, mientras que otros estudios realizados por Knorr (1994) mostraron que tratamientos de presión de 100 y 400 MPa llevaron a una disminución de la actividad enzimática de la PFO en las patatas.

La estabilidad de las PFOs de la manzana, pera, aguacate, ciruela y también de uva ha sido determinada a pH 6-7 por Weemaes *et al.* (1998). La estabilidad bajo presión de estas PFOs varió en función de su origen. La inactivación de la PFO de la manzana, de la uva, del aguacate y de la pera a temperatura ambiente fue intensa a 600, 700, 800 y 900 MPa respectivamente, sin embargo la PFO de la ciruela no fue inactivada a temperatura ambiente a 900 MPa. La actividad de la PFO de cebolla mostró un aumento del 30 % después de un tratamiento a 600 MPa durante 10 min a temperatura ambiente (Butz *et al.*, 1994). La PFO del zumo de uva blanca fue parcialmente inactivada por tratamientos de alta presión entre 300 y 600 MPa, aunque la aplicación de

presiones más altas (900 MPa) redujo la actividad de la PFO entre 1 y 16 % (Castellari *et al.*, 1997).

Estos estudios muestran que la PFO es una enzima difícil de inactivar por completo a temperatura ambiente. Según Eshtiaghi (1994) sólo un tratamiento de 900 MPa a 45 °C durante 30 min, podría inactivar por completo la PFO de las patatas en tampón fosfato a pH 7.

- ***Las peroxidasas***

Las peroxidasas (POD; EC 1.11.1.7) se encuentran en una gran gama de alimentos. Su presencia en los alimentos de origen vegetal es importante tanto para el industrial como para el consumidor debido a su elevada estabilidad térmica y a su capacidad para catalizar la oxidación de numerosas sustancias orgánicas, produciendo cambios negativos en el sabor y el color, así como la textura de muchos alimentos, especialmente vegetales y frutas durante el almacenamiento (Haard y Tobin, 1971). La POD es una enzima de las más termoresistentes de las presentes en los vegetales, y se utiliza como guía en la optimización del proceso de escaldado en muchos productos vegetales.

Se ha estudiado la termoestabilidad de esta enzima en cítricos y otros productos vegetales, en los que su actividad está relacionada con alteraciones en su aroma, color y textura (Burnette, 1977; Haard, 1977). Los tratamientos térmicos de corta duración y temperaturas relativamente elevadas, que son normalmente utilizados en el procesado comercial de zumos de frutas y otros vegetales para la destrucción de las bacterias, no son efectivos en la inactivación de las peroxidasas. Además de su alta termoestabilidad, se ha encontrado que algunas peroxidasas son capaces de regenerarse después del tratamiento térmico.

En cuanto a los tratamientos de alta presión, Anese *et al.* (1995) observaron que la POD es muy resistente a presiones menores de 900 MPa aplicados durante 1 min, y que mostró una activación durante el tratamiento entre 300 y 500 MPa. La inactivación total fue obtenida solamente a 900 MPa. En un trabajo realizado por Cano *et al.* (1997) sobre el efecto de la alta presión sobre la

POD de puré de fresa y de zumo de naranja, mostraron que esta enzima puede ser inactivada a presiones superiores a 300 MPa con aplicación de temperaturas relativamente elevadas ( $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

En el caso de las judías verdes, son necesarios tratamientos de 900 MPa durante 10 min a temperatura ambiente, para obtener una reducción del 88 % de la actividad POD. Tratamientos combinados de presión y temperatura (moderada-alta) produjeron la inactivación total de la POD a 600 MPa (Hendriks *et al.*, 1998). Quaglia *et al.* (1996) indicaron que el aumento del tiempo de tratamiento muestra un efecto significativo en la inactivación de la POD.

### 2. 3. 6. Vitaminas

El efecto de las altas presiones sobre la estabilidad de las vitaminas ha sido uno de los estudios que más interés ha suscitado entre los diferentes autores que evalúan este proceso en comparación a los tratamientos térmicos (Horie *et al.*, 1992; Mertens, 1993; Bognár *et al.*, 1993; Kübel *et al.*, 1997 y Taukis *et al.*, 1998). En un trabajo de Sancho *et al.* (1999) sobre el efecto de la alta presión sobre las vitaminas hidrosolubles B1, B6 y C diluidas en tampón a pH 6,7, mostraron que los tratamientos de 200, 400 y 600 MPa durante 30 min a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  no tuvieron ningún efecto significativo sobre la retención de las vitaminas B1 y B6. Sin embargo la vitamina C fue afectada y mostró un 87,8 % y 88,6 % de retención después del tratamiento de 200 y 600 MPa, respectivamente. En otro estudio sobre el efecto de las altas presiones en la vitamina C de zumos de piña y de pomelo, se observó una ligera degradación de esta vitamina después de un tratamiento a 600 MPa a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 40 min, la cual fue del orden del 15 % y del 26 %, respectivamente (Taukis, 1998). Tauscher (1995) investigó la influencia de la presión (200, 400 y 600 MPa) y de la temperatura (25, 40, 60 y  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sobre la vitamina A disuelta en etanol. En este estudio fueron necesarios tratamientos de 400-600 MPa a todas las temperaturas para inducir una destrucción del retinol.

Según diversos autores (Hayashi, 1989; Kimura *et al.*, 1994), las altas presiones hidrostáticas es el proceso tecnológico que menos afecta a las vitaminas hidrosolubles, lo que contribuye a conservar la calidad nutricional del producto.

#### **2. 4. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LOS MICROORGANISMOS**

Los primeros estudios sobre inactivación de microorganismos por efecto de la presión fueron realizados en Francia por Certes en 1884 y en EUA por Hite entre 1899 y 1914, que investigaron la resistencia a la alta presión de los microorganismos en alimentos (Hoover, 1993).

Las altas presiones inducen cambios de tipo morfológico, bioquímico y genético, que tienen lugar en la membrana y en la parte celular de los microorganismos. Además, provocan cambios en el funcionamiento y la reproducción de los microorganismos (Cheftel, 1992).

Se han observado varios cambios morfológicos de las células bajo el efecto de la presión como la compresión de las vacuolas de gas (Walsby, 1972), la elongación de la célula, la contracción con formación de poros y la modificación del núcleo (Cheftel, 1992).

En cuanto al material genético, éste se ve afectado a nivel de las enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN (Cheftel, 1992). Algunos sistemas enzimáticos de los microorganismos son inhibidos o inactivados por la presión, como es el caso de las deshidrogenasas en *Escherichia coli* a 100 MPa y las carboxilasas de las levaduras a 400 MPa (Chong *et al.*, 1985).

Según Cheftel (1992), la destrucción celular puede ser causada por la inhibición de la ATPasa o por la cristalización en la membrana de fosfolípidos, con cambios irreversibles en la permeabilidad celular y en el intercambio iónico.

La resistencia de los microorganismos a la presión varía considerablemente, y depende de muchos factores, entre ellos: tipo de

microorganismos (familia, especie, cepa) y fase de crecimiento en la que se encuentre, temperatura, presión y tiempo del tratamiento, pH y composición del medio (Patterson *et al.*, 1997; Carlez, 1994).

Las células vegetativas en fase de crecimiento son más sensibles a la presión que las células vegetativas en fase latente (Mackey *et al.*, 1995). Las células en fase latente son esféricas y más pequeñas que las que están en la fase de crecimiento; además, la acumulación de componentes como las proteínas y los carbohidratos, podría reducir el efecto de la presión en las células en fase latente (Isaacs y Chilton, 1995). Las bacterias gram positivas, en general, son más resistentes a la presión que las bacterias gram negativas (Earnshaw, 1995). No obstante, en un estudio más reciente, Ludwig y Scherk (1997) no encontraron ninguna relación entre el tipo gram y resistencia a la presión, pero sí con la morfología celular, afirmando que las bacterias más sensibles son las que tienen una forma bacilar y las más resistentes son las que tienen una forma de cocos. Otros autores también han mostrado la gran resistencia de los cocos a las altas presiones (Earnshaw, 1995; Patterson *et al.*, 1995; Patterson y Kilpatrick, 1998).

Las levaduras y los hongos son microorganismos muy sensibles a la presión inactivándose a presiones de 200-300 MPa (Cheftel, 1995), mientras que las esporas son muy resistentes y pueden sobrevivir a presiones muy elevadas (>1000 MPa) (Sale y Gould, 1970).

Aunque las esporas son altamente resistentes a las altas presiones, éstas pueden ser germinadas bajo presión. Este proceso lleva a la aparición de células vegetativas que son más sensibles a la presión y a otros métodos de inactivación (Earnshaw, 1996). Presiones de 50-300 MPa son suficientes para producir la germinación de las esporas (Sale *et al.*, 1970; Wuytack *et al.*, 1997).

En general para inactivar las células vegetativas es necesario aplicar presiones superiores a 200 MPa. Para la inactivación de la mayoría de las bacterias gram positivas se necesitan tratamientos de 500-600 MPa a 25 °C durante 10 min, mientras que las gram negativas se inactivan con tratamientos de 300-400 MPa a 20 °C durante 10 min (Trujillo *et al.*, 1997).

Los virus son muy heterogéneos y su resistencia a la presión varía considerablemente según el tipo. Los virus ADN-proteína como los bacteriófagos, son considerablemente reducidos a presiones de 300-400 MPa (Brauch *et al.*, 1990). El virus del VIH necesita un tratamiento de 10 min a 400-600 MPa para su inactivación (Otake *et al.*, 1997). Algunos autores han comprobado que el virus inactivado por altas presiones conserva sus propiedades inmunogénicas, hecho que posibilitaría la obtención de vacunas con este tratamiento (Silva *et al.*, 1992; Pontes *et al.*, 1997).

Por lo que respecta a los parásitos presentes en diversas carnes y pescados, como la triquina, la tenia y los nematodos, se conoce que son inactivados mediante altas presiones (Cheftel, 1992).

## **2. 5. APLICACIONES DE LAS ALTAS PRESIONES EN ALIMENTOS**

El principal interés de la aplicación de las altas presiones en los alimentos se centra esencialmente en su capacidad de introducir cambios positivos en ellos como la mejora de su conservación, textura, etc., sin afectar al sabor, aroma o al valor nutricional del producto original.

### **2. 5. 1. Aplicaciones en zumos de frutas y vegetales**

Gran número de trabajos muestran que es posible estabilizar los productos ácidos como zumos de frutas, productos derivados del tomate, concentrados de zumos de frutas, mermeladas, y confituras por presurización a partir de 300 MPa a temperatura ambiente (Basak y Ramaswamy, 1996; Porretta *et al.*, 1995, Goodner *et al.*, 1998; Goodner *et al.*, 1999; Castellari *et al.*, 2000). La estabilización se produce sin afectar a las características físico-químicas del producto ni a su valor nutricional, especialmente las vitaminas C y A, aunque para conseguir la inactivación de enzimas pectolíticos y polifenoloxidasas, enzimas muy resistentes

a la presión, resulta necesario un tratamiento térmico moderado que acompañe a la presión (Farr, 1990).

Hite en 1914 mostró que el tratamiento de un zumo de frutas a 400 MPa durante 30 min aseguraba su conservación a temperatura ambiente, inactivando levaduras, mohos y bacterias lácticas (citado por Hoover, 1993).

Kimura (1992) utilizó tratamientos de alta presión de 400-600 MPa en la fabricación de mermelada de fresa fresca, permitiendo la conservación del 95 % de la vitamina C contenida en la fresa fresca. Un panel de expertos catadores valoró la confitura preparada bajo presión como de mucha mejor calidad respecto a una mermelada obtenida tradicionalmente mediante los tratamientos térmicos convencionales.

Diversos trabajos han estudiado el efecto de la presión sobre la textura de diferentes productos vegetales y frutas. Fonberg-Broczek (1997) en un trabajo sobre manzanas y fresas procesadas con alta presión, mostró que los análisis sensoriales revelaron una mejor calidad de las frutas, buena consistencia, mejor color y un aroma a frutas frescas, además de una mejor estabilidad microbiológica del producto en refrigeración (3-5 °C). Otro trabajo sobre el efecto de la presión en la textura y las actividades enzimáticas desarrolladas en algunos vegetales, mostró que la viscosidad del zumo de tomate aumentaba considerablemente con la presión, y que las actividades poligalacturonasa, PME y POD fueron afectadas por presiones superiores a 500 MPa (Crelier *et al.*, 1999).

Ogawa *et al.* (1990) estudiaron el efecto de la presión entre 100 y 600 MPa en zumo de mandarina (fresco, concentrado o desacidificado-acidificado) que habían inoculado con diversas especies de levaduras y mohos. Los resultados de este trabajo mostraron que tratamientos de 350 MPa durante 30 min o 400 MPa durante 5 min a temperatura ambiente, permitieron la reducción de la carga microbiana en 5 unidades logarítmicas con respecto a la carga inicial. Goodner *et al.* (1999) consiguió la estabilización microbiológica y enzimática de un zumo de naranja durante 90 días en condiciones de refrigeración tratando a 700 MPa durante 1 min.

### **2. 5. 2. Aplicación de las altas presiones en productos lácteos y derivados**

Se han realizado numerosos estudios relativos a la reducción de la carga microbiana de la leche. Se ha observado que el tratamiento de alta presión es efectivo para retardar la acidificación de la leche reduciendo la población inicial de microorganismos con una eficacia similar a una pasteurización de 72 °C y 15 s (Mussa y Ramaswamy, 1997; Buffa *et al.*, 2001). Otra aplicación importante se centra en la industria de los quesos, donde se ha demostrado que esta tecnología puede tener un gran potencial en este campo. Además de alargar la vida útil del producto fresco (Capellas *et al.*, 1996), se pueden conseguir quesos con mejores características organolépticas y al mismo tiempo se puede obtener una reducción considerable del tiempo de maduración del queso mediante presión (Saldo *et al.*, 2000; O'Reilly *et al.*, 2000). También se ha descrito la fabricación de quesos de alta calidad a partir de la leche presurizada de cabra (Trujillo *et al.*, 1999 a, b).

Diversos estudios han mostrado que la aplicación de altas presiones hidrostáticas a la leche de elaboración de yogur incrementa la elasticidad de los geles obtenidos, en comparación a los elaborados a partir de leche pasteurizada, y por otra parte reduce considerablemente la sinéresis de estos geles ácidos (Ferragut *et al.*, 2000).

### **2. 5. 3. Aplicación de las altas presiones en la carne, la carne de ave y sus derivados**

Además de la considerable mejora microbiológica, común para la mayoría de los alimentos tratados por alta presión, se producen otros efectos de especial interés para la carne, la carne de pollo y sus derivados.

La alta presión rompe la membrana de los lisosomas y, por lo tanto, las proteasas contenidas en ellos se liberan en el citoplasma (Homma *et al.*, 1994). Como consecuencia de la desnaturalización causada por la presión, las proteínas son más sensibles a las proteasas sin que su valor biológico se vea alterado. Esto mejora la digestibilidad y la disponibilidad, además de poder influir de forma

positiva en el aroma y el sabor de la carne (Mertens, 1993; Suzuki et al., 1994). Sin embargo, la carne y los productos cárnicos no curados tratados por alta presión son más pálidos (Cheftel y Culioli, 1997).

En general el tratamiento por alta presión aumenta y alarga la vida útil en refrigeración de la carne, la carne de pollo y sus derivados. A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento, las aplicaciones más destacadas de la alta presión a temperaturas moderadas en las industrias cárnicas son: por una parte, la elaboración de productos cocidos y, por otra, el tratamiento de productos que han estado manipulados después de su cocción.

Otras aplicaciones de la alta presión de gran interés se han centrado en las carnes recuperadas mecánicamente (Yuste *et al.*, 1999) y en la obtención de carnes reestructuradas y geles (Mandava *et al.*, 1994). Las carnes reestructuradas es un ingrediente habitual en las formulaciones de productos cárnicos y avícolas. Estas carnes poseen óptimas propiedades nutritivas y funcionales, pero contienen también una gran carga microbiana, y es precisamente en este último aspecto donde las altas presiones presentan grandes ventajas frente a otras tecnologías. Por otra parte, la alta presión, a pH y temperatura adecuados, puede aumentar la cohesión entre partículas en productos picados o emulsiones, reduciendo considerablemente la cantidad de NaCl y de polifosfatos añadidos. Los geles obtenidos por alta presión son más uniformes, presentando mejor aspecto, textura, y exudan menos que los obtenidos por calor (Gustin *et al.*, 1997; Rubens *et al.*, 1997).

#### **2. 5. 4. Aplicación de las altas presiones en ovoproductos**

La higienización del huevo líquido mediante altas presiones permite aumentar la temperatura del proceso sin desnaturalizar las proteínas del huevo, asegurando así una mejor calidad microbiológica (Ponce *et al.*, 1998). La presión actúa de manera eficaz en la destrucción de microorganismos patógenos y deteriorantes del huevo líquido, de manera que, en condiciones de refrigeración se puede obtener una vida útil de 30 días después de la aplicación de tratamientos

cíclicos de presión (450 MPa/3 ciclos de 5 min a 20 y 2 °C) en combinación con nisina (5 mg/l). La presión se presenta como una alternativa viable a la pasteurización clásica del huevo líquido.

Una alternativa a los tratamientos térmicos en la obtención de geles de huevo de clara o yema, es la aplicación de altas presiones. Los geles obtenidos bajo presión retienen el color original, son más blandos, brillantes y adhesivos (Cheftel, 1992).

### **2. 5. 5. Aplicación de las altas presiones en pescados y derivados**

En general, el sabor y el aroma después de la aplicación de un tratamiento de alta presión son similares a las del pescado fresco y en algunos casos, como son las ostras, se consiguen incluso mejorar las características organolépticas del producto.

Como en el resto de alimentos, el tratamiento de alta presión produce una disminución de la carga microbiana del pescado alargando su vida útil (Ohshima *et al.*, 1993).

La alta presión es un método efectivo en la obtención de geles de pescado. Los geles de surimi obtenidos mediante alta presión poseen una superficie más lisa y brillante y retienen el aroma del producto crudo, en comparación a los obtenidos por calor (Denda y Hayashi, 1992; Yoshika *et al.*, 1992).

## **2. 6. EL GAZPACHO**

Con el descubrimiento de América, a España llegaron muchos productos desconocidos que muy pronto se incorporarían a la cocina española. Entre los ingredientes nuevos señalamos el tomate, el pimiento, la patata, el cacao, el maíz, y muchos otros. El cultivo del tomate, fue el comienzo de la historia de los platos típicamente andaluces que podemos conocer con el nombre de los gazpachos.

El gazpacho es quizá uno de los platos españoles más universalmente conocidos por los extranjeros. Hoy día, la presencia de la gastronomía española en muchos países, contribuye a hacer del gazpacho una de las sopas frías españolas más conocidas.

La palabra gazpacho es sinónimo de mezclanza, confusión, batiborrillo, revoltijo. Partiendo de unas reglas ambiguas, se realizan mil combinaciones distintas según el lugar, la época, la economía y sobre todo el gusto personal de cada uno.

Etimológicamente, es quizás un derivado mozárabe del prerromano “caspa” (residuo, fragmento) por alusión a los pedazos de pan y verduras que entran a formar parte en el gazpacho.

En los últimos tiempos, el gazpacho ha sido reconocido como uno de los alimentos más representativos de la dieta mediterránea. En efecto, el gazpacho tiene como materia prima una gran variedad de hortalizas, tiene presente todas las vitaminas y multitud de compuestos antioxidantes, es fuente de fibra vegetal o fibra dietética<sup>2</sup> soluble que se encuentra sobre todo en los vegetales e incluye pectinas, gomas, mucílagos, y ciertos tipos de hemicelulosas y polisacáridos de reserva.

El gazpacho tiene un contenido importante en sales minerales y glúcidos, así como una serie de sustancias esenciales de interés fisiológico como los compuestos fenólicos presentes en hortalizas, que en muchos casos contribuyen al color y al sabor que éstas poseen. Los compuestos fenólicos presentes en las plantas poseen acciones farmacológicas y antioxidantes tal como se demuestra al inhibir en ensayos *in vitro* la peroxidación de los lípidos y las lipoxigenasas.

El tomate contiene un componente interesante que es el licopeno, dotado de muy buenas propiedades antioxidantes. Es un compuesto que ha sido muy estudiado últimamente por sus efectos beneficiosos para prevenir el cáncer y algunas enfermedades coronarias. Este vegetal constituye el componente

---

<sup>2</sup> Fibra dietética es un término que hace referencia al total de los polisacáridos de la planta que junto con la lignina son resistentes a la hidrólisis por enzimas digestivas del tracto intestinal del hombre.

predominante del gazpacho. Sin embargo, este producto está expuesto a diferentes alteraciones debido a las enfermedades causadas por la propia microbiota (parásitos y bacterias) que induce cambios radicales en las características y parámetros de calidad de este producto, y esencialmente por las alteraciones enzimáticas que afectan al color, al sabor y sobre todo a la consistencia del tomate y sus productos. El ajo, componente típico del gazpacho dispone de propiedades antibacterianas importantes para la salud. El resto de vegetales, tienen importancia y utilidad en la dieta mediterránea con propiedades de alto beneficio alimenticio. Todos estos ingredientes son bajos en calorías y ricos en fibra alimentaria.

La consistencia de los productos derivados del tomate (gazpacho, zumos de tomate, salsas a base de tomate y *ketchup*) deriva especialmente de su viscosidad y de la capacidad de que su porción sólida permanezca en suspensión a lo largo de la vida útil del producto y evite la sinéresis (separación de la pulpa y suero). Estos parámetros son fundamentales en la calidad de dichos productos.

Existen numerosos procesos tecnológicos que se utilizan para mejorar la consistencia y la calidad de los productos derivados del tomate estabilizando sus fases y evitando la degradación de las pectinas por las enzimas responsables, que son fundamentalmente la PME y la poligalacturonasa. Entre ellos podríamos citar los tratamientos térmicos convencionales, las microondas y el uso de las técnicas de ultrafiltración (Porretta y Leoni, 1990; Porretta *et al.*, 1992).

La sinéresis es el defecto más notable en los productos derivados del tomate, además de las alteraciones microbiológicas y organolépticas que se producen por diversas reacciones enzimáticas como la acción de las PFOs y las PODs que afectan al color y al sabor, oxidando los lípidos presentes en el producto, e incluso modificando su estabilidad. Los procesos tecnológicos generalmente utilizados para evitar estos problemas son numerosos, entre ellos la decantación parcial por centrifugación para eliminar el exceso del suero, y los tratamientos convencionales de pasteurización aplicando altas temperaturas y tiempos cortos para la inactivación de enzimas. Sin embargo, estos tratamientos producen alteraciones organolépticas como variaciones del color y del sabor, y nutricionales como pérdidas de vitamina C y otros nutrientes. Por este motivo, y también debido a la creciente demanda de parte de los consumidores de productos

frescos derivados del tomate y con alta consistencia, actualmente las investigaciones sobre los procesos de conservación de zumos se encaminan hacia otros tipos de tratamientos alternativos a los térmicos. Los más importantes son las altas presiones hidrostáticas (Watanabe *et al.*, 1991; Horie *et al.*, 1992; Oxen y Knorr, 1993), los pulsos eléctricos (Sale y Hamilton, 1967 y 1968; Gasková *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 1996) y la manotermosonicación (Vercet *et al.*, 2002). Estos tratamientos consiguen tanto la inactivación enzimática como la destrucción microbiológica.

Existen pocos trabajos sobre la aplicación de las altas presiones en productos derivados del tomate, centrándose la mayoría de ellos en el estudio del efecto de las altas presiones sobre la calidad del zumo o del puré de tomate.

Porretta (1995) en un estudio sobre los efectos de las altas presiones y la calidad de los zumos de tomate, mostró que este tratamiento es un proceso tecnológico muy eficaz para conseguir una buena estabilidad microbiológica y físico-química del producto, independientemente del pH del producto.

Otros estudios sobre la aplicación de la alta presión en puré de tomate (Hernández y Cano, 1998) mostraron que un tratamiento combinado presión-temperatura de 500 MPa a 60 °C era suficiente para asegurar la estabilización enzimática de la PME, PFO y POD del puré de tomate almacenado en refrigeración. Tangwongchai *et al.* (2000) estudiando el efecto de las altas presiones sobre la textura del tomate y las enzimas responsables de su deterioro (PME y poligalacturonasa), mostraron que la aplicación de presiones hasta 400 MPa causaron modificaciones visibles de la textura del tomate. Sin embargo, presiones superiores a 400 MPa (500 y 600 MPa) produjeron menos daños texturales, siendo estas muestras muy parecidas al control. Estos autores encontraron que la PME del tomate se mostró más barotolerante que la PME comercial purificada del tomate, donde un tratamiento de 600 MPa no llevó a una inactivación total de la enzima. Estos resultados concuerdan con los de Crelier *et al.* (1999), quienes mostraron que la PME del tomate no se vió afectada por un tratamiento de 500 MPa durante 15 min a 60 °C. Estos últimos autores indicaron que la alta presión conduce a la desestructuración del tejido vegetal, lo que hace que el zumo de tomate se muestre más espeso y más consistente.

Más recientemente, Krebbers *et al.* (2003) estudiaron el efecto combinado de los tratamientos de alta presión y térmico sobre la consistencia, viscosidad, color, actividad enzimática y microbiota de un puré de tomate. Los tratamientos de alta presión (300-700 MPa) a temperatura ambiente mejoraron el color y viscosidad del producto en comparación al tratamiento térmico de pasteurización, mientras que la capacidad de retención de agua no fue afectada. Los tratamientos realizados a 700 MPa a temperatura ambiente redujeron los recuentos microbianos hasta el límite de detección, causando por otra parte, la inactivación parcial de la poligalacturonasa y la activación de la PME. Los tratamientos realizados a temperaturas elevadas (>80 °C) a 700 MPa, si bien inactivaron totalmente las enzimas (poligalacturonasa y PME), produjeron un descenso en la viscosidad del producto.

## **2. 7. EL ZUMO DE UVA**

La vid europea (*Vitis vinifera*), un arbusto austero en agua y nutrientes y generoso en fruto, ha sido conocido y apreciado por el hombre desde la remota antigüedad, como fruta por sus buenas características nutritivas, excelente sabor y aroma, como vino resultado de la fermentación alcohólica del zumo de uva, por su valor energético y por sus propiedades organolépticas y euforizantes.

España, tanto por su clima y las características de sus tierras de cultivo como por su secular tradición vitivinícola, se considera uno de los países productores de uva más importantes.

### **2. 7. 1. Aspectos generales de la uva y métodos de clarificación**

La uva es una baya de composición compleja. Cada grano contiene una piel delgada y elástica denominada pericarpio. En la piel encontramos componentes muy importantes como los pigmentos (amarillos y rojos) y diversas

sustancias aromáticas. La piel protege el mesocarpio o pulpa, tejido que representa la mayor proporción del fruto y la parte más utilizable para la elaboración del zumo.

El zumo de uva se obtiene mecánicamente por el estrujado de las bayas. Es un líquido turbio que contiene partículas en suspensión formadas por celulosa y materias pécticas de las paredes celulares. Es de sabor dulce, ligeramente ácido y de aroma agradable, cuyo color generalmente poco intenso, varía del amarillo verdoso al amarillo dorado en las variedades de uva blanca.

Existen diferentes métodos de clarificación del zumo de uva después del estrujado:

- ***Clarificación mediante clarificantes sintéticos y enzimáticos***

Los clarificantes sintéticos ejercen una acción específica sobre los polifenoles del zumo de uva o vino. El tratamiento se efectúa sobre aquellos vinos o zumos de uva que han modificado su color. Ejemplos de clarificantes sintéticos son la polivinilpirrolidona (PVP) y la polivinilpolipirrolidona (PVPP).

Los clarificantes enzimáticos actúan hidrolizando las cadenas moleculares de pectinas y glucanos, que no han podido ser degradadas en procesos anteriores. Estos clarificantes se componen de glucanasas y de enzimas pectolíticas comerciales. Estas últimas son las más importantes debido a su uso común y frecuente en la industria de los zumos de frutas, y de las ventajas que brindan al producto. En enología, los avances tecnológicos de las enzimas pectolíticas comerciales han sido objeto de numerosos estudios. Las enzimas pécticas dan una gran transparencia al zumo (Ough *et al.*, 1975), mejorando el flujo del zumo y facilitando su filtración. También se ha demostrado que estas enzimas influyen posiblemente en el sabor y la calidad de los zumos de uva y vinos (Ough y Berg, 1974).

Ambos coadyuvantes de clarificación representan una eficaz ayuda en la preparación de zumos de uva que se han de clarificar y, someterse a posteriores tratamientos de filtración.

- **Clarificación por microfiltración y ultrafiltración**

La microfiltración y la ultrafiltración son procesos de separación por membrana, y se utilizan en la concentración o la depuración de pequeñas partículas o macromoléculas sin la intervención de los cambios de estado o de altas temperaturas. Dichas separaciones son suaves y permiten la conservación y la integridad de los bio-compuestos. Estas tecnologías son de amplia aplicación en la industria agroalimentaria.

La microfiltración, como técnica, consiste en hacer circular el líquido bajo presión a lo largo de una membrana permeable al solvente, pero impermeable a las partículas que se desean retener. Esta técnica se caracteriza por retener especies cuyo tamaño es del orden de micrón (de 0,2-10  $\mu\text{m}$ ) y un peso molecular superior a 20.000 Da (Brulé *et al.*, 1974) con unos elevados caudales del orden de  $10^2$ - $10^3$  l/h  $\times$  m<sup>2</sup>. La microfiltración se utiliza de forma general en operaciones de clarificación o de fraccionamiento de partículas suspendidas, en los intervalos previamente indicados.

En los procesos de ultrafiltración se retienen especies cuya masa molecular es del orden de  $10^3$ - $10^5$  Da (Brulé *et al.*, 1974), lo que corresponde a un diámetro de moléculas del orden de 10-200 Å o un tamaño molecular de 0,001-0,2  $\mu\text{m}$ . Esta técnica se emplea para concentrar, fraccionar o purificar especies de pequeño tamaño disueltas o en suspensión en un solvente (azúcares, sales insolubles, etc.), reteniendo macromoléculas no ionizables en suspensión (proteínas, grasas y sales insolubles).

Estas técnicas pueden ser utilizadas en la clarificación y esterilización de vinos y zumos de uva, reemplazando todas las filtraciones sucesivas que se están empleando actualmente. Durante la aplicación de estas técnicas, las levaduras y las bacterias serían retenidas por membranas de microfiltración, y los polisacáridos por membranas de ultrafiltración. Sin embargo, pocos trabajos han estudiado la influencia de la microfiltración y de la ultrafiltración sobre la composición de los vinos y zumos de uva, así como sobre su color (Gaillard y Berger, 1984).

Existen otros métodos de clarificación y su uso se puede combinar o complementar con los métodos citados anteriormente, tales como el uso de la bentonita y gel de sílice, la clarificación azul, carbón activo y moléculas orgánicas (albúminas, alginatos, caseínas, gelatinas, etc.).

### **2. 7. 2. Composición del zumo de uva**

Los componentes más importantes del zumo son esencialmente los azúcares y los ácidos orgánicos, siendo variables los contenidos de estos componentes según el estado de madurez y variedad de uva.

- *Azúcares*

El contenido de azúcares es importante tanto por el valor comercial de los zumos de uva como para la elaboración del vino. Los azúcares del zumo de uva se limitan a la glucosa y la fructosa que representan el 95 % de los azúcares totales del zumo de uva. La mayor o menor concentración de azúcares influye en el grado de aceptación sensorial del zumo y en la riqueza alcohólica potencial del vino, al igual que la relación azúcar/acidez que se puede considerar un factor de calidad de primer orden a la hora de evaluar un zumo para su consumo como tal.

- *Ácidos orgánicos*

La acidez de la uva en su estado de madurez se debe principalmente al ácido L-tartárico, ácido característico y típico de este fruto. Se encuentra en gran parte en forma de sal ácida de potasio o bitartrato potásico. Esta sal es poco soluble y precipita con facilidad en el zumo de uva y vino formando vistosos cristales muy característicos, afectando al grado de aceptación sensorial de estos productos. Los ácidos málico y cítrico, aunque son de menor importancia en el

zumo de uva, constituyen conjuntamente con el ácido tartárico el 95 % de los ácidos orgánicos.

- *Enzimas*

Son numerosas las enzimas encontradas en la uva, de las cuales podemos destacar las oxidasas que ejercen su acción sobre muchas sustancias oxidables y, en particular, sobre los polifenoles y la materia colorante. Los polifenoles del zumo de uva son expuestos y están sujetos a una oxidación por la acción de las tirosinasas contenidas de forma natural en la uva, y de la lacasa producida por *Botrytis cinerea*. Las enzimas pectolíticas comprenden una PME que libera alcohol metílico de los grupos carboxílicos metilados de la cadena poligalacturónica, y una poligalacturonasa que escinde la cadena poligalacturónica liberando ácido galacturónico monómero.

### 2. 7. 3. Técnicas de conservación del zumo de uva

La estabilización microbiológica en enología es uno de los problemas más destacados y preocupantes en la conservación de vinos y principalmente de los zumos de uva, debido a su particular composición y sus características físico-químicas y especialmente a su alto contenido en azúcares y su rápida acción fermentativa. Las técnicas de conservación normalmente utilizadas son:

- *El sulfitado*

La adición de agentes químicos como el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), conservador químico clásico de zumos de uva, en dosis del orden de los 1000 mg/l, como antioxidante evitando el pardeamiento químico y enzimático, y como antiséptico evitando la fermentación, se ha mostrado muy útil en enología, y ha permitido conseguir buenos resultados de conservación. Sin embargo el SO<sub>2</sub> es

eficaz solamente bajo su forma libre y puede, en muchos casos, combinarse con otros componentes del vino, lo que lleva a una posible fermentación y una posterior formación de compuestos sulfurosos que pueden alterar el aroma y el sabor de estos productos. Debido a las incertidumbres relativas a la toxicología de  $\text{SO}_2$  y de los sulfitos, es necesaria la investigación de nuevos métodos para la conservación de zumos de uva y vinos.

- *La pasteurización*

La aplicación de 87 °C durante 30 s o de tratamientos térmicos equivalentes con un enfriamiento posterior hasta 15 °C en zumos de uva, permite conseguir un buen control microbiológico así como una inactivación enzimática suficientes para estabilizar el producto. Sin embargo, en el caso de zumos de uva y vinos, así como otras bebidas de frutas refrescantes, estos tratamientos producen cambios negativos en la composición y las características organolépticas (sabor, aroma, color, etc.) del producto.

También se han utilizado otros métodos en la conservación del zumo de uva para poder suministrar un producto de calidad a las instalaciones envasadoras, entre ellos:

- El almacenamiento a bajas temperaturas: la congelación a -18 °C permite conservar la calidad de los zumos de forma muy satisfactoria, pero es un proceso caro.

- La conservación bajo presión de carbónico, conocido por el método de Böhl para el almacenamiento de grandes cantidades de zumos de manzana y de uva, consiste en saturar el producto con dióxido de carbono. Para ello el zumo tiene que estar a una presión de 0,7–0,8 MPa y una temperatura de 15 °C que es la temperatura mínima recomendable para inhibir el desarrollo de las levaduras. Bajo estas condiciones el dióxido de carbono no inactiva enzimas ni inhibe el desarrollo de muchas bacterias, especialmente las lácticas, por lo que los zumos pueden presentar alteraciones organolépticas.

- El almacenamiento aséptico en atmósfera de nitrógeno: el zumo se enfría rápidamente por bombeo a través de un circuito de intercambio térmico, y se almacena, bajo condiciones estériles, en grandes depósitos de acero inoxidable bajo atmósfera de nitrógeno con ligera sobrepresión. El nitrógeno, por ser un gas inerte, se utiliza para sustituir la atmósfera del aire en el espacio de cabeza del depósito y evitar posibles alteraciones del producto por oxidación. Si la temperatura de almacenamiento se sitúa por debajo de 15 °C, se consigue conservar el zumo de uva de forma satisfactoria pero se requiere una vigilancia muy extremada para evitar contaminaciones.

#### **2. 7. 4. Algunas aplicaciones de las altas presiones sobre el zumo de uva**

El creciente interés por la aplicación de las altas presiones sobre productos vegetales y zumos de frutas en los últimos años, ha hecho de esta emergente tecnología una buena alternativa a los tratamientos térmicos y aditivos químicos.

Como se ha indicado anteriormente, la estabilización microbiológica de los zumos de uva y vinos es uno de los grandes problemas en enología, especialmente por las consecuencias organolépticas e higiénicas debidas a los tratamientos térmicos y químicos. La alta presión se ha propuesto también como método de conservación y estabilización microbiológica de vinos y zumos de uva a temperaturas de refrigeración, ambiente o moderada ( $\leq 50$  °C), prolongando su vida útil sin alterar las características organolépticas del producto.

Existen pocos trabajos sobre la aplicación de la alta presión sobre el zumo de uva, centrándose la mayoría de ellos en estudios de estabilidades enzimáticas y microbiológicas de este producto.

Delfini *et al.* (1995) investigaron la estabilización microbiológica y las características organolépticas del zumo de uva (pH 3,0; SO<sub>2</sub> y alcohol etílico totalmente ausentes) tratado por alta presión, y del vino obtenido a partir de este zumo de uva (pH 3,0 y 3,5; 8,22 % alcohol; 64 mg/l de SO<sub>2</sub>). El zumo de uva y el vino fueron inoculados hasta una concentración de 6 log (UFC/ml) de 13 cepas de

levaduras vínicas, y cepas de *Lactobacillus spp.*, *Acetobacter spp.* y *Botrytis cinerea* en forma vegetativa y esporulada. Los resultados mostraron que a 600 MPa los microorganismos habían sido totalmente destruidos en el vino. En el zumo de uva se encontraron algunos *Schizosaccharomyces pombe* vivos. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en el sabor o el olor entre el control y las muestras presurizadas después de 90 días de almacenamiento. Otro trabajo de Lonvaud-Funel *et al.* (1994) mostró que la aplicación de un tratamiento de 300 MPa durante 10 min a temperatura ambiente sobre un vino blanco, dio como resultado la detención total de la fermentación. Todas las levaduras fueron inactivadas por el tratamiento, no detectándose efecto alguno sobre la composición del vino. Tonello *et al.* (1995) mostraron que las levaduras del zumo de uva se inactivaron con tratamientos de 250 MPa, alcanzando una inactivación de 2 log (UFC/ml) con la aplicación de 300 MPa durante 30 s. El mismo tratamiento de presión, pero durante 6 min indujo una inactivación total de 6 log (UFC/ml) de las levaduras.

Castellari *et al.* (2000) estudiaron la estabilidad del color del zumo de uva obtenido a partir de uva blanca, tras la aplicación de alta presión, mostrando que tratamientos de 300 MPa no tuvieron ningún efecto sobre el color del zumo de uva y que tratamientos de 600 y 900 MPa frenaron el pardeamiento enzimático asociado a la oxidación de los compuestos polifenólicos. El análisis sensorial indicó que la alta presión mejora el aroma y el sabor de estos zumos.

En otro trabajo realizado en zumo de uva Moscatel, Amati *et al.* (1996) mostraron que un tratamiento de 900 MPa durante 2 min a temperatura ambiente estabilizó el color del producto durante 22 días. También se obtuvo una buena estabilidad del color con un tratamiento a 600 MPa durante 10 min. Estos tratamientos tuvieron poco efecto sobre la composición del zumo de uva. Sin embargo, para llegar a una inactivación completa de la PFO fue necesario combinar tratamientos de alta presión (900 MPa) con temperaturas moderadas (40-50 °C).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. 1. EL GAZPACHO

#### 3. 1. 1. La materia prima

En la elaboración del gazpacho se utilizaron los siguientes vegetales: tomate, pepino, pimiento y ajo, además de otros ingredientes necesarios para su preparación como agua, vinagre de vino, sal y aceite de oliva.

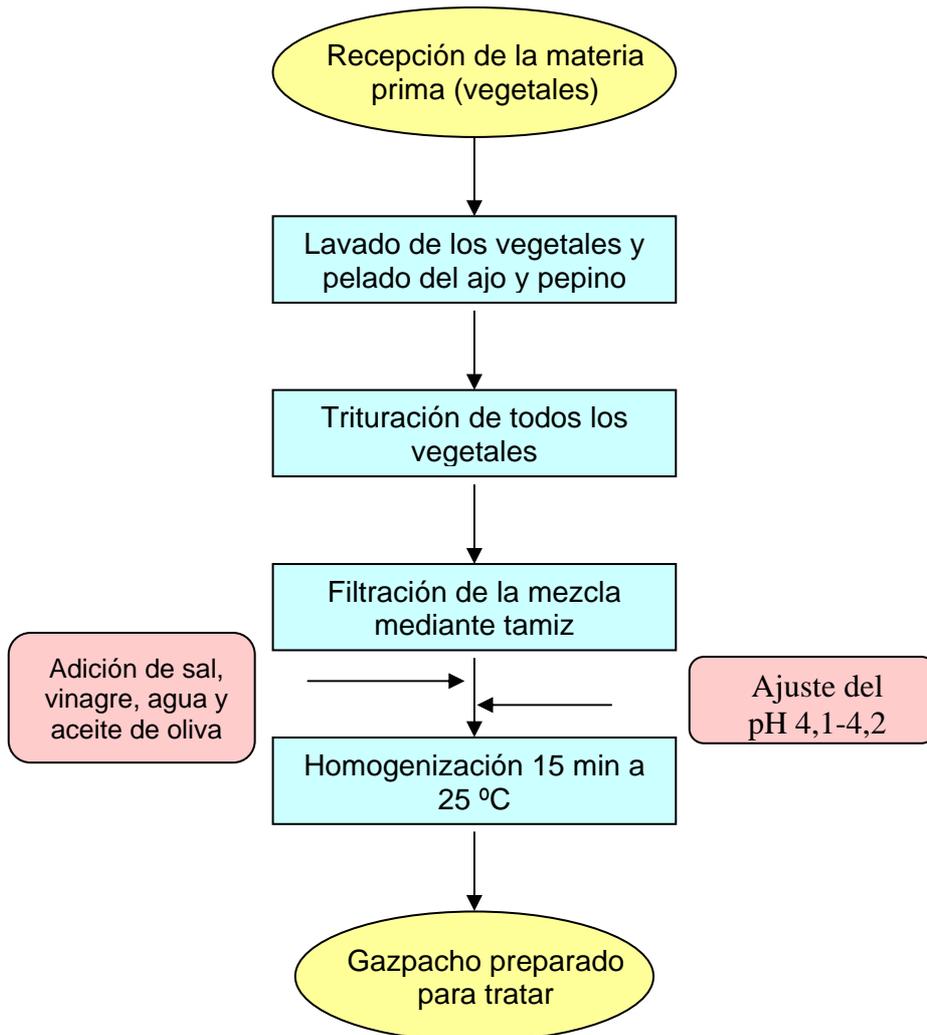
#### 3. 1. 2. Formulación

<i>Ingredientes</i>	<i>Cantidad en g/l</i>
Tomate	500 g
Pepino	300 g
Pimiento	150 g
Ajo	6 g
Sal	6 g
Aceite de oliva	80 ml
Agua	150 ml
Vinagre	hasta pH 4,1-4,2

#### 3. 1. 3. Preparación del gazpacho

Brevemente, el diagrama de flujo de la preparación del gazpacho se muestra en la Figura III. 1. Se realizó un buen lavado de los vegetales con agua y se procedió al pelado del ajo y del pepino. Después los vegetales fueron troceados y trasladados al recipiente de trituración de un homogenizador electromecánico (Kenwood Major 250), equipo que fue utilizado para triturar los vegetales. A continuación, la mezcla se filtró a través de un tamiz apropiado, y se añadió agua,

sal y aceite de oliva según las proporciones indicadas en el apartado anterior. El pH fue ajustado con el vinagre a un valor entre 4,1 y 4,2. La mezcla fue homogeneizada durante 15 min. Una vez preparado el gazpacho, éste fue almacenado en botellas de plástico a temperatura de refrigeración (4 °C). El gazpacho fue elaborado en tres ocasiones independientes.



**Figura III. 1.** Diagrama de flujo de la elaboración del gazpacho

### 3. 1. 4. Tratamientos de alta presión

Se utilizó un equipo piloto de alta presión isostática discontinuo de Alstom ACB-GEC (Nantes, Francia) con un cilindro de 10 cm de diámetro y 30 cm de altura (2 l de capacidad) (Figura III. 2.). La presión máxima alcanzada por el equipo piloto es de 500 MPa, el tiempo necesario para alcanzar esta presión es de 120 s y el tiempo de descompresión oscila entre 30 y 60 s. La temperatura de tratamiento fue controlada por termostatación del recinto de presurización y del agua contenida a través de un baño de calentamiento y un equipo de refrigeración con recirculación.

Las muestras de gazpacho fueron colocadas en recipientes de plástico flexibles de polietileno de baja densidad (Azlon, Bibby, Sterilin Ltd, Stone, Reino Unido) con tapa de rosca de polipropileno.



**Figura III. 2.** Equipo discontinuo de altas presiones (ACB, Nantes, Francia) del Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA).

Posteriormente las muestras fueron tratadas a 400 y 500 MPa durante tiempos de 15 y 30 min a 25, 45 y 50 °C, dando lugar a doce tratamientos diferentes de alta presión. Se utilizaron muestras sin tratar como muestras control.

Las muestras se guardaron en refrigeración (4 °C) hasta su posterior análisis. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado y fueron analizados a los días 1, 15 y 30 tras el tratamiento.

### **3. 1. 5. Análisis enzimático**

En todas las muestras se llevaron a cabo las determinaciones de actividad pectinmetilesterasa (PME), polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD).

Para ello, se realizó la puesta a punto de las técnicas de extracción y análisis de estas enzimas en los componentes del gazpacho por separado (tomate, pepino, pimiento y ajo) y en el gazpacho.

#### **3. 1. 5. 1. Extracción de la PME**

La extracción de la PME se realizó mezclando los ingredientes individuales (tomate, pepino, pimiento o ajo) triturados, o bien el gazpacho con una solución de NaCl al 8,8% (p/v) en proporción de 10 g producto en 30 ml de la solución. Para realizar esta operación los ingredientes y el NaCl se mantuvieron a temperatura de refrigeración a (4 °C) para minimizar las pérdidas de actividad (Lee y Macmillan, 1968). Posteriormente la mezcla fue triturada y homogeneizada con ayuda de un homogenizador electromecánico (DiAx 900, Kehlheim, Alemania) y centrifugada a 15000 rpm, durante 30 min a 4 °C. Finalmente el extracto fue almacenado en tubos en congelación a una temperatura aproximada de -20 °C hasta el momento de análisis. Previamente se comprobó que estos extractos no perdieran actividad enzimática durante el tiempo de congelación.

### 3. 1. 5. 2. Medida y expresión de la actividad de la PME

Para medir la actividad enzimática de la PME se utilizó un ensayo espectrofotométrico en continuo que se basa en la variación de color del colorante azul de bromotimol con el pH, que es modificado por la producción de ácido por parte de la PME al actuar sobre la pectina (Hagerman y Austin, 1986).

Los reactivos, su concentración, así como los volúmenes utilizados durante el ensayo enzimático se recogen en la siguiente tabla:

Solución de pectina de origen cítrico (Sigma, Steinheim, Alemania) al 0,5% (p/v) en agua destilada	2 ml
Solución de azul de bromotimol (Sigma), al 0,01% (p/v) en tampón fosfato potásico 3 mM a pH 6,5	150 $\mu$ l
Agua destilada	830 $\mu$ l
Extracto enzimático	20-25 $\mu$ l

Todos los reactivos se llevaron a pH 7,5 para que el pH inicial fuera siempre el mismo y los resultados fueron reproducibles (Hagerman y Austin, 1986).

La analítica enzimática fue seguida con un espectrofotómetro de doble haz (Cecil 9000, Cambridge, Reino Unido) a una longitud de onda de 620 nm y una temperatura de 25 °C.

La actividad enzimática se expresó como  $\Delta A_{620} / \text{min} \times \text{ml extracto}$ .

### 3. 1. 5. 3. Extracción de la PPO y POD

La extracción de la PPO y POD se realizó mezclando 10 g de la muestra con 20-25 ml de tampón fosfato 0,2 M a pH 6,5 añadido de 4% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 1% (v/v) de triton X-100. Esta mezcla fue homogeneizada (Diax 900, Heidolph) durante 3 min con intervalos de 30 s y a temperatura de refrigeración, después fue centrifugada a 15000 rpm a 4 °C

durante 30 min (Cano *et al.*, 1997). Las muestras fueron almacenadas en congelación de la misma manera que para la PME.

#### 3. 1. 5. 4. Medida y expresión de las actividades PFO y POD

En la determinación de las actividades PFO y POD se utilizaron ensayos espectrofotométricos (Cano *et al.*, 1997). Los reactivos, su concentración, así como los volúmenes utilizados durante el ensayo enzimático de la POD se detallan en la siguiente tabla:

Tampón fosfato 0,05 M a pH 6,5	2,7 ml
Donador de hidrógeno: <i>p</i> -fenilendiamina al 1% (p/v)	100 $\mu$ l
Extracto enzimático	25 $\mu$ l
Agua oxigenada al 1,5% (v/v)	100 $\mu$ l

La lectura se realizó a 485 nm a 25 °C.

Para la PFO se utilizaron los reactivos siguientes:

Solución de catecol 0,07 M en tampón fosfato 0,05 M a pH 6,5	3 ml
Extracto enzimático	75 $\mu$ l

La lectura se realizó a 420 nm a 25 °C. Las actividades enzimáticas se expresaron como **UA/min  $\times$  ml extracto**.

### **3. 1. 6. Análisis microbiológico**

#### ***3. 1. 6. 1. Recuentos microbianos en el gazpacho***

Se realizó un seguimiento de 30 días en el gazpacho tratado por alta presión y el gazpacho control almacenados a 4 °C. El gazpacho fue diluido (1/10, v/v) en tubos estériles con solución de Ringer diluida 1/4 (v/v) con agua. Los recuentos totales se realizaron por duplicado en placa con medio PCA (Plate Count Agar) incubados a 30 °C durante 72 h. Los recuentos de las bacterias lácticas se hicieron en MRS agar (De Man, Rogosa, Sharpe) por duplicado incubados a 30 °C durante 72 h. Las levaduras y mohos fueron determinados en SAB agar (Sabouraud) incubando 5 días a 28°C. La detección límite fue de 1 UFC/ml excepto para SAB que fue 10 UFC/ml. También se estableció un seguimiento de 30 días en una marca del gazpacho industrial, realizando los recuentos totales (PCA) y de microbiota láctica (MRS). Todos los medios de cultivo fueron de Oxoid (Bakingstoke, Reino Unido).

### **3. 1. 7. Análisis físico-químico**

#### ***3. 1. 7. 1. Medida del pH***

Se realizaron medidas del pH mediante un pHmetro (Crison, Alella, España) calibrado a temperatura de 20 °C.

#### ***3. 1. 7. 2. Determinación de la proteína***

Se realizó por el método de Kjeldahl mediante el sistema de digestión en bloque (AOAC, 1990).

### **3. 1. 7. 3. Determinación del extracto seco**

El porcentaje de extracto seco del gazpacho se obtuvo por desecación de las muestras hasta peso constante (AOAC, 1990).

### **3. 1. 7. 4. Análisis de grados Brix**

Se realizó la medida del índice de refracción y conversión a grados Brix con un refractómetro (EURF490 Abbe, USA) provisto de un equipo de termoregulación para mantener la temperatura a 20 °C.

### **3. 1. 7. 5. Análisis de color del gazpacho**

Los cambios de color producidos por los tratamientos y durante el almacenamiento del producto, se evaluaron utilizando un colorímetro de superficie de esfera integradora Miniscan XE (Hunterlab, Reston, Virginia, USA). Las muestras se depositaron en un contenedor cilíndrico de 5 cm de diámetro y 3 cm de alto. El iluminante utilizado fue el FCW y el observador 10°. Se utilizó la escala Hunterlab:  $L^*$  = luminosidad de negro (0) a blanco (100),  $a^*$  = color desde rojo (+) a verde (-) y  $b^*$  = color desde amarillo (+) a azul (-). El software del equipo calculó  $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ , media de la diferencia de color de una muestra respecto a un patrón, que en nuestro caso fue el gazpacho control.

### **3. 1. 7. 6. Evaluación reológica**

Las medidas reológicas se realizaron con un reómetro Thermo Haake RS1 (Thermo Haake, Alemania), utilizando un sensor de cilindros concéntricos (Z 34 DIN Ti, espacio entre cilindros 7 mm). Se realizaron curvas de flujo en el intervalo de gradientes de velocidad de 0 a 100 s<sup>-1</sup> obteniéndose las curvas ascendente y descendente en un tiempo total de 120 s.

A partir de la curva ascendente obtenida se ajustó el modelo de Oswald de Waele o ley de Potencia ( $\sigma = k \cdot \gamma^n$ ) y se calcularon el índice de consistencia (K) y

el índice de comportamiento al flujo (n). Asimismo, a partir de la representación de las curvas ascendente y descendente del ensayo de flujo se obtuvieron los valores curvas-gradientes al área de histéresis para cada muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3. 1. 7. 7. Análisis organoléptico del gazpacho**

Se evaluaron diferentes características organolépticas (color, sabor, acidez, viscosidad, presencia de sabores extraños y homogeneidad) en los gazpachos tratados a 500 MPa durante 30 min a 45 y 50 °C y del gazpacho control, mediante las escalas estructuradas de diez puntos, según se especifica en la Figura III. 3. También se realizaron pruebas triangulares de los gazpachos tratados y control, con el fin de detectar diferencias entre los gazpachos presurizados y no presurizados. Estas pruebas sensoriales se realizaron en los días 1, 15 y 30 de conservación del producto utilizando el formulario de la Figura III. 4.

Los catadores fueron miembros no entrenados del personal de la facultad, familiarizados con este tipo de producto y análisis.

### **3. 1. 7. 8. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando un GLM (modelo lineal general) del paquete estadístico SAS para Microsoft Windows versión 6.11 (SAS Inc., *Centre de Càlcul*, UAB) para el análisis de los datos de enzimas, así como del color del gazpacho. Se utilizaron dos tipos de tests diferentes para obtener comparaciones: el Duncan's y el Student-Newman-Keuls. La evaluación fue basada sobre el nivel de significación de  $P < 0,05$ .

Para el análisis de datos del test triangular de la prueba organoléptica, la probabilidad de escoger la muestra correcta al azar es  $p = 1/3$ . Se utilizó la Ji-cuadrada para determinar si las comparaciones entre muestras que generan la prueba triangular es significativamente diferente o no. La formula de Ji-cuadrada

adecuada que involucra un grado de libertad (g.l. = 1), es llamada Ji cuadrada ajustada:

$$\chi^2 = \frac{(|X_1 - np| - 0,5)^2}{np(1-p)}$$

Donde:

X = número de opiniones acertadas

n = número total de ensayos practicados o número de jueces por repeticiones efectuadas.

p = probabilidad del éxito en un ensayo único.

q = (1 - p) = probabilidad de la falta en un ensayo único.

0,5 = factor de corrección por continuidad para Ji-cuadrada ajustada. El factor de corrección se aplica sólo para un grado de libertad en el cual los resultados se consignan como “acierto” y “falta”.

Nombre:			
Fecha:			
Después de examinar detenidamente estas muestras, indica cuál de las muestras es la diferente en cada tríada:			
	Código muestras		Código de la muestra diferente
-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-----

**Figura III. 3.** Formulario utilizado en las pruebas triangulares.

Nombre:											
Fecha:											
Evalúa el color, sabor, acidez, viscosidad, presencia de sabores extraños así como la homogeneidad de estas muestras colocando el código de las muestras en la notación de la escala situada al lado de cada atributo.											
Código muestras:                    -----    -----    -----											
Color:	-									+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sabor:	-									+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acidez:	-									+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Viscosidad:	-									+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sabores extraños:	-									+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Homogeneidad:	-									+	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**Figura III. 4.** Formulario para la evaluación sensorial de los gazpachos a través de escalas estructuradas.

## **3. 2. ZUMO DE UVA Y ELABORACIÓN DEL VINO**

### **3. 2. 1. Procedencia y almacenamiento de la uva**

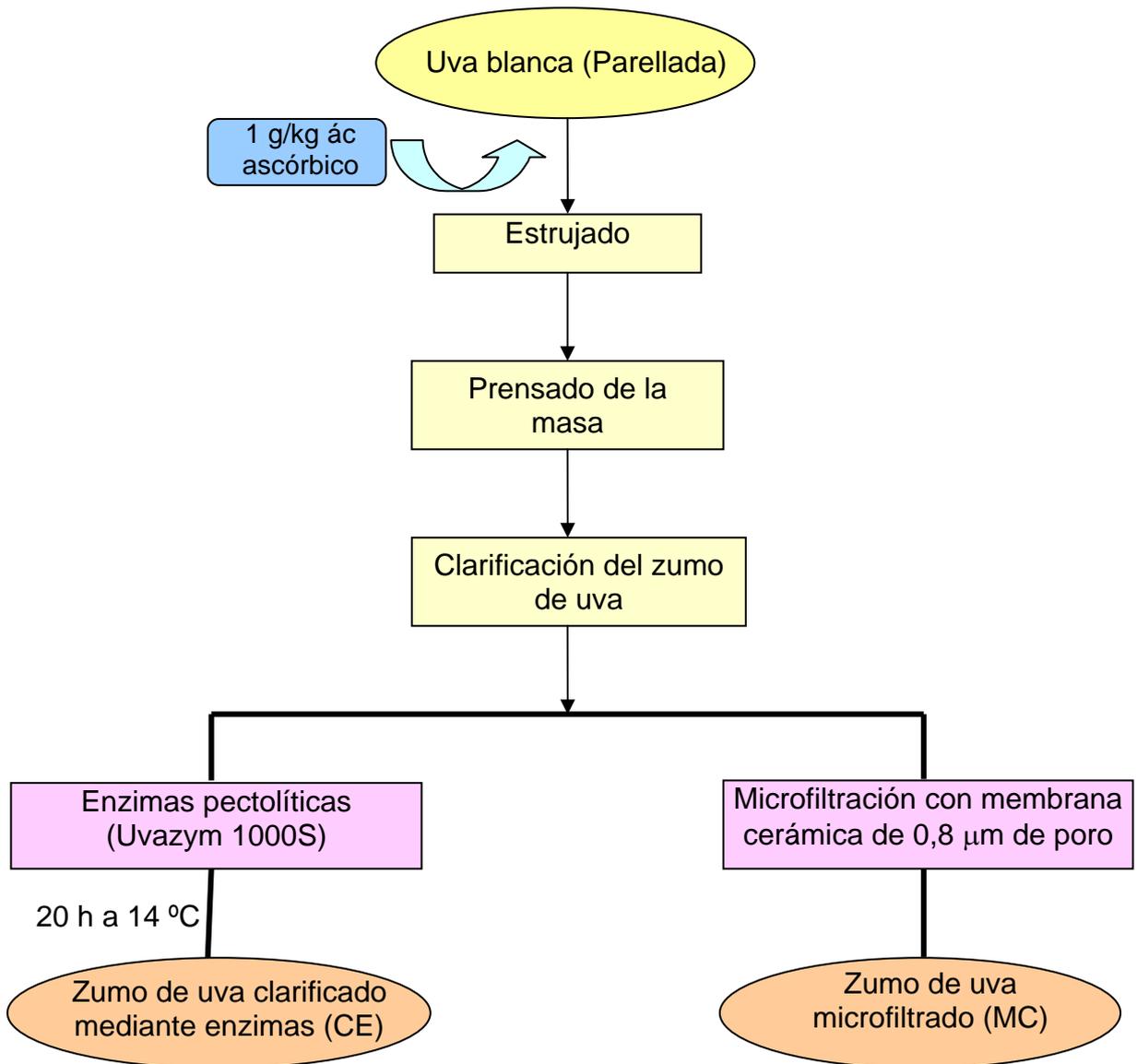
Las uvas se obtuvieron en el mes de octubre y pertenecieron a la variedad de uva blanca Parellada, muy utilizada para la elaboración de zumos de uva y vinos en la zona del Penedès.

El fruto de la vid es muy exigente y necesita unas condiciones muy estrictas de transporte y almacenamiento para obtener una buena calidad en el zumo elaborado. Así, las uvas fueron almacenadas inmediatamente en una cámara a 6 °C hasta su posterior utilización.

### **3. 2. 2. Elaboración del zumo de uva**

La Figura III. 5. muestra el diagrama de flujo de la elaboración del zumo de uva. Las uvas fueron tratadas con ácido L-ascórbico (E-300) en cantidad de 1g/kg como antioxidante antes de ser procesadas, para evitar reacciones de pardeamiento del zumo de uva durante su elaboración debido a la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en la piel y el hollejo de las uvas.

Antes de pasar al prensado, se realizó un estrujado de las uvas mediante una estrujadora mecánica que permitió romper los granos de uva sin aplastar las pepitas, permitiendo un rendimiento mejor. En el prensado, se utilizó una prensa hidráulica compuesta por una bomba axial que hinchándose con agua hizo presión sobre los granos de uva estrujados, lo que hizo fluir el zumo dejando los hollejos con pieles, raspón y pepitas como residuo.



**Figura III. 5.** Diagrama de flujo de la elaboración del zumo de uva blanca

El zumo obtenido fue rápidamente recogido y guardado a temperaturas de refrigeración (4 °C) donde fue separado en dos lotes para su decantación y posterior clarificación. El zumo de uva fue elaborado en el Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI, Vilafranca del Penedès, Barcelona).

### **3. 2. 3. Clarificación del zumo de uva**

El primer lote de zumo de uva fue tratado con enzimas pectolíticas (Uvazym 1000S, Esseco, España) en proporción de 0,02 g/l, dosis recomendada por los fabricantes. El zumo de uva fue clarificado durante 20 h a 14 °C, decantado y almacenado en botellas estériles a 4 °C.

El segundo lote fue filtrado a 4 °C mediante un equipo de microfiltración con membrana cerámica (Membrana W6, K00W685, KERASEP<sup>TM</sup>, TECH-SEP, Francia) con poros de 0,8 µm de diámetro, después de mantener el zumo de uva toda la noche en frío. El zumo de uva obtenido fue directamente almacenado en pequeñas botellas estériles hasta su posterior tratamiento o análisis. Los zumos de uva clarificados fueron elaborados en tres ocasiones.

### **3. 2. 4. Tratamiento de altas presiones**

En el tratamiento de los zumos de uva, se utilizó el mismo equipo piloto de altas presiones para el gazpacho. Las muestras del zumo de uva fueron colocadas en recipientes de plástico flexibles de polietileno de baja densidad para transmitir la presión (Azlon) con tapa de rosca de polipropileno. Se utilizaron muestras sin tratar como muestras control.

Posteriormente las muestras de zumo de uva fueron tratadas a 400 MPa a 2 y 40 °C y 500 MPa a 2 °C durante 10 min, dando lugar a tres tratamientos diferentes de cada lote de zumo de uva y dos controles.

Las muestras se guardaron en refrigeración 4 °C hasta su posterior análisis. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado y fueron analizados cada 15 días durante un periodo de 60 días.

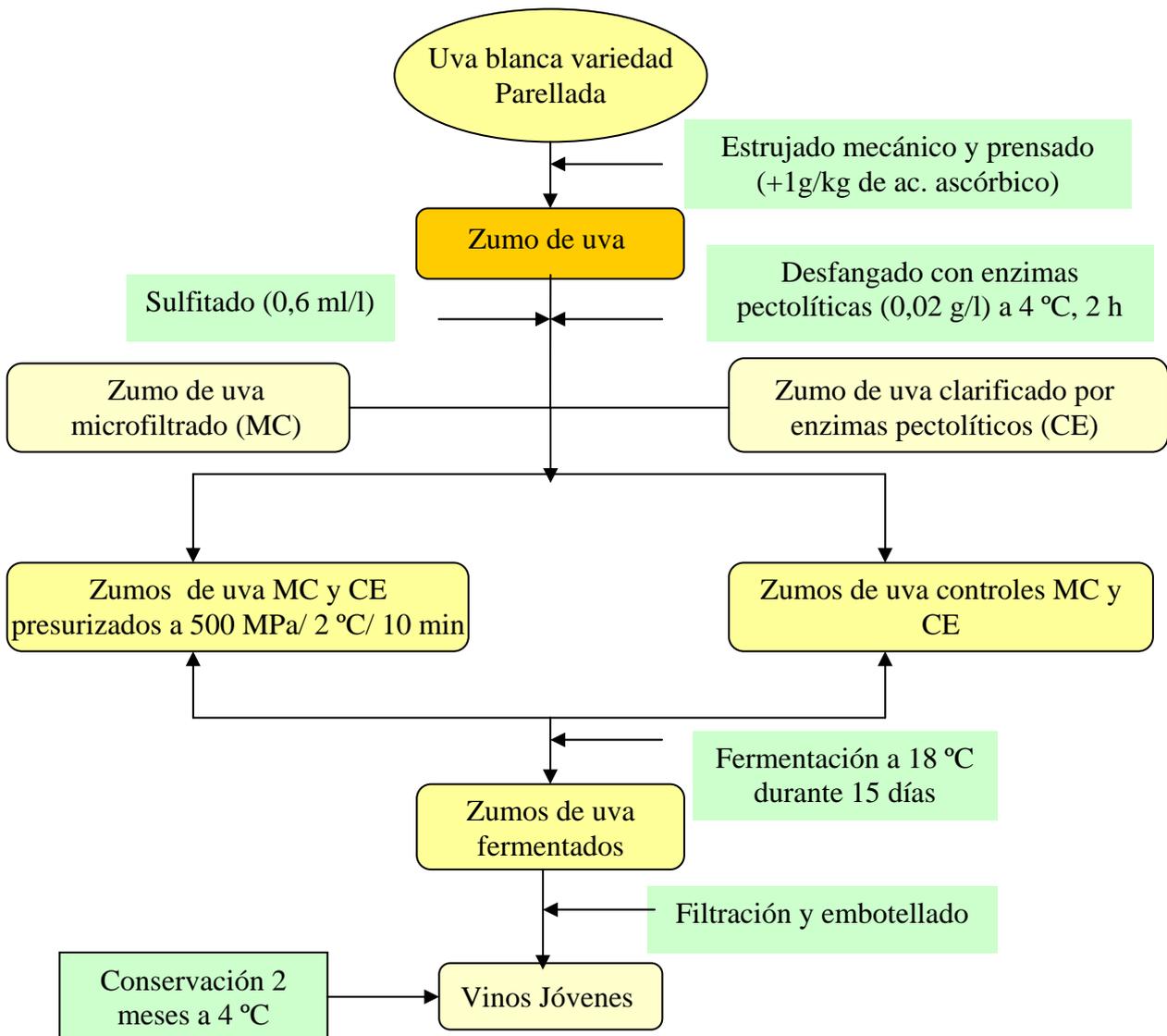
### 3. 2. 5. Elaboración del vino

El zumo de uva fue tratado ligeramente con enzimas pectolíticas para ser desfangado. A continuación fue separado en dos lotes para realizar una clarificación enzimática (CE) y una microfiltración por membrana (MC). Posteriormente, el zumo fue sometido a un tratamiento de alta presión 500 MPa/2 °C durante 10 min. A parte se separaron dos lotes con los mismos tratamientos de clarificación pero sin ser presurizados, los cuales se utilizaron como controles.

A todos los lotes de zumo de uva se añadió una pequeña dosis de SO<sub>2</sub> (0,6 ml/l) durante el desfangado, para evitar la oxidación y el desarrollo de microorganismos indeseables durante la vinificación. El diagrama de flujo de la Figura III. 6 muestra las etapas de la elaboración del vino.

Se utilizaron levaduras secas activas (*Saccharomyces bayanus*, con carácter “killer”) (INA, Paris-Grignon, Ref. IOC 18-2007) para la vinificación a dosis de 0,2 g/l. Para su uso, las levaduras fueron diluidas en un poco de agua tibia a 35 °C y una cantidad muy pequeña de zumo de uva para favorecer la actividad y la aclimatación de las levaduras en un medio azucarado. Después de 15 min a temperatura ambiente, la mezcla fue añadida poco a poco a las muestras con una agitación leve para empezar la vinificación.

Durante el proceso de la fermentación los diferentes lotes de zumo de uva fueron almacenados en botellas estériles con boca ancha a 18 °C. Las botellas dispusieron de un protector plástico perforado para favorecer la expulsión de CO<sub>2</sub>. La temperatura fue controlada durante todo el proceso de fermentación y la densidad fue medida cada dos días a fin de establecer una curva de fermentación. La vinificación se realizó en una ocasión y por duplicado. Después de finalizar la fermentación, los vinos obtenidos fueron filtrados en papel Whatman n° 4 (125 mm Milipore Cat No 1004, Maidstone, Reino Unido) y trasladados a botellas de vino oscuras y almacenados a 4 °C para su conservación durante un tiempo de 2 meses antes de proceder a su análisis organoléptico y físico-químico.



**Figura III. 6.** Diagrama de flujo de la elaboración del vino

### 3. 2. 6. Análisis microbiológico

#### 3. 2. 6. 1. Recuentos microbianos en el zumo de uva

Se realizó un seguimiento de 60 días en las muestras tratadas por alta presión y los controles de los diferentes zumos de uva almacenados a 4 °C. Los

recuentos se realizaron en PCA (Plate Count Agar), MRS agar (De Man, Rogosa, Sharpe) y SAB agar (Sabouraud) de la misma manera que en el gazpacho.

### **3.2.6.2. Análisis microbiológico en el vino**

Se recogieron muestras del vino durante el cuarto día y en el último día de la fermentación para el aislamiento y la identificación de las levaduras. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml cada una, de varias diluciones y se dispusieron en placas agar de extracto de malta (Oxoid). Las placas fueron incubadas durante 5 días a 28 °C. Las colonias de levaduras fueron aisladas y caracterizadas según el método de Barnett *et al.* (1983).

### **3.2.6.3. Aislamiento del ADNmt y análisis de restricción RFLP-mtDNA**

De cada una de las muestras separadas durante el proceso de la fermentación de todos los lotes de vino, se aislaron 12 colonias de levaduras para un análisis de su ADNmt. Un total de 92 colonias fueron analizadas en el INCAVI, y sus perfiles ADNmt fueron determinados por el método de Querol *et al.* (1992 a, b) según se describe a continuación.

Las cepas de levaduras se introdujeron en microviales con 1,5 ml de medio YEPD (1% de extracto de levadura, 2 % de peptona semilla de soja y 2 % glucosa), incubándose posteriormente durante 18-24 h a 26-28 °C. El cultivo fue centrifugado a 14.000 rpm durante 3-5 min. El sobrenadante fue decantado y el precipitado resuspendido en 100 µl de tampón 1 (sorbitol 1 M + 0,1 M EDTA, pH 7,5). Se añadieron 4 µl de una solución de Zimoliasa -20T (2,5 mg/ml). Los microviales fueron incubados a 37 °C durante 20 min. Se realizó otra centrifugación a 7000 rpm durante 1 min, y el sobrenadante fue decantado y el precipitado resuspendido en 100 µl de tampón 2 (50 mM Tris-HCl + 20 mM EDTA, pH 7,4). A continuación, 10 µl de una solución de SDS al 10% fueron añadidos, y la mezcla fue incubada a 65 °C durante 5 min. Inmediatamente después se añadieron 40 µl de acetato potásico 5 M. Los tubos fueron puestos en hielo durante 5 min y fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El

sobrenadante (150 µl) fue trasladado a otro microvial que contuvo 150 µl de isopropanol para precipitar el ADN. La mezcla fue agitada suavemente, y después de una breve incubación de 5 min a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue decantado y el precipitado que contenía el ADN fue lavado con 200 µl de etanol absoluto al 70 %. Los tubos fueron centrifugados de nuevo a 14.000 rpm 5 min, y el sobrenadante fue decantado y el precipitado resuspendido en 15 µl de tampón TE (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 7,4). Las muestras fueron guardadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

El ADN mitocondrial de *Saccharomyces bayanus* tiene la particularidad de presentar en su secuencia de nucleótidos sólo un 18 % de G y C y un 72 % de A y T. Esto hace que aparezcan unas dianas muy específicas para ciertas enzimas de restricción como Hinf I que reconoce secuencias cortas de G y C. Estas enzimas reconocen un número elevado de dianas en el ADN nuclear pero pocas en el ADN mitocondrial debido a la característica descrita anteriormente. Esto permite, mediante un sencillo protocolo identificar cepas pertenecientes a *Saccharomyces bayanus*.

En un microvial de 1,5 ml de capacidad se añadió 15 µl de ADN de la extracción (secado y resuspendido en TE) 15 unidades de enzima de restricción Hinf I, 0,75 µl de RNasa libre DNasa (0,5 mg/ml) y 1,5 µl de tampón del enzima de restricción. La digestión se realizó a lo largo de 15-18 h en un baño a 37 °C.

Los fragmentos obtenidos después de la digestión del ADN total se analizaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los resultados se expresaron como porcentaje de presencia de la cepa de levadura inoculada respecto al total de colonias analizadas.

### **3. 2. 7. Análisis de composición de los zumos de uva y de los vinos**

#### **3. 2. 7. 1. Análisis de pH**

Se determinó mediante una medida potenciométrica a 20 °C, con previa eliminación de dióxido de carbono por agitación en frío y con vacío parcial.

#### **3. 2. 7. 2. Grados Brix**

La medida del índice de refracción y conversión en grados Brix, se realizó mediante un refractómetro (EURF490, Abbe, USA) provisto del equipo necesario para mantener la temperatura a 20 °C.

#### **3. 2. 7. 3. Acidez total**

La acidez total del zumo de uva se determinó mediante una valoración con una solución valorada 0,1332 N (N/7,5) de NaOH (Panreac, Barcelona) conteniendo azul de bromotimol (Sigma) como indicador. La acidez total se expresó en gramos de ácido tartárico/ l.

#### **3. 2. 7. 4. Densidad**

La determinación de la densidad relativa se llevó a cabo cada 2 días a 20 °C mediante un densímetro. La densidad se relaciona con la cantidad de azúcar presente en la matriz del zumo de uva.

Los análisis físico-químicos como el grado alcohólico, acidez total, densidad relativa, masa volúmica, extracto seco, restos de extracto y azúcares totales, fueron analizados en el INCAVI, siguiendo métodos oficiales según el Recueil des Méthodes Internationales d'Analyses des Vins O.I.V. (1969).

### **3. 2. 8. Análisis de color**

Las medidas de absorbancia del color fueron realizadas con un espectrofotómetro (Perkin Elmer model Lambda 20) utilizando cubetas de 1 cm de longitud de paso de luz en un intervalo de longitud de onda comprendido entre 380 y 780 nm. La intensidad de color se mide por la suma de las absorbancias del zumo de uva correspondientes a las longitudes de onda 620, 520 y 420 nm (Glories, 1988). Las muestras de zumo de uva y vinos fueron filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  antes de ser analizadas.

El cociente  $A_{420}/A_{520}$  representa el tono del zumo de uva y también una medida de interés para valorar el color de este producto (Sudraud, 1958).

El cálculo de los valores triestimulares, para especificar el color en los términos de la Comisión Internacional de la Luz (CIE, 1986), se estableció a partir de las medidas de absorbancia realizadas con el espectrofotómetro, utilizando cubetas de 1 cm de longitud de paso a la luz en un intervalo de longitud de onda comprendido entre 380 y 780 nm. Se determinaron los valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$  referidas a un observador de  $10^\circ$  y un iluminante D65.

- $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  indican las coordenadas cartesianas de un vector del espacio cromático tridimensional. Según el valor representan un color u otro:  $a^* > 0$  indica el color verde,  $a^* < 0$  el color rojo,  $b^* > 0$  el color amarillo y  $b^* < 0$  azul.
- $L^*$  se refiere a un estímulo luminoso e indica la claridad,  $L^* = 0$  negro y  $L^* = 100$  blanco.
- $C^*$  es la magnitud adimensional derivada de las coordenadas colorimétricas y se obtiene a partir de la fórmula siguiente  $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$ .

### **3. 2. 8. 1. Ensayo de oxidación**

Los vinos jóvenes (2 meses), fueron destapados y expuestos a temperatura ambiente durante 10 días, provocando una aceleración de la oxidación. Se realizaron mediadas de absorbancia a 420 nm el día 1, 5 y 10 en los vinos

procedentes de los zumos MC y CE controles y tratados por alta presión para medir su oxidación durante el tiempo.

### **3. 2. 9. Análisis sensorial de los zumos de uva y vinos**

Las muestras de zumo de uva fueron evaluadas mediante un análisis comparativo entre las muestras control y sus respectivos tratados por altas presiones a 500 MPa, 2 °C y 10 min procedentes de los dos lotes (clarificado por enzimas y microfiltrado). Los análisis se realizaron en el primer día después de la presurización y cada 15 días durante 60 días. Los zumos de uva fueron analizados por un panel de 8 miembros expertos en técnicas de evaluación sensorial de zumos de uva y vinos del INCAVI. Los parámetros sensoriales del zumo de uva fueron evaluados por los catadores sobre una escala estructurada de 10 puntos (débil- fuerte): aroma a fruta fresca y cocida, dulzor, acidez, aroma a hierbas y astringencia. Para el vino, además del color y la acidez se evaluaron otros parámetros como aroma floral, aroma frutal, aroma herbal, aroma a especias, aroma a tostado, gusto a especias, gusto herbal y gusto amargo. Un ejemplo de formularios utilizados en la evaluación de los zumos de uva y vinos se muestra en la Figura III. 7. Las muestras fueron presentadas a los catadores a 4 °C en vasos de vino para una evaluación en cabinas individuales de catas.

### **3. 2. 10. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando un GLM del paquete estadístico SAS para Microsoft Windows versión 6.11 (SAS Inc., *Centre de Càlcul*, UAB). El análisis de varianza se utilizó para interpretar los datos físico-químicos y el color del zumo de uva. Se utilizaron dos tipos de tests diferentes para obtener comparaciones: el Duncan's y el Student-Newman-Keuls test. La evaluación ha sido basada sobre el nivel de significación de  $P < 0,05$ .

Nombre:	
Fecha:	
Valorar los siguientes descriptivos en la escala de 9 puntos colocando el código de las muestras directamente en la escala.	
Código muestras:	-----
Aroma fruta fresca:	-----
Aroma fruta fresca:	-  -----  + 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Aroma fruta cocida:	-  -----  + 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Aroma hierbas :	-  -----  + 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Dulzor :	-  -----  + 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Acidez:	-  -----  + 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Astringencia:	-  -----  + 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

**Figura III. 7.** Formulario de la evaluación sensorial de los zumos de uva y vinos controles y tratados.

# **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **GAZPACHO**

#### 4. 1. COMPOSICIÓN DEL GAZPACHO

La Tabla 4. 1 muestra los valores medios de composición de los gazpachos industriales y del gazpacho preparado en el laboratorio.

**Tabla 4. 1.** Análisis de composición de los gazpachos

<i>Gazpacho</i>	<i>pH</i>	<i>ES (%)</i>	<i>°Brix</i>	<i>NT (%)</i>
<b>Comercial 1</b>	3,95 ± 0,01	7,89 ± 0,2	6,16 ± 0,01	0,114 ± 0,01
<b>Comercial 2</b>	4,08 ± 0,01	8,19 ± 0,7	6,83 ± 0,01	0,113 ± 0,03
<b>Laboratorio</b>	4,2 ± 0,01	10,12 ± 0,3	5,22 ± 0,03	0,101 ± 0,04

NT = Nitrógeno total

ES = Extracto Seco

Los gazpachos industriales presentaron un pH ligeramente más bajo que el gazpacho elaborado en el laboratorio. Este pH ácido es importante para prevenir la oxidación y la alteración microbiológica. Sin embargo, puede influir negativamente en las características organolépticas del gazpacho. En el gazpacho elaborado en el laboratorio decidimos partir de un pH más elevado, respecto a los gazpachos industriales, para mejorar el perfil organoléptico del producto.

El extracto seco de los gazpachos industriales presentó valores más bajos que el gazpacho elaborado en el laboratorio. Sin embargo, los valores de °Brix fueron más bajos en el gazpacho elaborado en el laboratorio que en los gazpachos industriales.

#### 4. 2. ANÁLISIS ENZIMÁTICO DE LOS VEGETALES DEL GAZPACHO

Los vegetales del gazpacho están expuestos a alteraciones microbianas, y especialmente enzimáticas, debido a la presencia en sus tejidos de enzimas como la pectinmetilesterasa (PME), la polifenoloxidasa (PFO) y la peroxidasa (POD).

Antes de mezclar los vegetales para la elaboración del gazpacho, se realizó un análisis de las actividades de cada enzima en cada vegetal por separado. El objetivo de realizar esta experiencia fue determinar la actividad de cada enzima en cada vegetal y ver la influencia de los condimentos añadidos como el aceite, el vinagre, la sal y el conjunto de todos ellos sobre las actividades PME, PFO y POD de cada vegetal (Tabla 4. 2).

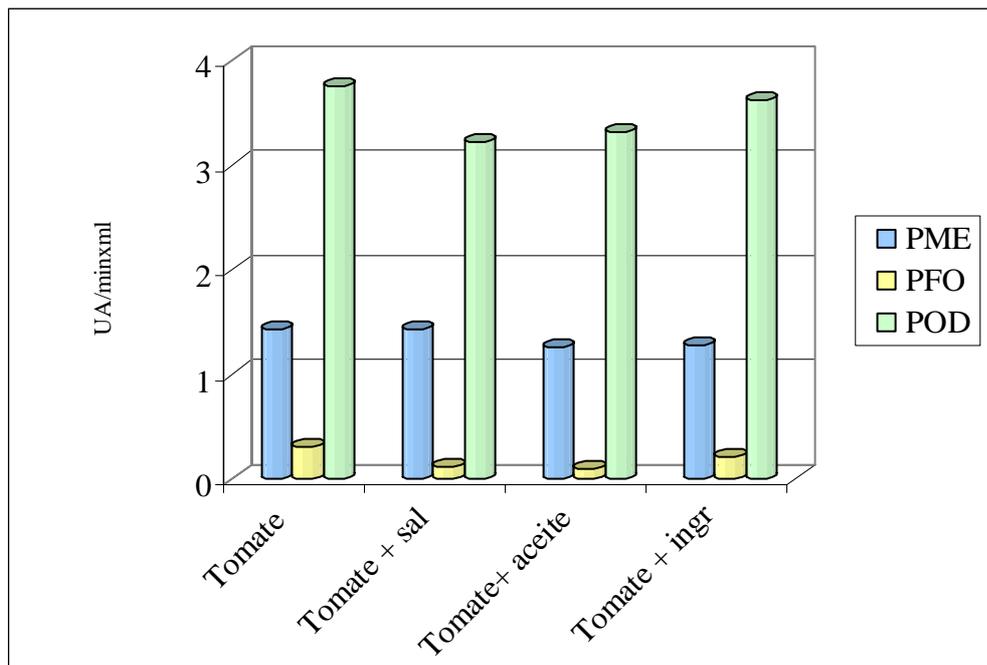
**Tabla 4. 2.** Actividades pectinmetilesterasa (PME), polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD) en cada vegetal del gazpacho y con otros ingredientes (sal, aceite, vinagre)

<i>Actividades enzimáticas (UA/min x ml)</i>			
	<b>PME</b>	<b>PFO</b>	<b>POD</b>
Tomate	1,43 ± 0,02	0,30 ± 0,01	3,75 ± 0,09
Tomate + Ing <sup>1</sup>	1,27 ± 0,04	0,20 ± 0,02	3,62 ± 0,02
Pepino	0,42 ± 0,05	0,20 ± 0,02	3,76 ± 0,03
Pepino + Ing	0,40 ± 0,08	0,16 ± 0,02	4,57 ± 0,05
Pimiento	0,52 ± 0,06	0,37 ± 0,03	ND <sup>a</sup>
Pimiento + Ing	0,49 ± 0,05	0,16 ± 0,07	ND
Ajo	0,60 ± 0,05	0,33 ± 0,02	1,34 ± 0,08
Ajo + Ing <sup>1</sup>	0,55 ± 0,05	0,09 ± 0,04	1,16 ± 0,06

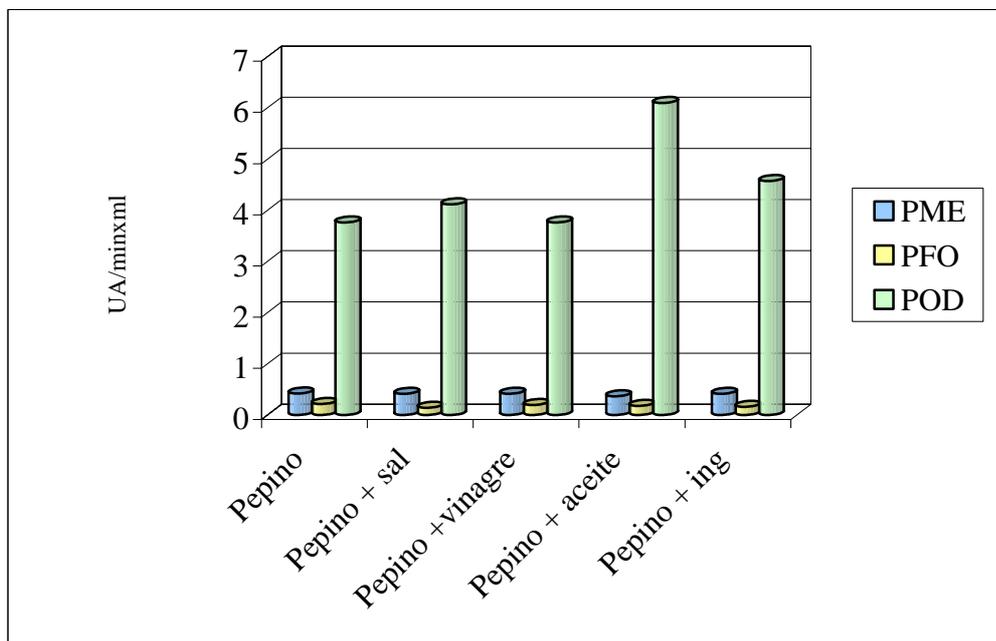
ND<sup>a</sup>: No fue detectada

Ing<sup>1</sup>: ingredientes (sal, aceite, vinagre)

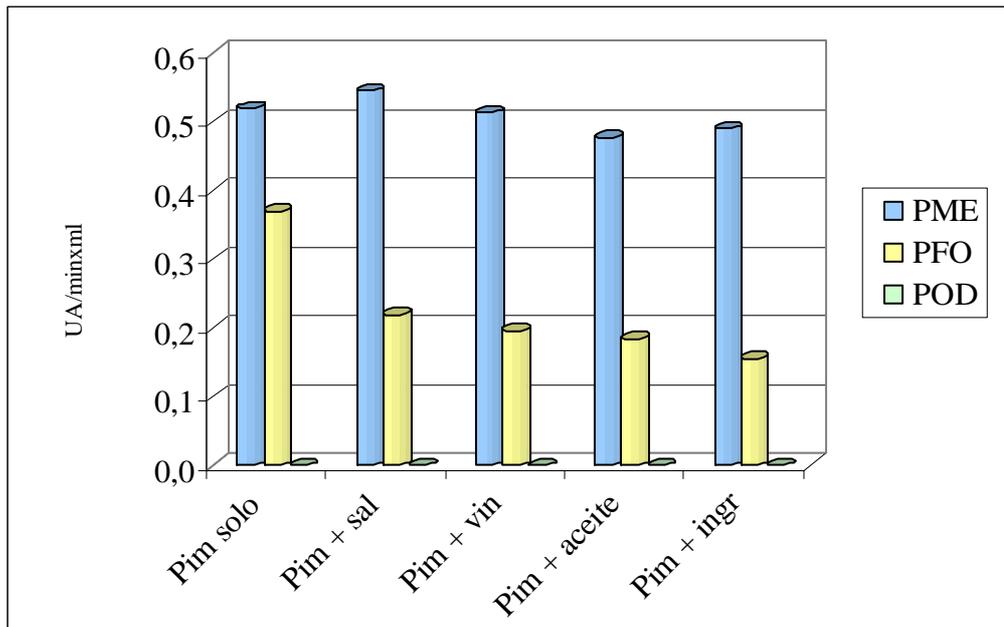
El tomate presentó la actividad más elevada de PME, respecto al resto de los vegetales, los cuales presentaron una actividad similar entre ellos (entre 0,4 y 0,6 UA/min × ml). Por otra parte, y en todos los vegetales, se observó una disminución no considerable en la actividad enzimática de la PME después de añadir todos los condimentos (sal, aceite y vinagre). La adición de estos ingredientes de forma separada a cada uno de los vegetales no registró ningún efecto apreciable sobre la actividad PME (Figuras IV. 1, IV. 2, IV. 3 y IV. 4). En el caso del tomate, el vinagre no fue añadido debido al pH bajo de partida que presentaba.



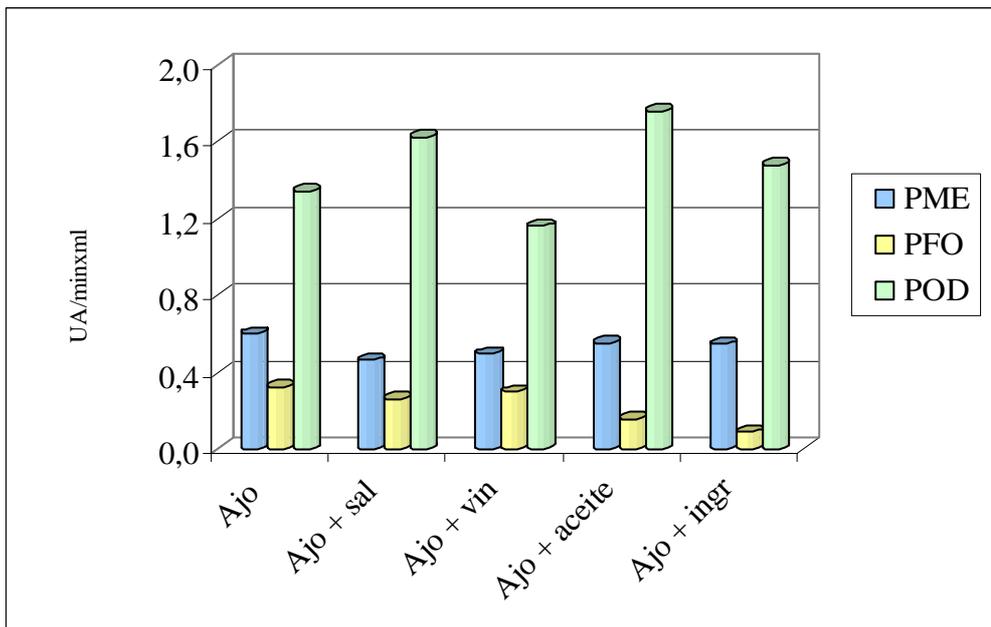
**Figura IV. 1.** Efecto de los ingredientes (sal, aceite y vinagre) sobre la actividad enzimática de la PME, PFO y POD en el tomate



**Figura IV. 2.** Efecto de los ingredientes (sal, aceite y vinagre) sobre la actividad enzimática de la PME, PFO y POD en el pepino



**Figura IV. 3.** Efecto de los ingredientes (sal, aceite y vinagre) sobre la actividad enzimática de la PME, PFO y POD en el pimiento



**Figura IV. 4.** Efecto de los ingredientes (sal, aceite y vinagre) sobre la actividad enzimática de la PME, PFO y POD en el ajo

La PME es una enzima endógena termoestable, responsable de numerosos defectos de la calidad de los zumos del tomate y sus derivados. La actividad de esta enzima induce la pérdida de la consistencia y de la homogeneidad de estos productos (Pilnik y Voragen, 1991). Estas características son fundamentales en la calidad de zumos del tomate y sus derivados.

El tomate y el resto de los vegetales estudiados mostraron una actividad baja de PFO, pero en este caso la actividad PFO se vio afectada por la adición de los ingredientes. La adición de sal, vinagre y aceite de oliva por separado, así como el conjunto de todos ellos, a los vegetales indujo en general una reducción de la actividad PFO. Estos ingredientes, sobre todo la sal y el vinagre, podrían inducir un efecto inhibitorio de la enzima.

En cuanto a la POD, el tomate y el pepino registraron una actividad enzimática más alta en comparación al ajo (3,75 frente a 1,34 UA/min × ml), y en el caso del pimiento no se detectó actividad POD.

No se observaron diferencias en la actividad POD del tomate y el tomate añadido con el resto de ingredientes. No obstante, en el pepino y el ajo se apreció una activación enzimática de la POD cuando éstos fueron adicionados de aceite. Esto podría estar relacionado con la presencia de actividades POD en el aceite de oliva las cuales participarían en esta actividad enzimática.

#### **4. 3. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN Y LA TEMPERATURA SOBRE LAS ACTIVIDADES PME, PFO Y POD**

La Tabla 4. 3 muestra el porcentaje de inactivación de las enzimas PME, PFO y POD del gazpacho tratado a diferentes presiones (400 y 500 MPa), temperaturas (25, 45 y 50 °C) y tiempos (15 y 30 min) a las 24 h del tratamiento con respecto a las muestras controles (muestras sin tratamiento de alta presión).

La PME fue la enzima más resistente a los tratamientos de alta presión, combinados con diferentes tiempos y temperaturas. La inactivación fue parcial y reducida.

Los tratamientos de 400 MPa durante 15 min a 25 °C produjeron una reducción del orden del 28 % de la PME. Los tratamientos de alta presión llevados a cabo a 45 °C mostraron una inactivación de la PME más baja que a 25 °C. No obstante, todos los tratamientos de alta presión llevados a cabo a 50 °C mostraron más inactivación que a 45 °C. La PME se mostró muy resistente a todos los tratamientos de presión combinados con diferentes tiempos y temperaturas, los cuales no fueron capaces de inducir una importante inactivación de la enzima. La temperatura tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) en el caso de los tratamientos de 25 °C, que mostraron más inactivación que los llevados a cabo a 45 °C y 50 °C.

**Tabla 4. 3.** Actividades PME, PFO y POD en porcentaje de inactivación  $[(\%) = (X_{\text{control}} - X_{\text{tratado}}) / X_{\text{control}} \times 100]$  en las muestras tratadas por alta presión a 25, 45 y 50 °C

<i>Enzimas</i>	<i>PME</i>			<i>PFO</i>			<i>POD</i>		
	<u>25 °C</u>	<u>45 °C</u>	<u>50 °C</u>	<u>25 °C</u>	<u>45 °C</u>	<u>50 °C</u>	<u>25 °C</u>	<u>45 °C</u>	<u>50 °C</u>
<b>Muestras</b>									
<b>Tratadas<sup>a</sup></b>									
<b>400/15</b>	28,21	12,72	18,88	8,19	32,61	40,30	-14,3*	37,57	40,75
<b>400/30</b>	18,45	12,96	19,13	5,53	23,53	36,14	-5,89	40,78	70,12
<b>500/15</b>	23,81	20,08	21,46	16,99	35,49	40,27	-0,24	60,01	77,03
<b>500/30</b>	22,25	16,26	20,58	21,82	41,56	75,31	13,4	50,69	72,67

<sup>a</sup>Combinación de presión (MPa) y tiempo (min) de tratamiento

\*Los valores negativos representan el porcentaje de activación de la enzima con respecto a la muestra control.

Estos resultados están de acuerdo con diferentes estudios realizados sobre la PME en varios alimentos. En todos ellos se mostró que la PME es una enzima muy resistente a los tratamientos de alta presión y que se necesitan tratamientos altos de presión combinados con temperaturas y tiempos moderados para su inactivación total.

Hernández *et al.* (1998) encontraron que la actividad inicial de la PME del puré de tomate se redujo en un 35% después de un tratamiento de 150 MPa/15 min combinado con una temperatura de 30 °C, siendo esta combinación la que le dio mejor resultado para la inactivación de la PME. Crelier *et al.* (1995) mostraron que la PME del tomate se mostró en general muy

baroresistente, aunque menos estable en presencia de soluciones de  $\text{Ca}^{2+}$  tamponadas con ácido cítrico (pH 3,5 – 4,5) que en agua, y que su baroestabilidad disminuye a pHs ácidos. Ogawa *et al.* (1992) observaron una inactivación parcial (20%) de PME del zumo de naranja a 600 MPa durante 10 min a 23 °C, y concluyeron que para la inactivación total de la PME son necesarios tratamientos de 1000 MPa durante 10 min a temperatura ambiente, o 600 MPa a 57 °C y 10 min. Otros estudios sobre inactivación de esta enzima han demostrado que la combinación de alta presión con temperaturas moderadas del orden de 60 °C aumenta el grado de inactivación de estas enzimas (Cano *et al.*, 1997).

Sin embargo, Tongwongchai (2000) mostró que la PME comercial del tomate, fue barotolerante a todos los pHs (4-9) y presiones (200, 400 y 600 MPa) mostrando reducciones del orden de 10, 20 y 40% de inactivación respectivamente.

En diferentes trabajos se ha confirmado que la inactivación de la PME necesita tratamientos más altos de presión combinados con temperaturas más o menos moderadas (Seyderhelm *et al.*, 1996; Cano *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1998; Parish 1998 y Goodner *et al.*, 1999; Crelier, 2001; Krebbers *et al.*, 2003). Seyderhelm *et al.* (1996) indicó que la actividad de la PME en tampón fosfato es influenciada por el medio, y que a 600 MPa durante 10 min a 45 °C y a pH 7, solamente se pudo obtener una inactivación del 25%, mientras que en zumo de naranja, este mismo tratamiento llevó a una mayor inactivación enzimática debido al pH bajo del producto. Los autores indicaron que para obtener una inactivación total de la PME es necesario una presión mínima de 900 MPa a 45 °C durante 2 min.

La PFO del gazpacho también se mostró resistente a los tratamientos aplicados de alta presión (Tabla 4. 3). Sin embargo, la combinación de tratamientos de presión con temperaturas hasta 50 °C, mostró una mayor sensibilidad de la PFO a estos tratamientos. Se observó una menor reducción de la actividad PFO en los tratamientos de 400 MPa durante 30 min en comparación a los de 15 min a todas las temperaturas. Los tratamientos de 500 MPa fueron más efectivos en la reducción de la actividad PFO que los tratamientos de 400 MPa, sobre todo en los tratamientos de 30 min, a todas las temperaturas. La presión se mostró significativa así como el tiempo de tratamiento y la temperatura ( $P < 0,05$ ). La menor reducción de actividad PFO se registró en los tratamientos aplicados a

25 °C, mientras que la más importante inactivación de la enzima se observó a 50 °C en el tratamiento de 500 MPa durante 30 min donde la reducción fue del 75%. Esta importante reducción de actividad PFO en el gazpacho se debe esencialmente al tratamiento de alta presión aplicado, pero también podría estar relacionada con la presencia de la sal y sobre todo con el pH ácido que presenta el gazpacho (Jolibert *et al.*, 1994; Weemaes *et al.*, 1997).

Nuestros resultados sobre inactivación de la PFO son similares a los encontrados en otros trabajos. Eshtiaghi y Knorr (1993) mostraron que la disminución del pH mediante la adición de ácido cítrico puede llevar a un aumento en la inactivación de la PFO. Jolibert *et al.* (1994) y Weemaes *et al.* (1997) mostraron que la inactivación de diferentes PFOs mediante alta presión es más rápida a pH bajo. Según estos autores además del pH, la inactivación de esta enzima por la presión es afectada por la adición de sales, azúcares u otros componentes. Según Seyderhelm *et al.* (1996) la inactivación de la PFO en tampón tris-(hidroximetil)-aminometano (pH 7) requiere un tratamiento de 900 MPa durante 30 min a 45 °C. La PFO es una enzima muy resistente a la presión, siendo necesarios presiones muy elevadas para eliminarla completamente. En algunos casos se ha registrado un aumento de la actividad enzimática de la PFO tras los tratamientos de alta presión (Anese *et al.*, 1995; Cano *et al.*, 1997). En este contexto, se ha sugerido que la activación de la PFO en productos presurizados depende del tipo y el número de isoenzimas del sistema enzimático PFO, de forma similar a lo que ocurre durante la inactivación térmica en estas enzimas (Weemaes *et al.*, 1998 a).

La POD es una de las enzimas más importantes presentes en el gazpacho donde registró una actividad alta en comparación al resto de enzimas estudiadas (PFO y PME).

En este estudio, y en general, la POD se mostró bastante resistente a los tratamientos de presión aplicados a 25 °C, provocando incluso un aumento de la actividad POD. Los tratamientos de 400 MPa durante 15 y 30 min y el tratamiento de 500 MPa durante 15 min, mostraron un aumento de la actividad enzimática del orden del 14, 6 y 0,2%, respectivamente. No obstante, el tratamiento de 500 MPa durante 30 min a la misma temperatura fue el único que registró una reducción, aunque ligera, de la actividad enzimática POD (~ 13%). Estos fenómenos de

activación observados en algunos casos como consecuencia de la combinación de los tratamientos de alta presión a temperaturas ambientes o cercanas a las ambientes, pueden estar atribuidos a la configuración reversible y/o a los cambios en la conformación de la enzima o el sustrato (Ogawa *et al.*, 1990; Anese *et al.*, 1995).

Anese *et al.* (1995) mostraron que el efecto del pH de un extracto enzimático procedente de zumo de frutas afecta fuertemente a la activación enzimática, que alcanza su máximo a pH 6. En este mismo trabajo sobre la inactivación enzimática de la PFO y la POD trabajando a diferentes pHs (4,5-7,0), los autores observaron que la POD mostró una activación importante después de 1 min en los tratamientos de 300-500 MPa a 25 °C.

Diferentes estudios confirman nuestros resultados sobre la activación de la POD sometida a diferentes presiones y a temperatura ambiente. Hernández *et al.* (1998) investigó el efecto de la alta presión combinado con la temperatura sobre las enzimas de un puré de tomate, mostrando que la actividad POD del tomate incrementó con un tratamiento de 350 MPa aplicado a temperatura ambiente. Los autores también indicaron que el aumento de la presión del tratamiento hasta 500 MPa producía un incremento de la actividad POD a 20 °C, mientras que la combinación de presiones 400 - 500 MPa con temperaturas de 30 - 60 °C producía una inactivación parcial de esta enzima. Cano *et al.* (1997) obtuvieron resultados similares mostrando que a 20 °C la actividad POD de un puré de fresa incrementó ligeramente con un tratamiento de 300 MPa. Finalmente Seyderhelm *et al.* (1996) estudió la baroresistencia de diferentes enzimas incluyendo la POD, mostrándose ésta última resistente a presiones entre 600 y 700 MPa a 25 °C.

La aplicación de los mismos tratamientos experimentales de alta presión combinados con temperaturas de 45 y 50 °C sobre el gazpacho mostraron una mayor sensibilidad de la enzima que a 25 °C. Todos los tratamientos realizados a 50 °C indujeron más inactivación ( $P < 0,05$ ) que los tratamientos realizados a 45 °C en las mismas condiciones de presión y tiempo. Los tratamientos a 500 MPa se mostraron más eficaces ( $P < 0,05$ ) que los de 400 MPa aplicados a todas las temperaturas.

La POD es una enzima muy baroresistente y se necesitan tratamientos de alta presión combinados con temperaturas más o menos altas para producir una mayor inactivación. La temperatura ha mostrado el efecto más marcado en la inactivación de la POD en gazpacho.

La inactivación parcial más importante encontrada en los tratamientos de 500 MPa a 50 °C está directamente relacionada con el efecto combinado de la temperatura y la presión, pero probablemente el pH ácido del gazpacho podría tener un papel importante en la inactivación de esta enzima.

Anese *et al.* (1995) mostraron que a temperaturas altas, la POD es más sensible a la presión, aunque un pH bajo también influye en su actividad. Estos autores encontraron que sólo se puede llegar a la inactivación total de esta enzima con tratamientos de 900 MPa durante 1 min. Cano *et al.* (1997) mostró que la temperatura tiene un efecto significativo sobre la actividad de la POD que fue parcialmente inactivada en puré de fresa mediante un tratamiento de alta presión de 280 MPa y una temperatura de 45 °C.

En un estudio de Quaglia *et al.* (1996) fue necesario la aplicación de un tratamiento de 900 MPa durante 10 min a temperatura ambiente para producir una inactivación del 88% de la POD en judías verdes.

#### **4. 4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO (4 °C) SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL GAZPACHO PRESURIZADO A DIFERENTES PRESIONES Y TIEMPOS A 45 Y 50 °C**

Como se ha comentado anteriormente, ninguna de las enzimas estudiadas en el gazpacho se pudo inactivar completamente mediante los tratamientos aplicados. Sin embargo, se observaron importantes reducciones de las actividades enzimáticas en los tratamientos de alta presión realizados a 45 °C y 50 °C. Los tratamientos a 25 °C no se mostraron eficaces en la inactivación de las enzimas PFO y POD e incluso posteriormente se produjo una reactivación de la PME durante el almacenamiento (resultados no mostrados). Los tratamientos de alta presión a 25 °C también registraron una activación de la POD. Por lo tanto el

estudio de la evolución de las enzimas durante el almacenamiento, se realizó solamente con los tratamientos de alta presión a 45 y 50 °C.

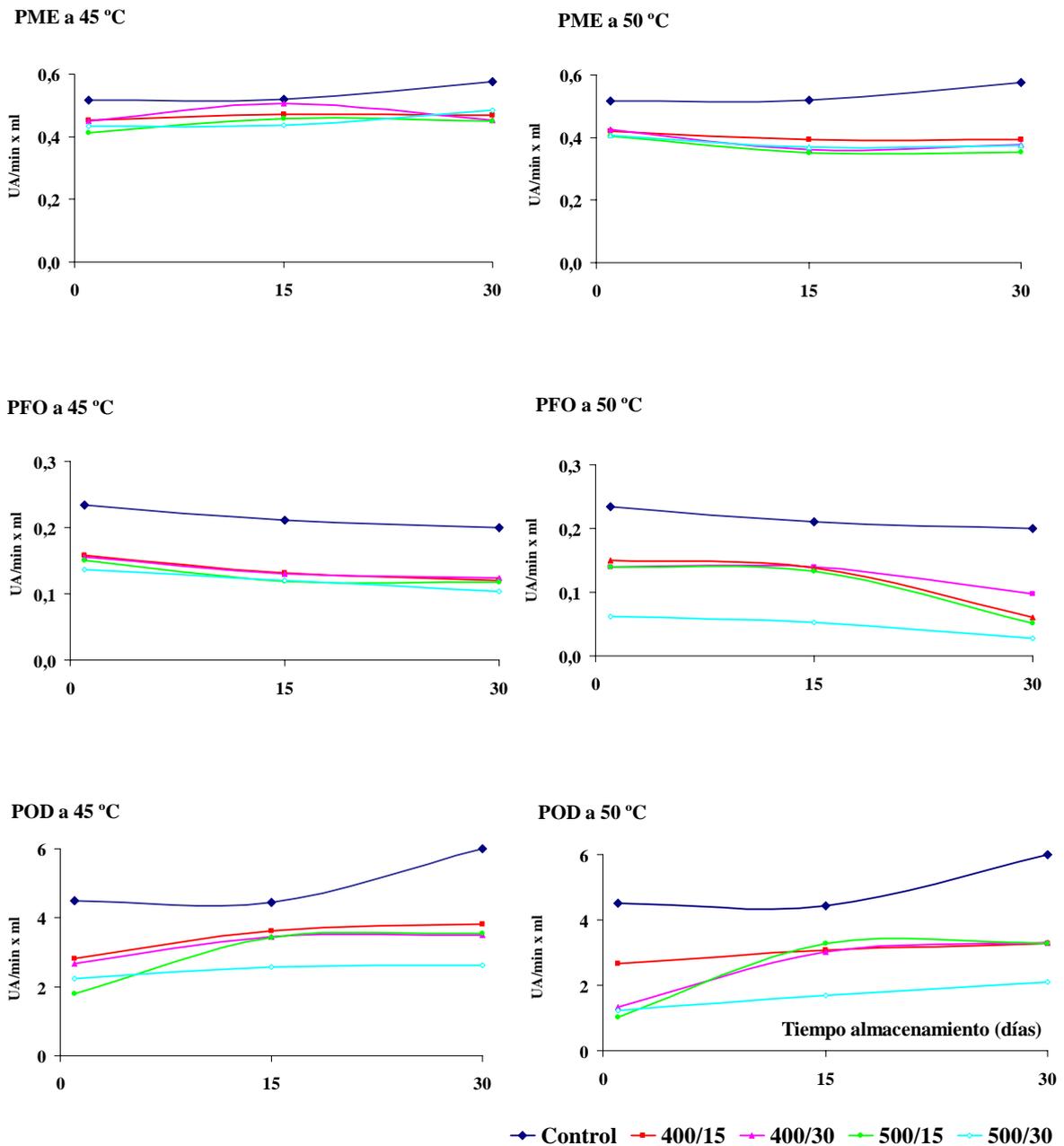
Los resultados obtenidos mostraron que la PME fue la enzima que tuvo la menor inactivación (21%) en comparación a la PFO y la POD, que presentaron un 75 y un 77% de inactivación respectivamente, en los tratamientos de 500 MPa a 50 °C (Tabla 4. 3).

La evolución de la actividad PME mostró una ligera recuperación en el día 15 de almacenamiento a 4 °C en todos los tratamientos de alta presión a 45 °C, pero especialmente en el tratamiento de 400 MPa durante 30 min, donde la actividad PME registró un 10% de incremento en el día 30 con respecto al primer día de almacenamiento. La actividad PME del gazpacho volvió a estabilizarse en el día 30 de almacenamiento en las muestras tratadas por alta presión, y no hubieron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre el día 1 y 30. Sin embargo, la muestra control mostró una actividad creciente durante el almacenamiento a 4 °C (Figura V. 5).

En los tratamientos de alta presión a 50 °C, las muestras tratadas por alta presión mostraron una ligera reducción de actividad PME al día 15. A los 30 días las muestras presurizadas se mostraron más estables que la muestra control, la cual registró una activación con respecto al primer día de almacenamiento a 4 °C.

La PFO mostró una inactivación importante de manera similar en todos los tratamientos de alta presión llevados a 45 y 50 °C, aunque la mayor reducción se produjo en los tratamientos de 50 °C. La evolución de las muestras tratadas a 45 °C fue similar en todos los tratamientos así como en la muestra control, registrándose una pequeña disminución de la actividad PFO durante el almacenamiento.

A 50 °C las muestras presurizadas se mostraron estables hasta el día 15 de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, en el día 30 se observó una gran pérdida de actividad en todas las muestras presurizadas, excepto en el tratamiento de 500 MPa/30 min que se mostró estable a lo largo de los 30 días de almacenamiento.



**Figura V. 5.** Evolución de las actividades enzimáticas PME, POD y PFO del gazpacho tratado por alta presión a 45 y 50 °C durante el almacenamiento de 30 días a 4 °C.

En cuanto a la POD, esta enzima se mostró muy sensible a los tratamientos de alta presión llevados a 50 °C, donde se registró una importante reducción de actividad en el primer día después del tratamiento (73% en tratamiento de 500 MPa/30 min). Durante el almacenamiento se observó una activación enzimática importante a los 30 días en la muestra control (~ 25%).

En las muestras presurizadas se registró una recuperación importante en todas las muestras presurizadas a 45 °C y a 50 °C, excepto en la muestra de 500 MPa/30 min que permaneció relativamente estable a lo largo del almacenamiento en los tratamientos a 45 °C. Esta misma muestra registró sin embargo una pequeña recuperación a 50 °C en el día 30 de almacenamiento a 4 °C, aunque quedó mucho más reducida que las otras muestras, con una reducción de actividad del 65% con respecto a la muestra control.

El conjunto de los valores de actividades enzimáticas obtenidas mostraron que la PME fue la enzima más resistente a los tratamientos de alta presión combinados con temperaturas.

Sin embargo, el tratamiento de 500 MPa durante 30 min se mostró efectivo en todas las enzimas especialmente a 50 °C, y las muestras tratadas a estas condiciones fueron más estables durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración que en el resto de los tratamientos, especialmente para la PFO y la POD.

#### **4. 5. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LA CONSERVACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL GAZPACHO**

Se realizó un análisis microbiológico de un gazpacho comercial pasteurizado con una vida útil de 30 días en refrigeración a 4 °C según etiquetaje, con el objetivo de compararlo con el gazpacho elaborado en nuestros laboratorios.

En el primer día de la elaboración del gazpacho, la muestra control mostró unos recuentos totales y de mohos y levaduras de 3,2 log UFC/ml. Las bacterias lácticas presentaron recuentos más bajos del orden de 1,4 log UFC/ml (Tabla 4. 4). Durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C, los recuentos microbianos en la muestra control descendieron progresivamente. La presencia de

ajo en el gazpacho podría tener un efecto protector sobre la calidad y el deterioro de este producto. La actividad antimicrobiana del ajo ha sido muy estudiada desde hace muchos años. Se ha mostrado que el extracto de ajo en concentraciones de 10-20 g/l inhibe el crecimiento de los microorganismos, y a más altas concentraciones es germicida (Mantis *et al.*, 1979; Kumar *et al.*, 1998). Por otra parte, el pH bajo del gazpacho también constituye un factor positivo para su conservación, y tiene un papel determinante en la estabilidad microbiológica de este producto.

El gazpacho comercial, por su parte, mostró recuentos totales similares a los del gazpacho preparado en el laboratorio. Sin embargo, los recuentos de bacterias lácticas y mohos y levaduras fueron más altos en el caso del gazpacho industrial. Los recuentos de los microorganismos en el gazpacho comercial se mantuvieron estables hasta los 30 días de almacenamiento a 4 °C.

La aplicación de los diferentes tratamientos de alta presión a 45 °C sobre el gazpacho elaborado en laboratorio fue muy efectiva para inactivar totalmente los mohos y levaduras, así como las bacterias lácticas, que no fueron detectadas en ninguna de las muestras presurizadas.

Aunque los tratamientos de 400 MPa inactivaron totalmente las bacterias lácticas así como los mohos y levaduras, las muestras tratadas a esta presión presentaron recuentos totales muy bajos. Sin embargo, los tratamientos de 500 MPa inactivaron totalmente los microorganismos en el día 1 del tratamiento. Tanto las muestras presurizadas a 400 MPa como las presurizadas a 500 MPa se mostraron estables durante todo el tiempo de almacenamiento, y no se detectó crecimiento microbiano. Los recuentos totales del tratamiento de 400 MPa durante 15 y 30 min se redujeron completamente al día 15 hasta niveles de no detección.

El gazpacho tratado por alta presión permaneció sin alteraciones microbiológicas durante todo el tiempo de almacenamiento a 4 °C. Así los tratamientos aplicados a 45 °C fueron suficientes para la inactivación de los microorganismos presentes en el gazpacho, y por lo tanto se consiguió una buena conservación del producto. Los tratamientos aplicados a 50 °C mostraron

recuentos por debajo del límite de detección desde el día 1 (resultados no mostrados).

**Tabla 4. 4.** Recuentos microbianos (Log UFC/ml) de los gazpachos comerciales, control y tratados por alta presión a 45 °C

<i>Gazpacho</i>	<i>Tiempo de almacenamiento (días)</i>		
	1	15	30
<b>*Comercial</b>			
Recuentos totales	3,04	3,06	3,08
Bacterias lácticas	3,08	3,08	3,07
Mohos y levaduras	4,03	4,17	3,57
<b>Control</b>			
Recuentos totales	3,21	2,70	2,48
Bacterias lácticas	1,38	1,48	0,78
Mohos y levaduras	3,19	2,70	1,60
<b>Tratados<sup>a</sup> (recuentos totales)</b>			
400/15	1,26	ND <sup>b</sup>	ND
400/30	0,81	ND	ND
500/15	ND	ND	ND
500/30	ND	ND	ND

<sup>a</sup>Combinación de presión (MPa) y tiempo (min) de tratamiento

<sup>b</sup>ND: límite de detección

\* Días de almacenamiento del gazpacho comercial: 1 (a partir del día de la compra), 15 (15 días antes de su caducidad) y 30 (día de caducidad)

De acuerdo con Smelt (1998) los mohos y levaduras son poco resistentes a pHs bajos e inferiores a 4, los cuales sensibilizan fuertemente los microorganismos sometidos a altas presiones. Por otro lado, Porretta *et al.* (1994) en un estudio sobre los efectos de las altas presiones sobre la calidad de zumos de tomate, mostraron que un tratamiento a 500 MPa y 30 min condujo a la estabilización microbiológica del producto independientemente de su pH. Este trabajo coincide con el de Ogawa *et al.* (1990) donde se estudió el efecto de la alta presión (100 - 600 MPa), sobre mohos y levaduras inoculados en zumo de mandarina. Según los autores, la destrucción de los microorganismos inoculados no fue provocada por el pH ácido del producto y un tratamiento de 350 MPa durante 30 min y otro de 600 MPa durante 10 min a temperatura ambiente, permitieron la disminución de la carga microbiana en cinco unidades logarítmicas con respecto a la carga inicial. Otras experiencias (Hoover *et al.*, 1989) llevadas a

cabo sobre zumos de fruta ácidos inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* a  $10^6$  UFC/ml, y después sometido a tratamientos de 290 MPa durante 30 min a temperatura ambiente, dieron como resultado la inactivación total de las levaduras.

En nuestro estudio los recuentos microbianos disminuyeron durante el almacenamiento del producto sobre todo las muestras presurizadas. Esta disminución se debe a la inducción mediante las altas presiones de daños subletales en algunos microorganismos y que no son capaces de reparar con el tiempo, provocando su muerte (De Lamo *et al.*, 2004).

#### 4. 6. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN EN EL COLOR DEL GAZPACHO

El color del gazpacho es uno de los parámetros de calidad más apreciados por el consumidor. Éste, es de un color característico, aunque puede mostrar algunas variaciones dependiendo de las proporciones relativas de tomate y pimiento en su formulación, ya que son los ingredientes que aportan mayoritariamente los pigmentos responsables de su color peculiar.

El color de la formulación de gazpacho empleada en este trabajo se comparó con dos marcas comerciales presentes en el mercado. En la Tabla 4. 5 se muestran las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , de dos gazpachos comerciales y de la formulación realizada en el laboratorio, así como la evolución de dichos parámetros tras 30 días de almacenamiento en refrigeración. Las dos muestras comerciales, presentaron un color muy similar entre si, con mayor luminosidad y pureza de color que los gazpachos obtenidos en el laboratorio. Así mismo, la evolución de las coordenadas de color de los primeros tras el almacenamiento de 30 días fue a penas perceptible mientras que los segundos, sufrieron una ligera disminución en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

Es razonable pensar que estas modificaciones observadas, tanto en las muestras frescas como en su evolución durante el almacenamiento se deban a la acción de la PFO y POD (Gomes y Ledward, 1996, Weemaes *et al.*, 1998) ya que los gazpachos producidos en el laboratorio no fueron sometidos a ningún

tratamiento de inactivación de estas enzimas, a diferencia de los comerciales que son sometidos a un tratamiento de pasteurización previo para conseguir una estabilidad enzimática a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.

Respecto al efecto de la alta presión sobre el color (Tabla 4. 6), se observó, en general, un aumento de las tres coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , con el incremento de la presión. Sin embargo, el tiempo de tratamiento no se reveló como una variable de importancia en el color presentado por las muestras.

**Tabla 4. 5.** Evolución del color de los gazpachos comerciales y del gazpacho elaborado en el laboratorio durante el almacenamiento

<i>Parámetros</i>	$L^*$		$a^*$		$b^*$	
	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
<b>Almacenamiento (días)</b>						
<b>Muestras</b>						
Gazpacho 1	31,5 ± 0,1	31,2 ± 0,8	28,9 ± 0,2	27,8 ± 0,7	17,9 ± 0,1	17,2 ± 0,5
Gazpacho 2	32,9 ± 0,1	34,7 ± 0,3	25,9 ± 0,3	25,1 ± 0,1	17,0 ± 0,2	16,5 ± 0,1
Control	26,0 ± 0,2	24,9 ± 0,3	21,2 ± 0,3	18,3 ± 0,3	12,4 ± 0,1	11,6 ± 0,3

Gazpacho 1: marca comercial 1

Gazpacho 2: marca comercial 2

Control: gazpacho elaborado en el laboratorio

La evolución del color a lo largo del almacenamiento, mostró un comportamiento similar en las tres coordenadas de color en las muestras tratadas por alta presión: el primer día, todas ellas presentaron el valor máximo mientras que a los 15 días de almacenamiento descendieron ligeramente para mantenerse estables hasta el día 30. Sin embargo, la muestra control presentó un descenso progresivo a lo largo de los 30 días de almacenamiento. Es posible que el comportamiento en la evolución del color del gazpacho control sea predominante el efecto del pardeamiento producido por la PFO ya que a medida que pasa el tiempo, el color es menos puro, debido probablemente al desarrollo de pigmentos pardos. Sin embargo, en las muestras tratadas por alta presión, se observó que el incremento de la presión se correspondió con un incremento en la luminosidad respecto al control, especialmente el primer día de almacenamiento y un ligero descenso entre el día 1 y el día 15, momento a partir del cual se mantuvo

constante. Estos cambios hacen pensar que quizás haya más fenómenos implicados, derivados de posibles modificaciones en el tamaño de las partículas dispersas en el gazpacho como consecuencia de la aplicación de la presión.

Tras la aplicación de la presión podría producirse una disgregación de moléculas pécticas, posiblemente por efecto de una mayor hidratación individual de las mismas; esto motivaría un incremento de la dispersión de la luz que se traduciría en valores mayores de luminosidad.

Probablemente, durante el almacenamiento, se produciría cierto grado de reagregación de las pectinas, relacionado con la reducción de la actividad de la PME por los diferentes tratamientos aplicados, y que conduciría a un ligero aumento del valor de este parámetro. Asimismo, las actividades enzimáticas de la PFO y la POD, las cuales disminuyeron por acción de las altas presiones, también serían en parte responsables de los cambios observados, sobre todo a 500 MPa, tratamientos a los que la pureza del color es mayor, indicando con ello que ha habido poco desarrollo de colores pardos. Es posible que la actividad enzimática residual contribuya a las variaciones de color que presentaron las muestras de gazpacho tratadas por alta presión a lo largo del almacenamiento. Tampoco habría que descartar una pequeña reversión de la inactivación después del tratamiento aunque ésta no parece ser suficiente como para deteriorar progresivamente su aspecto.

Por otra parte, hay que destacar que las diferencias de color observadas en el primer día entre el control y, las diferentes muestras tratadas por alta presión son muy pequeñas, de hecho, el análisis sensorial no reveló diferencias detectables por los catadores (ver apartado 4. 7).

Porretta *et al.* (1995) en su estudio sobre el efecto de alta presión sobre la calidad del zumo de tomate atribuyó el aumento en las coordenadas de color de las muestras tratadas por alta presión a la homogeneización y a la aglomeración y compactación de las partículas del zumo de tomate y por lo tanto al incremento en su viscosidad.

<i>Parámetros</i>												
<i>L*</i>			<i>a*</i>			<i>b*</i>			<i>ΔE</i>			
Conservación (días)												
	1	15	30	1	15	30	1	15	30	1	15	30
<b>Muestras</b>												
Control	26,04 ± 0,2	25,48 ± 0,1	24,92 ± 0,3	21,15 ± 0,3	19,71 ± 0,1	18,28 ± 0,3	12,44 ± 0,1	12,02 ± 0,2	11,60 ± 0,3			
<b>Tratamiento</b>												
400/15	27,46 ± 0,1	25,79 ± 0,1	25,83 ± 0,2	21,77 ± 0,4	21,49 ± 0,4	20,36 ± 0,2	12,89 ± 0,1	11,70 ± 0,1	11,52 ± 0,2	1,61	1,83	2,28
400/30	27,72 ± 0,1	26,07 ± 0,2	25,46 ± 0,1	21,43 ± 0,1	20,69 ± 0,4	20,04 ± 0,3	12,56 ± 0,1	11,41 ± 0,2	11,77 ± 0,1	1,71	1,30	1,85
500/15	29,44 ± 0,3	26,56 ± 0,1	26,52 ± 0,2	22,45 ± 0,3	20,62 ± 0,3	20,56 ± 0,1	13,57 ± 0,1	11,35 ± 0,1	12,33 ± 0,1	3,81	1,56	2,88
500/30	29,74 ± 0,4	26,83 ± 0,3	27,04 ± 0,1	23,05 ± 0,4	21,03 ± 0,3	20,43 ± 0,1	13,69 ± 0,2	11,67 ± 0,1	11,92 ± 0,1	4,34	1,92	3,04

**Tabla 4. 6.** Evolución del color de los gazpachos control y tratados durante el almacenamiento a 4 °C

<sup>a</sup>Combinación de presión (MPa) y tiempo (min) de tratamiento

En otro estudio de Krebbers *et al.* (2003), sobre el efecto combinado de altas presiones con diferentes temperaturas en puré de tomate, también se observó un aumento en las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  tras la aplicación de tratamientos entre 300 y 700 MPa a 20 °C. El autor relaciona este aumento con las modificaciones en la estructura y la consistencia del puré debido a los tratamientos aplicados.

Hong *et al.* (2001) en un trabajo sobre ajo troceado, mostró que la muestra no tratada por alta presión presentó una reducción de la luminosidad con el almacenamiento presentando un ligero pardeamiento, debido a la acción de la PFO, a lo largo del almacenamiento. Sin embargo, la aplicación de alta presión conllevó a un aumento significativo de la luminosidad del producto. El autor también mostró que la combinación de tratamientos de alta presión con ácidos orgánicos produce un retraso del pardeamiento.

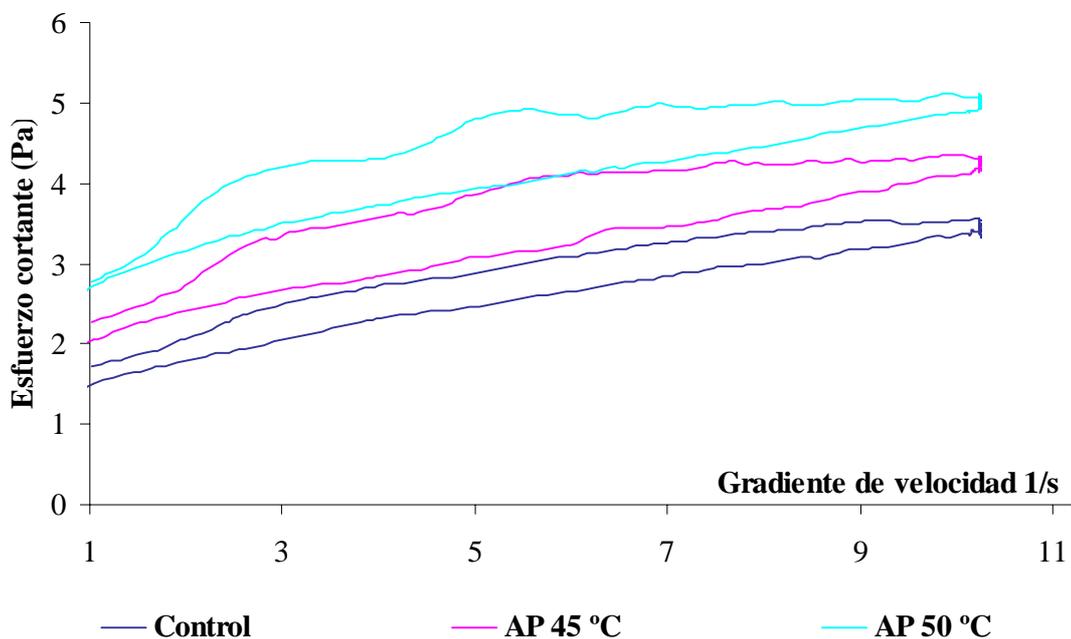
Otro estudio sobre el tratamiento de un puré de banana por alta presión (Palou *et al.*, 1999), mostró que los tratamientos aplicados a 25 °C de 517 y 689 MPa durante 10 min mantuvieron estables los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  iniciales del puré de banana. Sin embargo, durante el almacenamiento de este producto se registraron cambios en el color del puré, que según los autores están relacionados con la actividad residual de la PFO que resulta en un oscurecimiento del puré. Castellari *et al.* (2000) mostró que un tratamiento de 600 MPa durante 5 min y un tratamiento térmico (60 °C, 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 tratamiento térmico.

#### 4. 8. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DEL GAZPACHO

El estudio reológico del gazpacho se realizó en muestras tratadas a 500 MPa durante 30 min, a 45 y 50 °C, realizándose el seguimiento durante el almacenamiento a 4 °C. Los ensayos realizados consistieron en la obtención de las curvas de flujo ascendente y descendente en un intervalo de gradientes de velocidad entre 0 y 10 s<sup>-1</sup>.

La Figura IV. 7 muestra, a modo de ejemplo, las curvas de flujo tipo obtenidas

en las muestras de gazpacho tratadas por alta presión, así como la muestra control. La información general que de dichas representaciones puede extraerse en todos los casos, es que el gazpacho muestra un comportamiento no newtoniano, dependiente del tiempo, de carácter tixotrópico, el cual se pone de manifiesto a través de la presencia de un área de histéresis entre las curvas ascendente y descendente, cuando se cizallan las muestras. El carácter tixotrópico revela que la variación de la viscosidad de la muestra no es únicamente función de la intensidad del esfuerzo aplicado sino también del tiempo de aplicación del mismo. Este fenómeno es típico de alimentos que presentan una elevada concentración de partículas en dispersión, tal como el gazpacho, susceptibles de interactuar entre sí, las cuales en condiciones de reposo de la muestra propician la creación de una estructura más o menos ordenada espacialmente donde queda retenida la fase acuosa. Dicha estructura al ser cizallada se destruye a medida que aumenta el tiempo de aplicación del esfuerzo. El grado de destrucción estructural producido en las diferentes muestras vendrá dado, por tanto, por el área de histéresis (Tabla 4. 7).



**Figura IV. 7.** Curvas de flujo ascendente y descendente de los valores promedios de gazpacho control y tratado por alta presión

Los resultados obtenidos muestran que el grado de estructuración que presentan las muestras al inicio del almacenamiento es similar ( $P>0,05$ ) independientemente del tratamiento aplicado. Sin embargo, a partir de los 15 días de almacenamiento en refrigeración, los gazpachos tratados por alta presión presentan mayor área de histéresis respecto al control, siendo significativas ( $P<0,05$ ) las diferencias debidas al tratamiento. En lo que se refiere al mantenimiento de la estructura de las muestras, y teniendo en cuenta los tratamientos individuales a lo largo de los 30 días, cabe mencionar que ésta, en general, se mantiene estable en todos los casos, indicando con ello que no se han producido cambios detectables en el grado de interacciones entre partículas responsables del establecimiento de la red estructural del gazpacho. Asimismo, teniendo en cuenta los dos tratamientos de alta presión aplicados, el que presenta mejor comportamiento en el almacenamiento es el tratado a 50 °C.

**Tabla 4. 7.** Valores promedios del índice de consistencia (K), índice de comportamiento de flujo (n) e histéresis de las muestras control y tratadas por alta presión durante 30 días de almacenamiento a 4 °C

	<i>n ascendente</i>			<i>n descendente</i>		
Días						
	Control	*AP 45	AP 50	Control	AP 45	AP 50
1	0,271 <sup>ax</sup>	0,272 <sup>ax</sup>	0,255 <sup>ax</sup>	0,378 <sup>ax</sup>	0,366 <sup>ax</sup>	0,267 <sup>bx</sup>
15	0,337 <sup>ay</sup>	0,280 <sup>bx</sup>	0,241 <sup>bx</sup>	0,365 <sup>ax</sup>	0,312 <sup>by</sup>	0,266 <sup>cx</sup>
30	0,340 <sup>ay</sup>	0,277 <sup>bx</sup>	0,239 <sup>bx</sup>	0,380 <sup>ax</sup>	0,271 <sup>bz</sup>	0,256 <sup>bx</sup>
	<i>K ascendente</i>			<i>K descendente</i>		
1	2,412 <sup>ax</sup>	2,664 <sup>ax</sup>	3,020 <sup>bx</sup>	1,542 <sup>ax</sup>	1,812 <sup>bx</sup>	2,353 <sup>cx</sup>
15	1,755 <sup>ax</sup>	2,463 <sup>bx</sup>	3,211 <sup>cx</sup>	1,468 <sup>ax</sup>	1,766 <sup>ax</sup>	2,689 <sup>bx</sup>
30	1,768 <sup>ax</sup>	2,495 <sup>bx</sup>	2,937 <sup>cx</sup>	1,458 <sup>ax</sup>	2,197 <sup>bx</sup>	2,456 <sup>cx</sup>
Área de Histéresis						
	Control		AP 45	AP 50		
1	6,347 <sup>ax</sup>		6,192 <sup>ax</sup>	6,516 <sup>ax</sup>		
15	3,547 <sup>ay</sup>		5,882 <sup>bx</sup>	5,735 <sup>by</sup>		
30	4,426 <sup>ay</sup>		4,506 <sup>ay</sup>	5,584 <sup>by</sup>		

AP: Tratamiento de alta presión 500 MPa durante 30 min a 45 °C y 50 °C.

\*Las letras (a, b, c) dentro de la misma fila para cada parámetro, indican diferencias significativas entre tratamientos, y las letras (x, y, z) muestran diferencias significativas ( $P<0,05$ ) dentro de una columna entre días de almacenamiento.

Para evaluar la consistencia del gazpacho, las curvas de los reogramas, ascendentes y descendentes fueron ajustadas independientemente a la ley de potencia ( $\sigma = K \gamma^n$ ), la cual presentó el mejor ajuste entre los modelos matemáticos normalmente utilizados en este tipo de alimentos. Este modelo posee dos parámetros que relacionan el esfuerzo cortante con el gradiente de velocidad aplicado, siendo K el índice de consistencia, relacionado con la viscosidad del producto y n el índice de comportamiento al flujo que indica si el fluido se acerca al comportamiento newtoniano (valores de n próximos a 1) o al no newtoniano (valores de n alejados de 1).

En referencia al índice de comportamiento al flujo, los tres tratamientos presentaron valores bajos, no mostrando en general diferencias entre tratamientos y a lo largo del almacenamiento. Estos valores indican que el comportamiento está muy alejado del carácter newtoniano. Esta respuesta es característica de alimentos que poseen gran cantidad de partículas en dispersión, como el gazpacho, entre las que cabe destacar moléculas pécticas, pequeñas partículas de tejido vegetal y gotas de aceite, las cuales son susceptibles de interactuar en mayor o menor grado y son responsables de que la respuesta entre la deformación aplicada y el esfuerzo que se opone a la fluencia no sea lineal.

En lo que se refiere a la consistencia, el tratamiento de alta presión a 50 °C mostró el mayor índice ( $P < 0,05$ ) en comparación con los otros tratamientos que mostraron valores similares en la curva ascendente durante el periodo inicial. Sin embargo, a lo largo del almacenamiento, se evidenció una diferencia significativa entre el control y los dos tratamientos de alta presión, los cuales dieron lugar a muestras más consistentes y estables. Por otra parte, los valores del índice de consistencia de las muestras individuales no mostraron modificaciones de forma significativa ( $P > 0,05$ ) a lo largo del almacenamiento.

Posiblemente, este incremento en la consistencia de los gazpachos tratados por alta presión se deba a un incremento de las interacciones entre partículas pécticas, ya que la alta presión promueve este tipo de interacciones (Porretta *et al.*, 1995; Rovere *et al.*, 1997; Fernández García, 2001; Krebbers *et al.*, 2003). Por ello, el mayor incremento de la viscosidad se debería a la formación de estructuras de mayor tamaño, aunque dentro de las dimensiones coloidales, formadas posiblemente por distintas asociaciones

entre moléculas y partículas pécticas. Asimismo, la alta presión también podría incrementar el grado de hidratación de estas moléculas y partículas mediante el mismo tipo de interacciones mencionado, lo cual se traduciría no sólo en un aumento de la consistencia sino también en una mayor capacidad de retención de agua como se ha observado en los gazpachos tratados por alta presión.

Krebbers *et al.* (2003) encontraron resultados similares, mostrando que la aplicación de la alta presión induce un aumento lineal de la viscosidad, incremento que fue confirmado por análisis sensorial. Estos autores también mostraron que la viscosidad de las muestras registró un ligero incremento durante el almacenamiento y concluyeron que la alta presión mejora significativamente la capacidad de retención de agua y la sinéresis respecto a los procesos convencionales.

Es necesario remarcar que la manipulación de la muestra en la obtención de datos reológicos, y en especial, en muestras dependientes del tiempo, es de gran importancia y que en ocasiones resulta imposible simular la situación real de almacenamiento del producto. A este respecto, las diferencias observadas visualmente en las muestras, en los diferentes periodos de almacenamiento, son de gran importancia y, sin embargo, no quedan totalmente reflejadas en el análisis de los datos reológicos. Así, el gazpacho control presentó, en todos los periodos de almacenamiento, separación de la fase acuosa, mientras que los tratados por alta presión no presentaron en ningún caso este defecto. Este fenómeno no se observó en la evaluación reológica, ya que la toma de muestra conlleva la destrucción de la estructura, y para reproducir al máximo las curvas de flujo, las muestra se redispersaron y se dejaron en reposo en el sensor del reómetro durante un tiempo, el cual permitió que se restablecieran las interacciones entre partículas, aunque éste, evidentemente, no fue tan prolongado para que pudiera ponerse de manifiesto el fenómeno de separación fases.

#### **4. 7. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL GAZPACHO**

El gazpacho tiene un sabor complejo debido a la mezcla de los ingredientes vegetales y condimentos que lo componen. Este producto tiene características organolépticas muy importantes: un peculiar sabor, color, aroma y viscosidad.

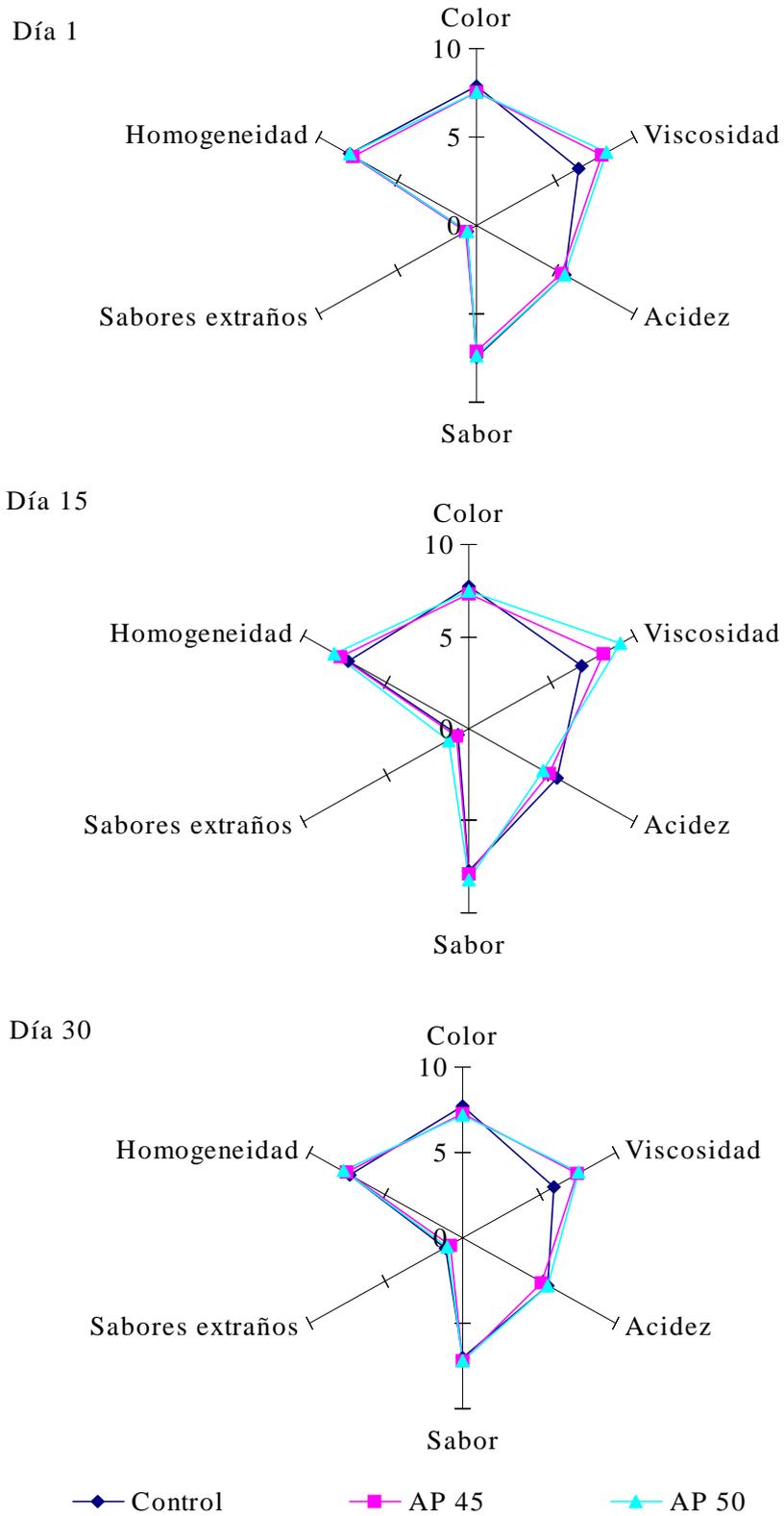
El análisis sensorial del gazpacho se realizó en las muestras tratadas a 500 MPa durante 30 min a 45 y 50 °C, condiciones de trabajo dónde se obtuvieron los mejores resultados de inactivación enzimática y microbiológica en este producto. Todas las muestras analizadas (control, 500 MPa / 45 °C y 50 °C durante 30 min) presentaron similares características sensoriales y fue difícil distinguir entre el color, el aroma y el sabor de estas muestras (Figura IV. 8).

En el primer día tras los tratamientos de alta presión, los catadores indicaron que las muestras presurizadas presentaron una viscosidad mayor que la que presentó la muestra control, que calificaron como ligeramente acuosa. Los catadores apuntaron también que las muestras presurizadas a 50 °C mostraron una viscosidad más elevada que las muestras tratadas a 45 °C, hecho que fue valorado positivamente.

La evolución de las muestras de gazpacho durante todo el tiempo de almacenamiento, fue similar que el primer día y los mismos resultados se encontraron en el día 15 y 30 del análisis sensorial. Sin embargo, los catadores percibieron diferencias notables en la viscosidad entre las muestras, lo que les permitió identificar la muestra diferente en el test triangular de manera significativa en el caso de la muestra tratada a 50 °C y a 45 °C ( $P < 0,01$ ). A lo largo del almacenamiento se registró un aumento de la viscosidad en todas las muestras. Los tratamientos de alta presión aplicados no tuvieron efecto sobre las características organolépticas especialmente en aroma, sabor y color del gazpacho, los cuales fueron apreciados por el panel de los catadores. Por otra parte, no hubo presencia de aromas o sabores extraños y los catadores calificaron de muy buenos los gazpachos presurizados.

El cambio producido a nivel de viscosidad fue positivo y los catadores evaluaron mejor a las muestras presurizadas con respecto a la muestra control. El gazpacho presurizado tuvo mejor consistencia y homogeneidad. Los resultados encontrados están

de acuerdo con los pocos trabajos publicados sobre el efecto de altas presiones en las características sensoriales de los zumos vegetales. La alta presión modifica poco estas características y no se detecta presencia de sabores u olores a “cocido” (Cheftel, 1991).



**Figura IV. 8.** Análisis sensorial del gazpacho control y tratado por alta presión (AP) a 45 °C y 50 °C durante 30 días de almacenamiento a 4 °C

# **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **ZUMO DE UVA**

## 5. 1. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE CLARIFICACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LOS ZUMOS DE UVA

Los análisis de composición se llevaron a cabo en dos lotes de zumo de uva que fueron sometidos previamente a dos diferentes tratamientos de clarificación: microfiltración (MC) y clarificación mediante enzimas pectolíticas (CE).

Los resultados del análisis físico-químico de los dos lotes de zumos de uva y su evolución durante los 60 días de almacenamiento en refrigeración se muestran en la Tabla 5.1. Se evaluó el pH, los grados Brix y la acidez total en ambos lotes con el fin de comparar el efecto de cada método de clarificación sobre la composición de estos zumos de uva (Tabla 5. 1).

**Tabla 5. 1.** Comparación de dos métodos de clarificación y su efecto sobre la composición del zumo de uva durante 60 días de almacenamiento a 4 °C

<i>Zumo de uva</i>	<i>pH</i>	<i>° Brix</i>	<i>Acidez total</i>
<b>Día 1</b>			
<b>MC</b>	3,1 ± 0,04	16,7 ± 0,7	3,5 ± 0,7
<b>CE</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,8 ± 0,4
<b>Día 30</b>			
<b>MC</b>	3,0 ± 0,03	15,1 ± 0,7	4,5 ± 0,0
<b>CE</b>	3,2 ± 0,08	15,1 ± 2,9	4,5 ± 0,4
<b>Día 60</b>			
<b>MC</b>	3,0 ± 0,06	14,3 ± 2,4	5,6 ± 0,07
<b>CE</b>	3,2 ± 0,1	14,0 ± 2,8	5,1 ± 0,2

MC: zumo de uva microfiltrado

CE: zumo de uva clarificado mediante enzimas pectolíticas

Acidez total: expresada en gramos de ácido tartárico/l

En el primer día después de los tratamientos de clarificación (MC y CE), la composición de los zumos de uva no se vió afectada ( $P > 0,05$ ) por el método de clarificación.

Los pHs de los lotes de zumo de uva MC y CE presentaron valores muy estables, y no se vieron afectados ni por el método de clarificación ni por el almacenamiento en refrigeración, no registrándose diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre sí.

Los zumos de uva mostraron valores más bajos en grados brix a los 30 días de almacenamiento, así como a los 60 días, hecho que se debe especialmente a la degradación de los azúcares del zumo de uva por parte de los propios microorganismos presentes en él, especialmente las levaduras. Tanto el zumo de uva MC como el zumo de uva CE mostraron la misma evolución en grados Brix durante el almacenamiento en refrigeración.

En cuanto a la acidez total de los zumos, ésta mostró una evolución creciente durante el almacenamiento. Los ácidos son liberados en el zumo básicamente por la acción de los microorganismos, éstos últimos degradan los azúcares y liberan ácidos durante la fermentación. No obstante, como hemos comentado anteriormente, el pH se mantuvo estable y no mostró diferencias significativas durante el almacenamiento en frío.

El uso de enzimas pectolíticas para la clarificación del zumo de uva no produjo diferencias en la composición general de los zumos obtenidos. Estos resultados confirman los encontrados por Liu *et al.* (1987) donde mostraron que el uso de enzimas pectolíticas para la clarificación de los zumos de uva, no modifica la acidez total de éstos y tampoco influye en el contenido alcohólico de los vinos. El estudio de Lao *et al.* (1996) demostró que las enzimas pectolíticas no modifican el pH, sólidos solubles, acidez total, y tampoco el contenido de etanol en los vinos blancos. Los mismos resultados han sido obtenidos en el caso de la clarificación por la microfiltración (Gaillard y Berger, 1984).

El zumo de uva está expuesto a una gran y rápida alteración microbiológica y físico-química debido a su composición en ácidos orgánicos y enzimas, pero especialmente como consecuencia de su elevado contenido en azúcares, cuya degradación mediante las levaduras autóctonas conlleva a una rápida fermentación. Los tratamientos térmicos usados normalmente en su

conservación producen defectos del color y del sabor, causando una pérdida de calidad (Castellari *et al.*, 1997).

En este trabajo se ha estudiado la alta presión como proceso de conservación del zumo de uva para la obtención de un nuevo producto de alta calidad, sin inducir cambios sustanciales en las características físico-químicas y organolépticas.

## **5. 2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE ALTAS PRESIONES SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL ZUMO DE UVA**

Se han ensayado diferentes combinaciones de alta presión y temperaturas sobre el zumo de uva: 400 MPa/2 °C, 400 MPa/40 °C y 500 MPa/2 °C durante 10 min en todos los tratamientos. Estos tratamientos fueron escogidos teniendo en cuenta la composición físico-química y características microbiológicas del zumo de uva, producto perecedero que tiende a deteriorarse fácilmente. Por este motivo tras su obtención debe mantenerse a temperaturas de refrigeración a fin de evitar crecimiento microbiano y su pardeamiento. El tratamiento de 400 MPa a 40 °C fue propuesto con el objetivo de inducir mayor inactivación microbiana.

Los resultados de los análisis físico-químicos en ambos lotes de zumo de uva tratados por alta presión, y sus correspondientes controles, así como su evolución durante 60 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C se muestran en las Tablas 5. 2a y 5. 2b.

Los tratamientos de alta presión no mostraron ningún efecto sobre la composición de los zumos de uva. Los valores de pH, grados Brix y acidez total fueron similares ( $P > 0,05$ ) entre los controles y las muestras sometidas a alta presión para ambos lotes de zumos de uva en el primer día del tratamiento.

El pH del zumo de uva se mantuvo estable durante todo el tiempo de almacenamiento en refrigeración, tanto en las muestras control como en las sometidas a la alta presión.

Los valores de grados Brix no registraron cambios en las muestras presurizadas. Sin embargo, las muestras control de zumo de uva se vieron afectadas ( $P < 0,05$ ) durante el almacenamiento, y mostraron valores más bajos de grados Brix, indicando un inicio de fermentación y de deterioro en el producto, debido a la acción enzimática y microbiológica de los microorganismos activos en el zumo de uva, especialmente levaduras y bacterias.

**Tabla 5. 2a.** Efecto de las diferentes combinaciones de presión /temperatura sobre la composición del zumo de uva microfiltrado (MC) durante 60 días de almacenamiento en refrigeración

<i>Zumo de uva MC</i>	<i>PH</i>	<i>° Brix</i>	<i>Acidez total</i>
<b>Día 1</b>			
<b>Control</b>	3,1 ± 0,04	16,7 ± 0,7	3,5 ± 0,7
<b>400/2 °C</b>	3,1 ± 0,08	16,7 ± 0,7	4,0 ± 0,7
<b>400/40 °C</b>	3,1 ± 0,08	16,7 ± 0,7	4,0 ± 0,02
<b>500/2 °C</b>	3,1 ± 0,08	16,7 ± 0,7	4,0 ± 0,1
<b>Día 15</b>			
<b>Control</b>	3,1 ± 0,01	16,7 ± 0,7	3,6 ± 0,3
<b>400/2 °C</b>	3,1 ± 0,02	16,7 ± 0,7	4,3 ± 0,3
<b>400/40 °C</b>	3,0 ± 0,0	16,7 ± 0,7	4,3 ± 0,3
<b>500/2 °C</b>	3,1 ± 0,01	16,7 ± 0,7	4,4 ± 0,3
<b>Día 30</b>			
<b>Control</b>	3,0 ± 0,03	15,1 ± 0,7	4,5 ± 0,0
<b>400/2 °C</b>	3,1 ± 0,08	16,6 ± 0,8	4,4 ± 0,2
<b>400/40 °C</b>	3,1 ± 0,1	16,6 ± 0,8	4,4 ± 0,3
<b>500/2 °C</b>	3,1 ± 0,03	16,6 ± 0,8	4,4 ± 0,3
<b>Día 45</b>			
<b>Control</b>	3,1 ± 0,1	14,7 ± 2,3	5,0 ± 0,3
<b>400/2 °C</b>	3,0 ± 0,2	16,6 ± 0,8	4,4 ± 0,8
<b>400/40 °C</b>	3,1 ± 0,1	16,6 ± 0,8	4,1 ± 1,1
<b>500/2 °C</b>	3,1 ± 0,1	16,6 ± 0,8	4,2 ± 0,1
<b>Día 60</b>			
<b>Control</b>	3,0 ± 0,06	14,3 ± 2,4	5,6 ± 0,07
<b>400/2 °C</b>	3,0 ± 0,04	16,6 ± 0,8	4,9 ± 0,08
<b>400/40 °C</b>	3,0 ± 0,05	16,6 ± 0,8	4,9 ± 0,07
<b>500/2 °C</b>	3,0 ± 0,02	16,6 ± 0,8	4,9 ± 0,07

**Tabla 5. 2b.** Efecto de las diferentes combinaciones de presión/temperatura sobre la composición del zumo de uva clarificado mediante enzimas (CE) durante 60 días de almacenamiento en refrigeración

<i>Zumo de uva CE</i>	<i>pH</i>	<i>° Brix</i>	<i>Acidez total</i>
<b>Día 1</b>			
<b>Control</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,8 ± 0,4
<b>400/2 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,5 ± 0,5
<b>400/40 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,6 ± 0,5
<b>500/2 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,5 ± 0,6
<b>Día 15</b>			
<b>Control</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,9 ± 0,4
<b>400/2 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,6 ± 0,5
<b>400/40 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,7 ± 0,5
<b>500/2 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,7	3,5 ± 0,6
<b>Día 30</b>			
<b>Control</b>	3,2 ± 0,08	15,1 ± 2,9	4,5 ± 0,4
<b>400/2 °C</b>	3,2 ± 0,01	16,7 ± 0,8	3,3 ± 0,7
<b>400/40 °C</b>	3,2 ± 0,01	16,7 ± 0,8	3,5 ± 0,4
<b>500/2 °C</b>	3,2 ± 0,01	16,7 ± 0,8	3,3 ± 0,7
<b>Día 45</b>			
<b>Control</b>	3,1 ± 0,06	15,0 ± 2,7	4,7 ± 0,3
<b>400/2 °C</b>	3,2 ± 0,02	16,7 ± 0,7	3,6 ± 1,1
<b>400/40 °C</b>	3,2 ± 0,09	16,7 ± 0,7	3,5 ± 1,2
<b>500/2 °C</b>	3,2 ± 0,01	16,7 ± 0,7	4,0 ± 0,5
<b>Día 60</b>			
<b>Control</b>	3,2 ± 0,1	14,0 ± 2,8	5,1 ± 0,2
<b>400/2 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,8	3,9 ± 0,7
<b>400/40 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,8	3,9 ± 0,8
<b>500/2 °C</b>	3,2 ± 0,1	16,7 ± 0,8	3,5 ± 0,2

Los zumos MC y CE presentaron valores similares de pH y grados Brix. En cuanto a la acidez total, se registraron valores ligeramente más altos en el zumo MC respecto al zumo CE, también se mostró un incremento de los valores de la acidez total a partir del día 30 de almacenamiento en refrigeración de las muestras control de ambos zumos MC y CE.

Las muestras tratadas por alta presión se mostraron más estables aunque presentaron un ligero incremento en su acidez total en el caso del zumo MC en el primer día, así como durante el almacenamiento. Este aumento fue menos apreciable con respecto a las muestras control (Tabla 5.2a). Las muestras tratadas por alta presión evolucionaron de manera similar durante el almacenamiento y no mostraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre sí en cada periodo de almacenamiento.

Los zumos de uva procesados con alta presión conservaron las propiedades físico-químicas estables durante los 60 días de almacenamiento. Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con estudios realizados por Moio *et al.* (1994) y Delfini *et al.* (1995) donde mostraron que los tratamientos de alta presión entre 500 y 600 MPa fueron suficientes para garantizar la estabilidad del zumo de uva sin afectar a su composición físico-química ni a su calidad sensorial. Otro trabajo sobre la aplicación de altas presiones en cerveza mostró que el tratamiento de 600 MPa durante 5 min no indujo cambios en los constituyentes químicos de la cerveza, los cuales se conservaron estables durante los 49 días de almacenamiento (Castellari *et al.*, 2000).

### **5. 3. INFLUENCIA DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES EN LOS ZUMOS DE UVA**

Se realizaron análisis de polifenoloxidasa (PFO) y pectinmetilesterasa (PME) en los lotes de zumo de uva control y tratados mediante altas presiones. En todos los ensayos realizados no se detectó actividad PFO, lo cual podría estar directamente relacionado con la variedad de la uva utilizada o también con su método de elaboración. La uva blanca en general tiene muy poca actividad PFO, por otra parte, los compuestos fenólicos están presentes en la piel y en el hollejo junto con enzimas PFO, las cuales al entrar en contacto con el aire conducen a la oxidación de estos compuestos. En nuestro caso, antes de proceder al prensado de la uva, los granos fueron añadidos de una dosis 0,2 g/kg de ácido ascórbico con el fin de protegerlos de las actividades PFO durante la elaboración del zumo, la piel

y los hollejos fueron filtrados y separados rápidamente para no entrar en contacto con el zumo. Todos estos factores están relacionados con el resultado del análisis enzimático, aunque no hay que descartar el método utilizado para la clarificación del zumo, tanto la microfiltración como la clarificación enzimática podrían tener un efecto sobre la actividad PFO.

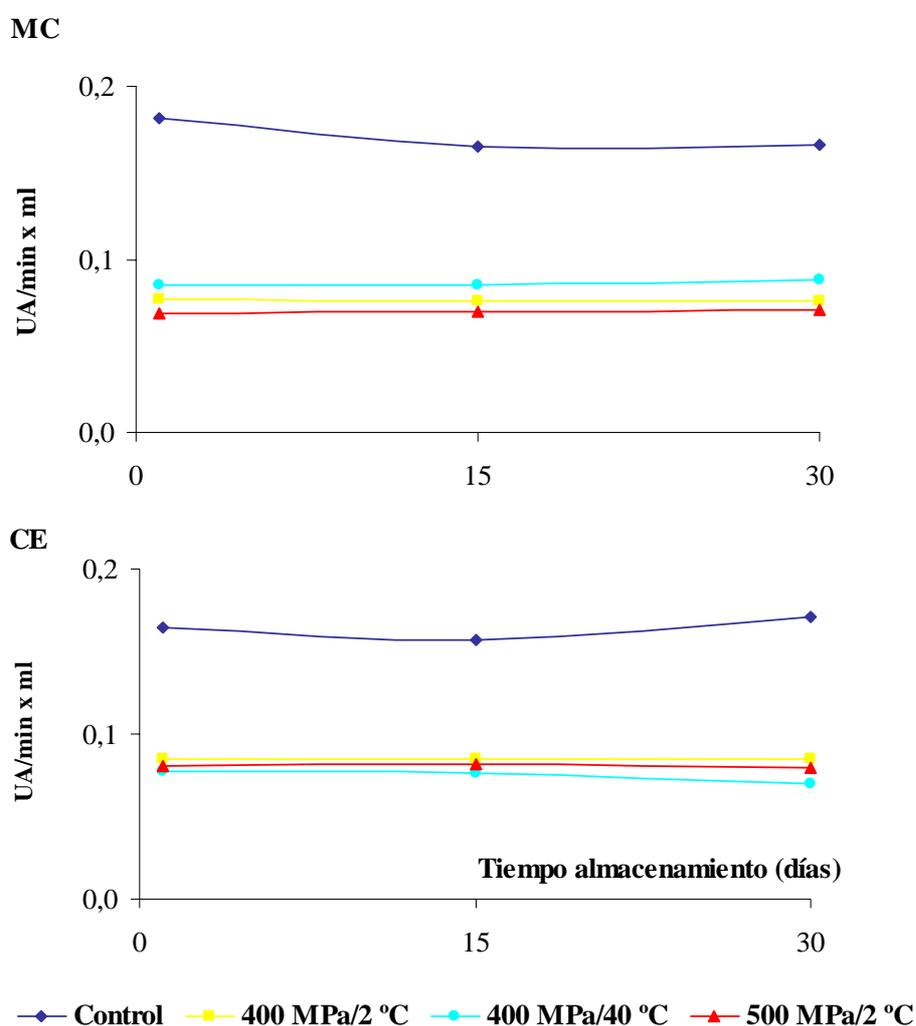
Castellari *et al.* (2000), en un estudio sobre los efectos de las altas presiones sobre la estabilidad de zumo de uva blanca, observó muy bajas actividades PFO en el zumo antes del embotellado. Según los autores esto se debe esencialmente a las operaciones de refinado que se llevaron a cabo en el zumo de uva y a la baja concentración de oxígeno en el medio. Los autores afirmaron que tampoco se detectaron actividades enzimáticas en las mismas muestras control y tratadas por alta presión después del embotellado.

En el caso de la PME, las actividades detectadas en los lotes de zumos de uva MC y CE fueron del orden de 0,17-0,18 UA/min  $\times$  ml, ambos zumos mostraron una evolución similar durante el almacenamiento en frío (Figura V. 1). El uso de enzimas pectolíticas como tratamiento de clarificación, así como la microfiltración, se mostró eficaz en la estabilización de los zumos de uva durante el almacenamiento, produciendo así una reducción de la actividad PME cuya acción perjudica la estabilidad y la conservación de los zumos de uva (Hassan *et al.*, 1992; Ivaldi, 1986). Estos tratamientos combinados con altas presiones pueden brindar mayor calidad al zumo de uva, ofreciéndole una mejor conservación.

Los tratamientos de alta presión aplicados a los zumos de uva produjeron una reducción de casi el 50 % de la actividad PME, la cual registró valores muy bajos ( $\sim$  0,07 UA/ml  $\times$  min). Las muestras tratadas se mostraron estables durante todo el tiempo de almacenamiento y no se registró ninguna activación o recuperación del enzima en los zumos de uva.

La alta presión además de inactivar enzimas, es un tratamiento tecnológico que garantiza la estabilidad microbiológica y organoléptica durante un largo periodo de conservación en frío (Delfini *et al.*, 1995; Tonello *et al.*, 1996). La mayoría de trabajos sobre inactivación de PME por altas presiones enfocaron su

investigación sobre los zumos cítricos (Hernández y Cano, 1998; Tangwongchai *et al.*, 2000), y algunos en concentrados de tomate (Porretta *et al.*, 1995). Sin embargo, los trabajos realizados sobre zumos de uva o vino han centrado su atención en las modificaciones químicas y microbiológicas debidas a los tratamientos de presión (Lonvaud-Funel *et al.*, 1994; Moio *et al.*, 1994; Delfini *et al.*, 1995; Amati *et al.*, 1996; Tonello *et al.*, 1996; Castellari *et al.*, 1997), pero ninguno de ellos ha estudiado la inactivación de la PME.



**Figura V. 1.** Evolución de la PME en los zumos de uva control y tratados microfiltrados (MC) y clarificado por enzimas (CE) durante 30 días de almacenamiento en refrigeración

#### 5. 4. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ZUMO DE UVA DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO

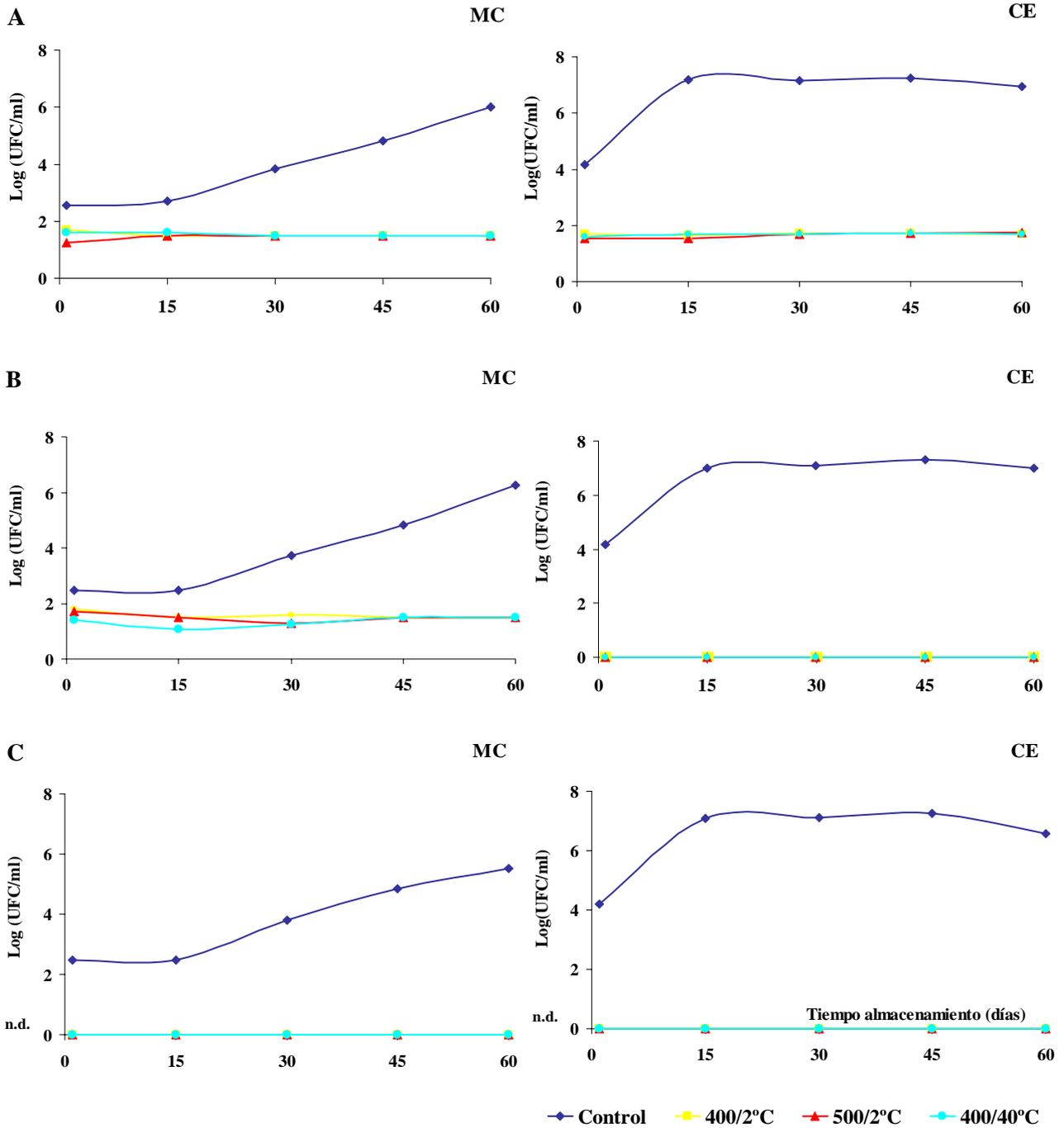
Se ha realizado un análisis microbiológico de los diferentes tipos microbianos (totales, bacterias lácticas, y mohos y levaduras) de los zumos de uva MC y CE, controles así como tratados por alta presión al día 1 y su evolución durante un periodo de 60 días de almacenamiento en refrigeración (Figura V. 2).

El zumo de uva control MC como cabía esperar, mostró recuentos totales más bajos ( $P < 0,05$ ) que el zumo de uva clarificado mediante enzimas CE en el primer día después de la clarificación, obteniéndose una reducción inicial de  $\sim 2$  log UFC/ml en el zumo de uva MC con respecto al zumo de uva control CE.

La evolución de los recuentos totales en las muestras control de zumo de uva MC fue creciente a partir de los 30 días hasta alcanzar recuentos de  $\sim 6$  log UFC/ml a los 60 días de almacenamiento en refrigeración. En cambio en el zumo de uva CE control se registraron recuentos totales muy altos, del orden de  $\sim 7$  log UFC/ml a partir del día 15 después de su obtención, pero estos recuentos se mantuvieron estables durante el almacenamiento en refrigeración.

La microfiltración es un tratamiento de clarificación eficaz ya que permite la depuración de soluciones macromoleculares o de suspensiones incluyendo microorganismos de tamaños a partir de  $0,1 \mu\text{m}$ . Esta técnica es de gran utilidad para la elaboración de los zumos de uva, ya que eliminando una importante carga microbiana inicial se puede evitar una rápida fermentación del zumo, obteniéndose además su clarificación, y la garantía de un zumo de uva de alta calidad microbiológica y organoléptica (Berger, 1986; Barillère *et al.*, 1986).

La aplicación de altas presiones sobre los zumos de uva MC y CE indujo reducciones en la microbiota de ambos tipos de zumo. El zumo de uva MC mostró una inactivación de más de 1 log UFC/ml para recuentos totales y bacterias lácticas. Sin embargo, la inactivación fue total para los mohos y levaduras, las cuales se mostraron más sensibles a este tipo de tratamiento.



**Figura V. 2.** Recuentos totales (PCA), bacterias lácticas (MRS), mohos y levaduras (SAB) (A, B y C, respectivamente) de zumo de uva microfiltrado (MC) y clarificado mediante enzimas (CE) controles y tratados por alta presión durante 60 días de almacenamiento a 4 °C

En el caso del zumo de uva CE se registró una inactivación total en las bacterias lácticas y de mohos y levaduras, y se produjo una reducción de  $\sim 2$  log UFC/ml en la carga inicial de los recuentos totales.

Todos los tratamientos aplicados 400-500 MPa a 2 °C y 40 °C durante 10 min, mostraron el mismo efecto sobre ambos tipos de zumos de uva MC y CE. La presión y la temperatura de tratamiento no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

Los zumos de uva MC y CE tratados por altas presiones se mostraron más estables y no registraron activación microbiana durante los 60 días de almacenamiento en frío. Sin embargo, los zumos de uva controles como hemos comentado anteriormente, presentaron una evolución creciente en los recuentos microbianos ( $\sim 7$  log UFC/ml a los 60 días) tanto en el zumo de uva MC como en el zumo de uva CE. Los zumos de uva controles fueron anotados como fermentados.

Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos sobre el efecto de las altas presiones sobre *Saccharomyces cerevisiae* (Ochiai *et al.*, 1991; Hamada *et al.*, 1991) y sobre otras levaduras y mohos, que en general son muy barosensibles. En diferentes trabajos se ha demostrado que tratamientos de 300 MPa durante 30 min o 400 MPa aplicados durante 5-10 min a temperatura ambiente, reducen considerablemente la viabilidad de los mohos, levaduras y de otras células vegetativas en zumos ácidos (Hoover *et al.*, 1989; Ogawa *et al.*, 1990).

Diferentes trabajos han utilizado la alta presión para inhibir el crecimiento de patógenos en alimentos, para una posible aplicación en la industria alimentaria (Hoover, *et al.*, 1989; Cheftel, 1991; Dall'Aglio *et al.*, 1992). Sin embargo, existen pocos trabajos sobre la aplicación de altas presiones en zumos de uva y vinos. Hara *et al.* (1990) aplicando alta presión en vino de arroz mostraron que el tratamiento de 300 MPa durante 10 min a 25 °C, permitió la inactivación total de levaduras así como bacterias lácticas parando totalmente la fermentación del vino, sin alterar las propiedades organolépticas del producto. Las primeras experiencias realizadas sobre vinos blancos franceses han mostrado resultados microbiológicos

similares, y las principales características de los vinos no han sido modificadas por la aplicación de presiones entre 300 y 350 MPa durante 10 min (Lonvaud-Funel *et al.*, 1994). Un estudio de Delfini *et al.* (1995) sobre la estabilización microbiológica de mosto de uva y vino de moscatel inoculados con 6 log (UFC/ml) de 13 diferentes especies de levaduras de vino, y cepas de *Lactobacillus spp.*, *Acetobacter spp.*, *Botrytis cinerea* en forma vegetativa y esporulada, ha mostrado que todos los microorganismos que fueron inoculados en el vino moscatel fueron totalmente inactivados por un tratamiento de 400 MPa durante 2 min a 20 °C.

En un estudio de Tonello *et al.* (1996) sobre el efecto de las altas presiones en 4 cepas de levaduras comerciales inoculadas en un zumo de uva y vino modelo (presión 200-300 MPa, tiempo de tratamiento hasta 5 min y temperaturas 20 y 4 °C), mostró una eficacia de destrucción de las cepas de 6 log UFC/ml a 300 MPa durante 5 min de tratamiento.

Por otra parte, también se ha mostrado que un pH bajo (2,5-3,5), temperaturas moderadas (40-60 °C) y un alto contenido de CO<sub>2</sub> mejora el efecto antimicrobiano de las altas presiones, mientras que las altas concentraciones de sacarosa tienen una acción protectora (Butz y Ludwig, 1986). Sin embargo, Ogawa *et al.* (1990) no detectó ninguna influencia del pH (2,5 – 4,5) sobre la destrucción de mohos y levaduras en zumo de mandarina tratado entre 100 y 400 MPa. El autor comentó también la ausencia de cualquier efecto protector de los azúcares hasta una concentración de 20 °Brix. En nuestro caso, los tratamientos aplicados de 400 y 500 MPa tuvieron una destrucción eficaz sobre las levaduras y mohos, así como las bacterias lácticas del zumo de uva. En estudios posteriores sería interesante comprobar si existe un efecto protector de los azúcares en este producto.

## 5. 5. EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN SOBRE EL COLOR DE LOS ZUMOS DE UVA Y SU EVOLUCIÓN DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO

La evolución del color de los zumos de uva MC y CE controles y tratados por altas presiones se recoge en las Tablas 5.3a y 5.3b. Los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$  se mostraron estables en el primer día después de los tratamientos de presurización y no se registraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre las muestras control y tratadas por alta presión. Los mismos resultados fueron encontrados por Castellari (2000) mostrando que la alta presión a 600 MPa/5 min a temperatura ambiente no tuvo ningún efecto significativo sobre los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  respecto a la muestra control en la cerveza.

**Tabla 5. 3a.** Evolución del color del zumo de uva (MC) durante los 60 días de almacenamiento en refrigeración a (4 °C) de las muestras control y tratadas por alta presión

<i>Zumo de uva MC</i>				
Parámetros de color	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$C^*$
<b>Día 1</b>				
<b>Control</b>	*-0,63	3,68	98,46	3,74
<b>400 MPa/2°C</b>	-0,71	3,82	98,59	3,88
<b>400 MPa/40°C</b>	-0,73	3,86	98,74	3,92
<b>500 MPa/2°C</b>	-0,76	3,32	99,51	3,41
<b>Día 30</b>				
<b>Control</b>	1,51 <sup>a</sup>	22,03 <sup>a</sup>	92,95 <sup>b</sup>	22,08 <sup>a</sup>
<b>400 MPa/2°C</b>	-0,08 <sup>b</sup>	4,78 <sup>b</sup>	97,98 <sup>a</sup>	4,78 <sup>b</sup>
<b>400 MPa/40°C</b>	-0,27 <sup>b</sup>	4,42 <sup>b</sup>	98,53 <sup>a</sup>	4,43 <sup>b</sup>
<b>500 MPa/2°C</b>	-0,04 <sup>b</sup>	4,46 <sup>b</sup>	98,29 <sup>a</sup>	4,46 <sup>b</sup>
<b>Día 60</b>				
<b>Control</b>	0,82 <sup>a</sup>	32,48 <sup>a</sup>	90,61 <sup>c</sup>	32,49 <sup>a</sup>
<b>400 MPa/2°C</b>	-1,02 <sup>c</sup>	13,68 <sup>c</sup>	96,99 <sup>a</sup>	13,71 <sup>c</sup>
<b>400 MPa/40°C</b>	-0,29 <sup>b</sup>	26,60 <sup>b</sup>	92,98 <sup>b</sup>	26,60 <sup>b</sup>
<b>500 MPa/2°C</b>	-1,13 <sup>c</sup>	7,51 <sup>d</sup>	98,40 <sup>a</sup>	7,60 <sup>d</sup>

\*Valores promedios dentro de la misma columna para cada periodo de almacenamiento, cada parámetro de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , y  $C^*$  y con la misma letra, no muestran diferencias significativas ( $P>0,05$ )

A partir de los 30 días de almacenamiento en refrigeración, los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$  registraron cambios ( $P < 0,05$ ) perceptibles en las muestras control en comparación con sus correspondientes tratadas por alta presión. La evolución creciente de los valores de  $a^*$  y  $b^*$  hacia valores positivos, indica un color más intenso en el zumo de uva control. También se observó una disminución del valor de  $L^*$  indicando un ligero oscurecimiento (pardeamiento) de estos zumos (Tabla 5. 3a).

**Tabla 5. 3b.** Evolución del color del zumo de uva (CE) durante los 60 días de almacenamiento en refrigeración a (4 °C) de las muestras control y tratadas por alta presión

<i>Zumo de uva CE</i>				
Parámetros de color	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$C^*$
<b>Día 1</b>				
<b>Control</b>	-0,86	4,05	99,23	4,14
<b>400 MPa/2°C</b>	-0,83	4,01	98,78	4,10
<b>400 MPa/40°C</b>	-0,76	4,42	97,75	4,49
<b>500 MPa/2°C</b>	-0,70	4,36	97,32	4,42
<b>Día 30</b>				
<b>Control</b>	-0,90 <sup>a</sup>	10,65 <sup>a</sup>	97,82	10,68 <sup>a</sup>
<b>400 MPa/2°C</b>	-0,62 <sup>b</sup>	4,96 <sup>b</sup>	98,58	5,00 <sup>b</sup>
<b>400 MPa/40°C</b>	-0,45 <sup>c</sup>	4,42 <sup>b</sup>	98,78	4,45 <sup>b</sup>
<b>500 MPa/2°C</b>	-0,16 <sup>d</sup>	4,56 <sup>b</sup>	96,92	4,56 <sup>b</sup>
<b>Día 60</b>				
<b>Control</b>	1,05 <sup>b</sup>	32,10 <sup>b</sup>	90,30 <sup>a</sup>	32,12 <sup>b</sup>
<b>400 MPa/2°C</b>	1,83 <sup>a</sup>	35,86 <sup>a</sup>	88,63 <sup>b</sup>	35,90 <sup>a</sup>
<b>400 MPa/40°C</b>	2,03 <sup>a</sup>	37,36 <sup>a</sup>	87,97 <sup>b</sup>	37,42 <sup>a</sup>
<b>500 MPa/2°C</b>	2,26 <sup>a</sup>	37,85 <sup>a</sup>	87,89 <sup>b</sup>	37,92 <sup>a</sup>

\*Valores promedios dentro de la misma columna para cada periodo de almacenamiento, cada parámetro de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , y con la misma letra no muestran diferencias significativas ( $P > 0,05$ )

Los parámetros  $b^*$  y  $C^*$  (saturación) mostraron valores crecientes en la muestra control a lo largo del almacenamiento durante los primeros 30 días mientras que las muestras presurizadas se mantuvieron estables. Sin embargo, a

los 60 días de almacenamiento, se observó un aumento considerable del valor de  $b^*$  y  $C^*$  que se tradujo en un color más pardo en todas las muestras control y presurizadas, excepto en la muestra tratada a 500 MPa y 2° C del zumo MC.

En el caso del zumo de uva CE, los resultados fueron similares que en el zumo de uva MC para el primer día después del tratamiento. La alta presión no mostró ningún efecto sobre los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Tabla 5. 3b). Las muestras tratadas y control no mostraron diferencias significativas ( $P>0,05$ ).

A los 30 días de almacenamiento, en general, las muestras tratadas mantuvieron estables los parámetros de color. Sin embargo la muestra control mostró un aumento considerable en los valores de  $b^*$  y  $C^*$  indicando un color más intenso y ligeramente más oscuro que las muestras tratadas, las cuales mostraron un color similar que el primer día de almacenamiento en refrigeración.

A los 60 días todas las muestras tratadas y control mostraron valores más altos en los parámetros  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$ , mientras que el valor de  $L^*$  mostró un ligero descenso indicando menos claridad.

El color de todas las muestras tanto del zumo MC como del zumo CE, mostró una evolución similar a lo largo del almacenamiento en refrigeración y no se observaron signos de oxidación o pardeamiento en las muestras tratadas por alta presión durante los 30 primeros días de almacenamiento, a diferencia de las muestras control que mostraron un color más intenso y más oscuro. Así, el tratamiento de alta presión permite estabilizar el color de los zumos de uva durante 30 días de almacenamiento.

A los 60 días de almacenamiento, los dos zumos de uva registraron un incremento considerable de los parámetros de color  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$ , tanto en las muestras control como las presurizadas, excepto para el tratamiento de 500 MPa y 2 °C del zumo MC. Este aumento de los parámetros de color, que fue más pronunciado en el zumo de uva CE, está seguramente relacionado con el método de clarificación aplicado. La clarificación mediante enzimas ejerce una acción específica sobre los polifenoles provocando su sedimentación junto con otras partículas suspendidas en el zumo. Estos compuestos fenólicos juegan un papel

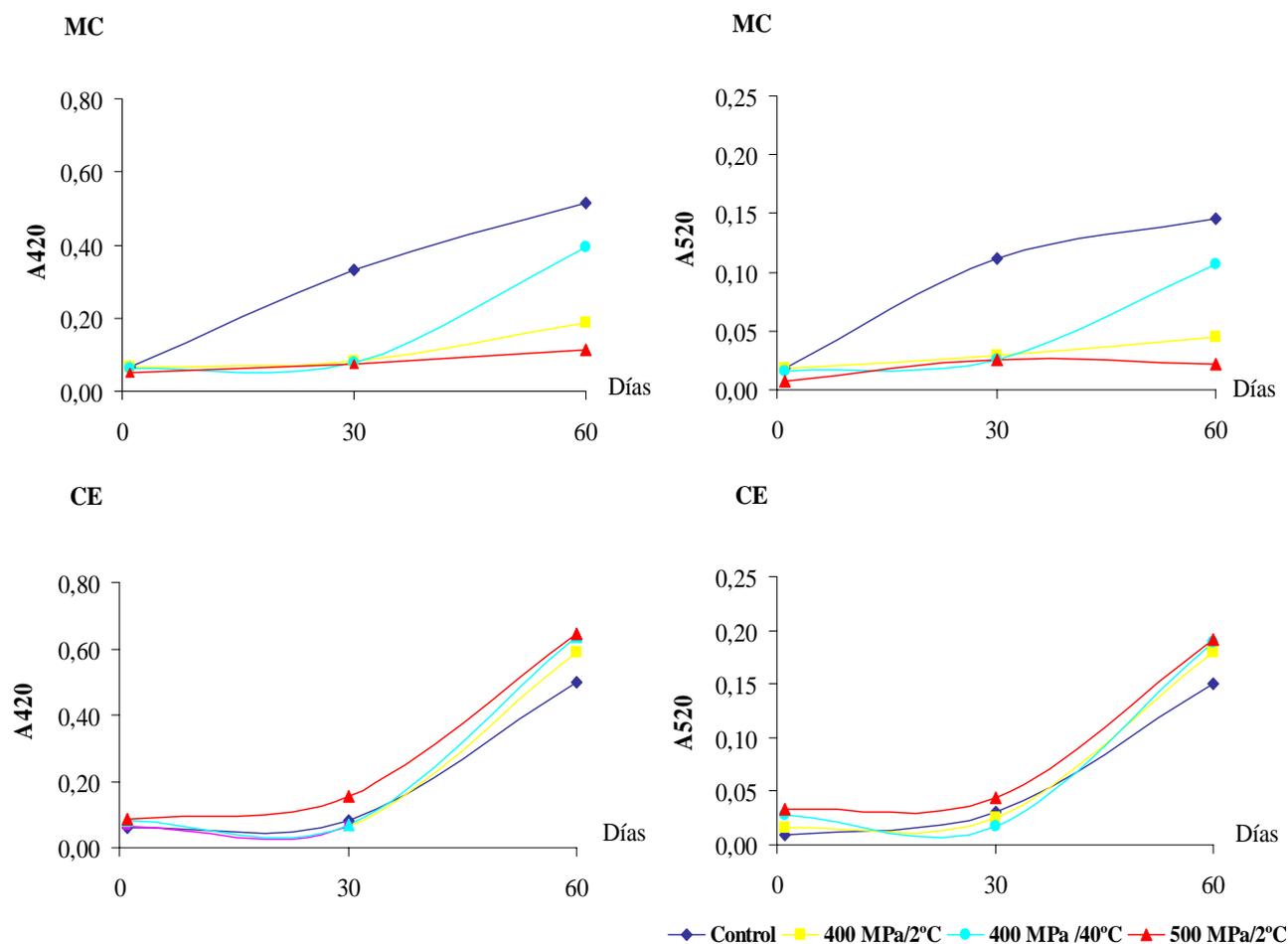
antioxidante muy importante en el zumo de uva y por lo tanto su eliminación o reducción puede favorecer la oxidación ya que el zumo queda desprotegido frente a cualquier contacto con el aire o presencia de oxígeno.

Para confirmar estos resultados, se realizaron medidas de absorbancias a diferentes longitudes de onda (420 nm y 520 nm) en ambos zumos de uva MC y CE controles y tratados por altas presiones, estudiándose su evolución durante el almacenamiento (Figura V. 3). El pardeamiento del zumo de uva es frecuentemente cuantificado mediante estas medidas de absorbancia (Lukton *et al.*, 1956; Ponting *et al.*, 1960; Flora *et al.*, 1976; Skrede, 1985).

Los zumos de uva MC y CE control mostraron una absorbancia muy similar en el primer día ( $A_{420} = 0,065$  y  $0,060$ ;  $A_{520} = 0,019$  y  $0,010$ , respectivamente). La aplicación de la alta presión no afectó al color de los zumos de uva MC y CE y no se registraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en las absorbancias 420 y 520 nm entre las muestras control y sus correspondientes tratadas por los diferentes tratamientos de alta presión.

A partir del día 30, las muestras control del zumo de uva MC mostraron mayores valores de absorbancia a 420 nm y a 520 nm ( $\sim 0,33$  y  $0,112$ ), respecto al día 1. Sin embargo, las muestras tratadas por altas presiones se mantuvieron estables y mostraron los mismos valores que el primer día de almacenamiento. El zumo de uva CE control a diferencia del MC se mantuvo estable y mostró una evolución similar a sus correspondientes muestras tratadas por altas presiones.

A los 60 días de almacenamiento, la muestra control del zumo de uva MC incrementó su absorbancia hasta  $0,513$  a 420 nm y  $0,146$  a 520 nm. Las muestras tratadas también registraron un aumento en los valores de absorbancia a las dos longitudes de onda estudiadas. La muestra tratada a  $500 \text{ MPa}/2 \text{ }^\circ\text{C}$  fue la más estable durante los 60 días de almacenamiento y registró valores de absorbancia similares a los obtenidos en el primer día después del tratamiento.



**Figura V. 3.** Absorbancias a 420 y 520 nm de los zumos de uva microfiltrado (MC) y clarificado con enzimas (CE) controles y tratados por diferentes tratamientos de alta presión y su evolución durante los 60 días de almacenamiento

En el caso de los zumos de uva CE, estos últimos evolucionaron de manera similar que los zumos MC, registrando valores más altos de absorbancia, incluso para el tratamiento de 500 MPa/2 °C. Este hecho es probablemente debido a la clarificación enzimática, la cual produce una reducción importante en la parte coloidal del zumo de polifenoles produciendo su oxidación en presencia de oxígeno y por lo tanto conlleva al pardeamiento. Estos cambios se vieron reflejados en el incremento de la absorbancia en este zumo a partir de los 30 días de almacenamiento a 4 °C. Estos resultados también los podemos relacionar con los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , los cuales indicaron un cambio en el color a partir de los 30 días en el caso de los dos zumos de uva MC y CE.

El tratamiento de 500 MPa mostró mejor estabilidad de las características y parámetros de color hasta los 60 días de almacenamiento sobre todo en el zumo MC por lo que este tratamiento fue elegido para realizar las pruebas sensoriales comparándose con el control.

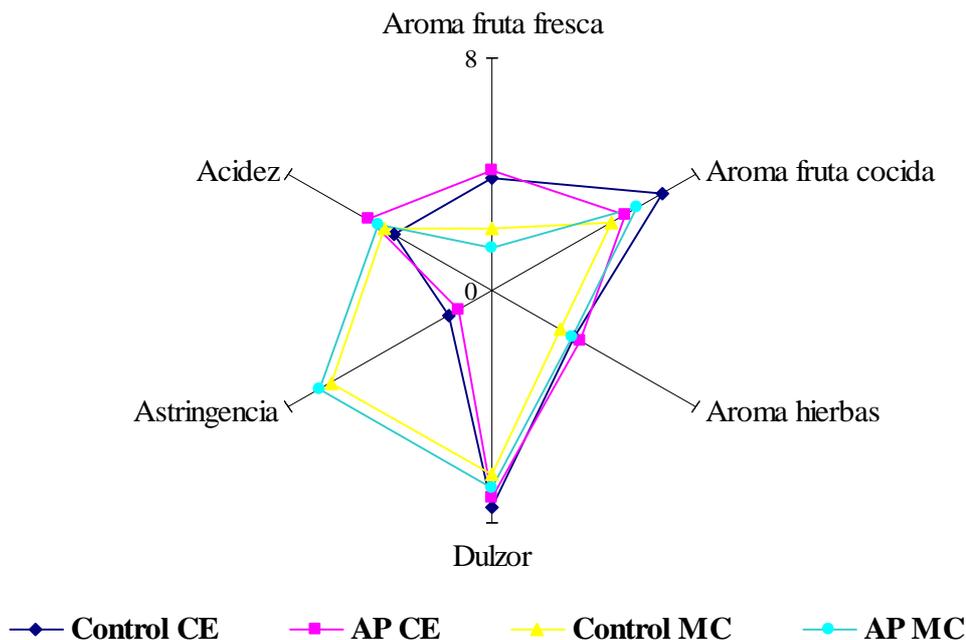
## **5. 6. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES SOBRE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LOS ZUMOS DE UVA**

Las muestras control y tratadas de los zumos de uva MC y CE fueron analizados por un panel de catadores durante los 60 días de almacenamiento en frío. Los análisis se realizaron los días 1, 15, 30, 45 y 60 después del tratamiento. Las Figuras V. 4 y V. 5a y V.5b muestran los resultados de los días 1, 30 y 60.

Se registraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en algunos descriptores para ambos zumos controles y tratados MC y CE, sobre todo en el día 1 (Figura V. 4). Los zumos CE mostraron mejor “aroma a fruta fresca” y menor astringencia que los zumos MC. El resto de descriptivos presentaron valores similares para los dos tipos de zumos.

Estos defectos en las características organolépticas de los zumos de uva pueden estar relacionados con el método de clarificación. Los componentes aromáticos principales (terpenos) presentes en el zumo de uva son volátiles y podrían haber sufrido algunas pérdidas durante el proceso de microfiltración, registrándose esta diferencia en el aroma a fruta fresca en el zumo MC.

Por otra parte, las diferencias observadas entre tratamientos de clarificación en cuanto a las características de astringencia de los zumos podrían explicarse por la precipitación de componentes con características astringentes durante el proceso de clarificación enzimática. Sin embargo, estos componentes esencialmente fenoles, quedan libres en el zumo y no son detenidos el caso de la microfiltración por membrana durante la clarificación.



**Figura V. 4.** Análisis sensorial del zumo de uva clarificado con enzimas (CE) y microfiltrado (MC) control y tratado por alta presión (AP) en el primer día de almacenamiento

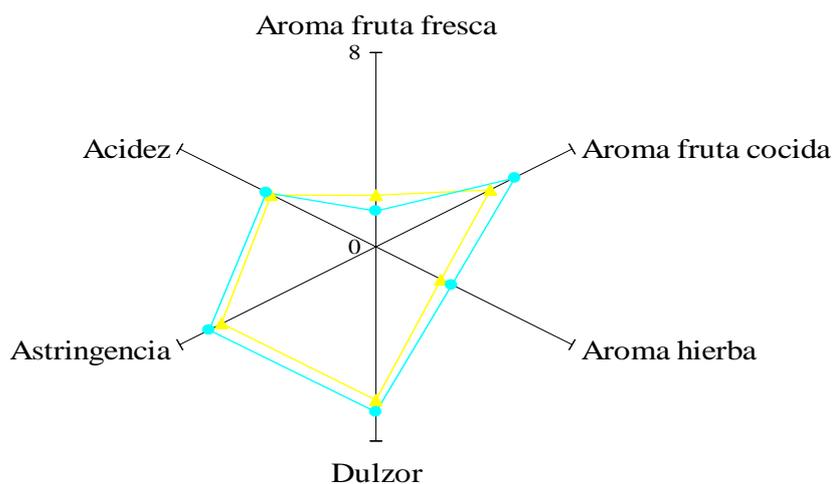
Estudios llevados a cabo por Castino (1990) y Bosso (1992), mostraron que el uso de la clarificación enzimática, además de facilitar el flujo del zumo de uva y dar una buena claridad a los zumos y vinos, afecta a los componentes relacionados con su calidad sensorial (sabor y aroma), debido a una reducción considerable de los coloides glucosídicos y proteicos de los zumos de uva (Lao *et al.*, 1996). Estos coloides causan la turbidez de los zumos de uva y vinos pero a su vez tienen una influencia importante sobre los componentes volátiles que estabilizan el aroma de los mismos (Lubbers *et al.*, 1993).

A los días 30 y 60 después del tratamiento, los cambios sensoriales fueron más aparentes en las muestras control de ambos lotes de zumo de uva (Figuras V. 5a y V. 5b). Los valores del descriptor “dulzor” disminuyeron durante el almacenamiento mientras que los valores de “acidez” aumentaron confirmando los resultados obtenidos en los análisis físico-químicos. En estos estadios de conservación, el zumo de uva control fermentó, con presencia de burbujas debido a la liberación de CO<sub>2</sub> por la acción de las levaduras presentes en el zumo.

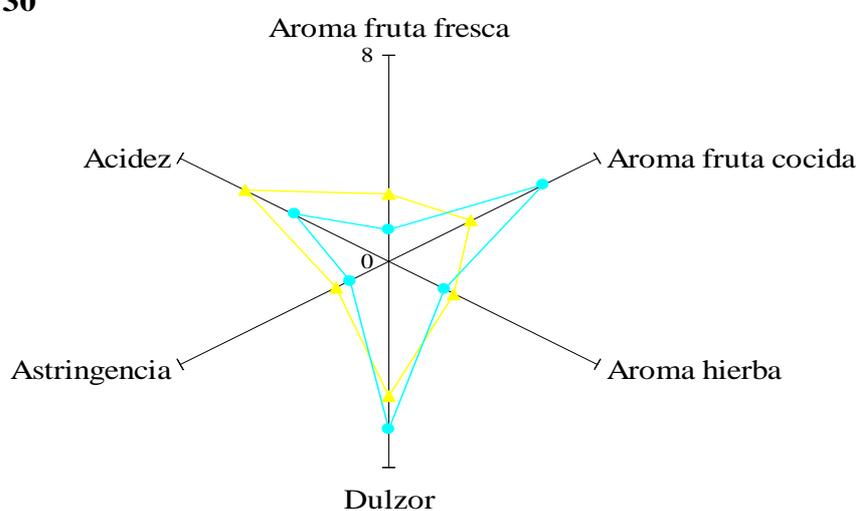
En cuanto a la aplicación del tratamiento de alta presión, sobre los zumos de uva MC y CE controles (Figuras V. 5a y V. 5b), estos últimos fueron muy similares a sus controles en el primer día de almacenamiento. Los catadores no detectaron diferencias significativas entre los zumos de uva controles y sus respectivos tratados a 500 MPa y 2 °C ( $P>0,05$ ), los cuales mostraron características similares de frescura, acidez, dulzor, aromas y astringencia (Figura V.4). De acuerdo con algunos estudios sobre el efecto de las altas presiones sobre la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, la alta presión no modifica sustancialmente el color ni el sabor o el aroma de los alimentos (Cheftel, 1991).

Los zumos de uva tratados por alta presión de ambos lotes MC y CE, presentaron una buena estabilidad de los parámetros “dulzor” y “acidez” durante los 60 días de almacenamiento en frío, aunque fue percibido un pequeño descenso en el descriptor “aroma a fruta fresca” en el zumo de uva MC. En general las muestras tratadas tuvieron un sabor y aroma muy agradables y aceptables según los catadores. Estos resultados coinciden con los encontrados por Delfini *et al.* (1995) en un estudio sobre el efecto de las altas presiones en zumos de uva y vinos. El estudio mostró una buena evaluación organoléptica con buena calidad de sabor y aroma para ambos zumos de uva control y presurizados.

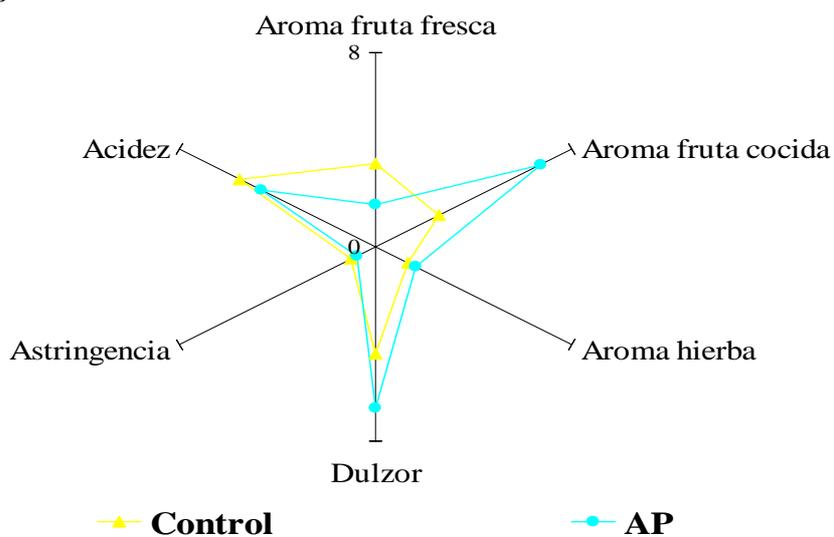
**Día 1**



**Día 30**



**Día 60**

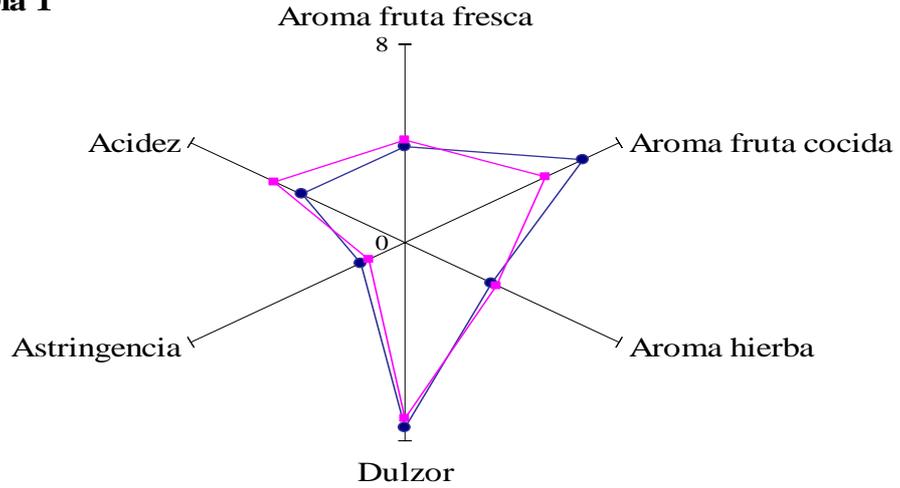


▲ Control

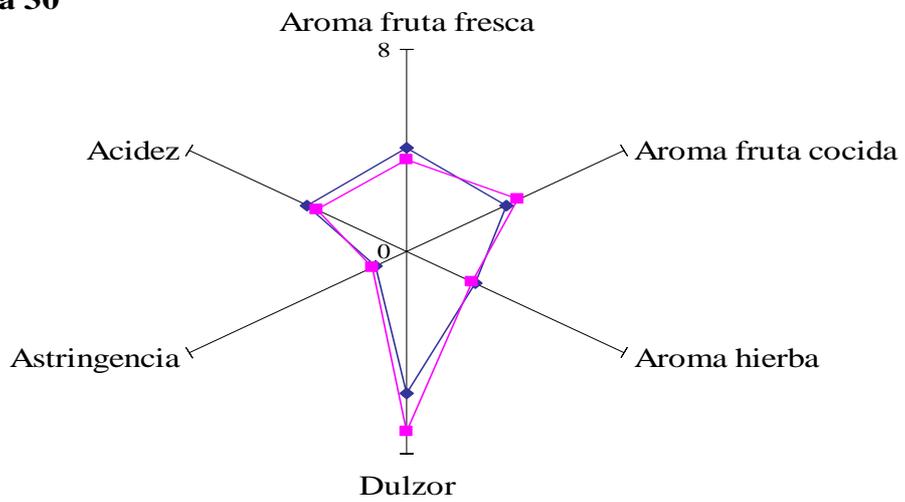
● AP

**Figura V. 5a.** Evolución sensorial del zumo de uva microfiltrado (MC) control y tratado por alta presión (AP) durante el almacenamiento en refrigeración.

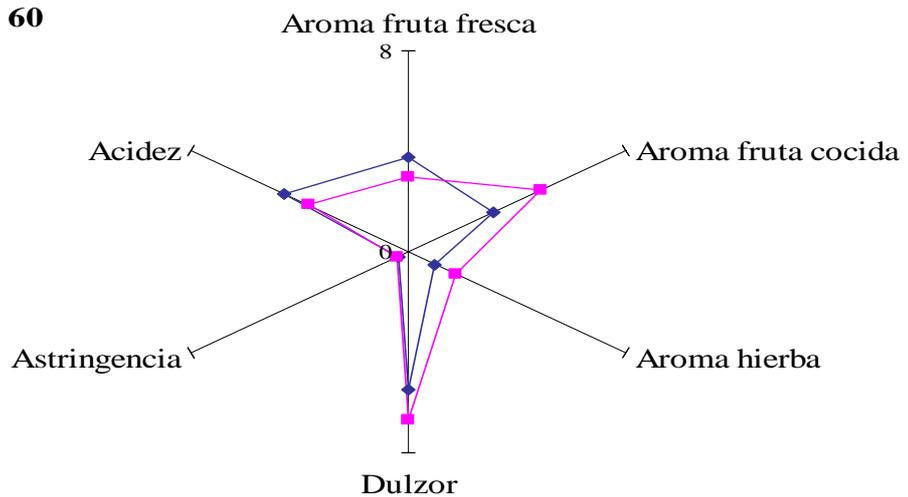
**Día 1**



**Día 30**



**Día 60**



◆ **Control**

■ **AP**

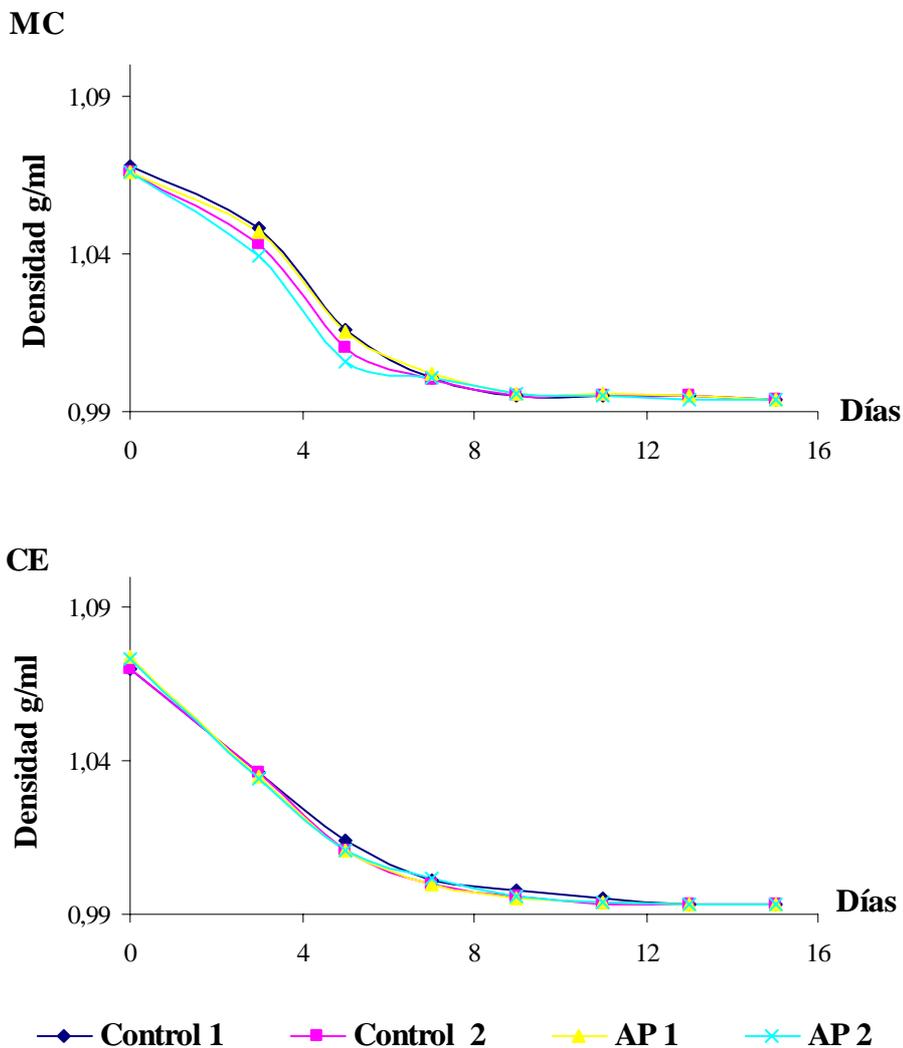
**Figura V. 5b.** Evolución sensorial del zumo de uva clarificado con enzimas (CE) control y tratado por alta presión (AP) durante el almacenamiento en refrigeración.

**VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**  
**APTITUD A LA VINIFICACIÓN DE**  
**LOS ZUMOS DE UVA TRATADOS**  
**POR ALTA PRESIÓN**

## 6. 1. VINIFICACIÓN Y CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación se llevó a cabo durante 15 días a 18 °C, temperatura que fue controlada durante todo el proceso. Los vinos procedentes de los zumos de uva MC y CE, controles y presurizados (500 MPa, 10 min a 2 °C), mostraron una cinética de fermentación típica y muy similar.

La fermentación de los zumos de uva alcanzó su punto máximo en el transcurso del día 4º y 5º después de la inoculación del fermento. La fermentación principal finalizó a los 7-8 días (Figura VI. 1).



**Figura VI. 1.** Evolución de la fermentación de los zumos de uva microfiltrado (MC) y clarificado mediante enzimas (CE) controles (Cont) y tratados por altas presiones (AP) durante 2 semanas a 18 °C

En los primeros días de fermentación, el zumo de uva CE presentó una velocidad de fermentación ligeramente mayor que el zumo de uva MC. En el transcurso de la fermentación los dos zumos de uva mostraron valores similares de densidad. El método de clarificación no mostró ningún efecto sobre la fermentación, ya que los zumos de uva MC y CE presentaron esencialmente la misma tendencia de fermentación. El tratamiento de alta presión aplicado a los zumos de uva (500 MPa, 10 min a 2 °C) tampoco afectó a la cinética de fermentación.

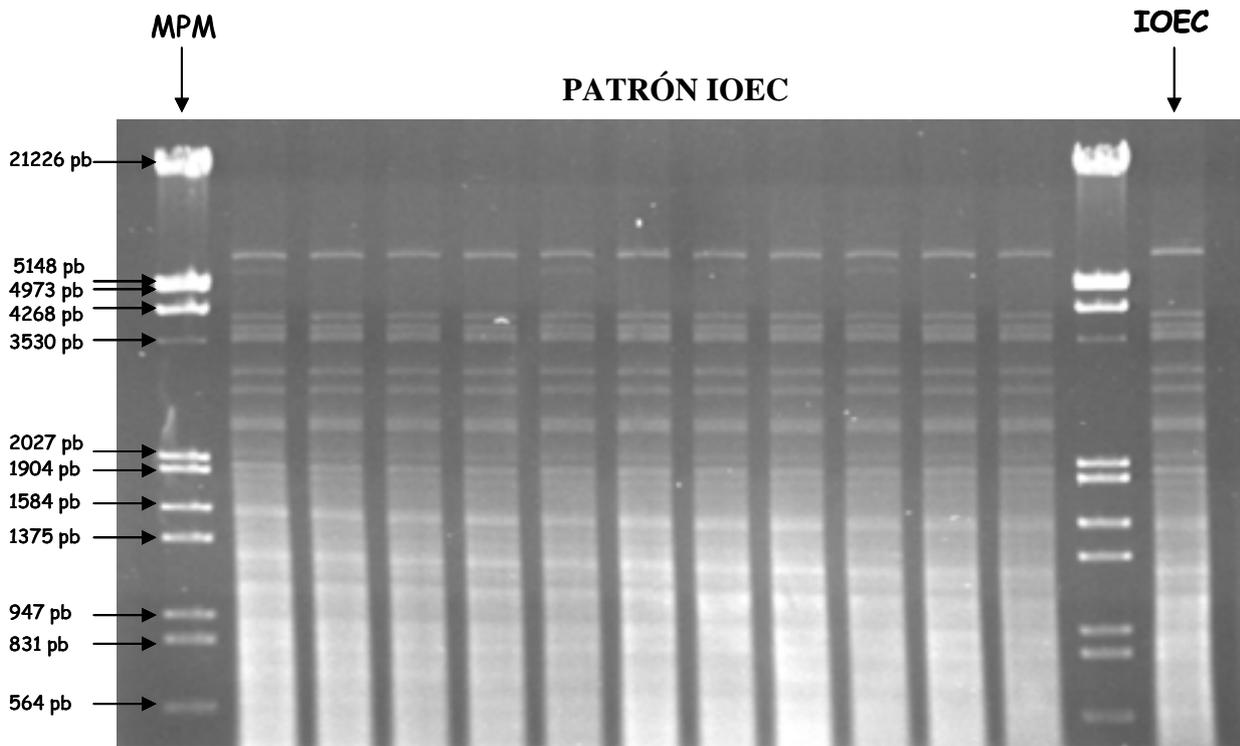
Durante el proceso de fermentación los niveles de azúcar disminuyeron considerablemente en todos los lotes de zumo de uva. En el 5º día de la fermentación, los zumos de uva MC control y presurizado presentaron 6,1 °Brix, y los zumos de uva CE control y presurizado 7,0 °Brix, respecto a los zumos no fermentados 16,7 °Brix. Estos resultados indican la evolución favorable de la fermentación en todos los zumos de uva.

## **6. 2. CARACTERIZACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA CEPA DE LEVADURA INOCULADA EN LOS ZUMOS DE UVA**

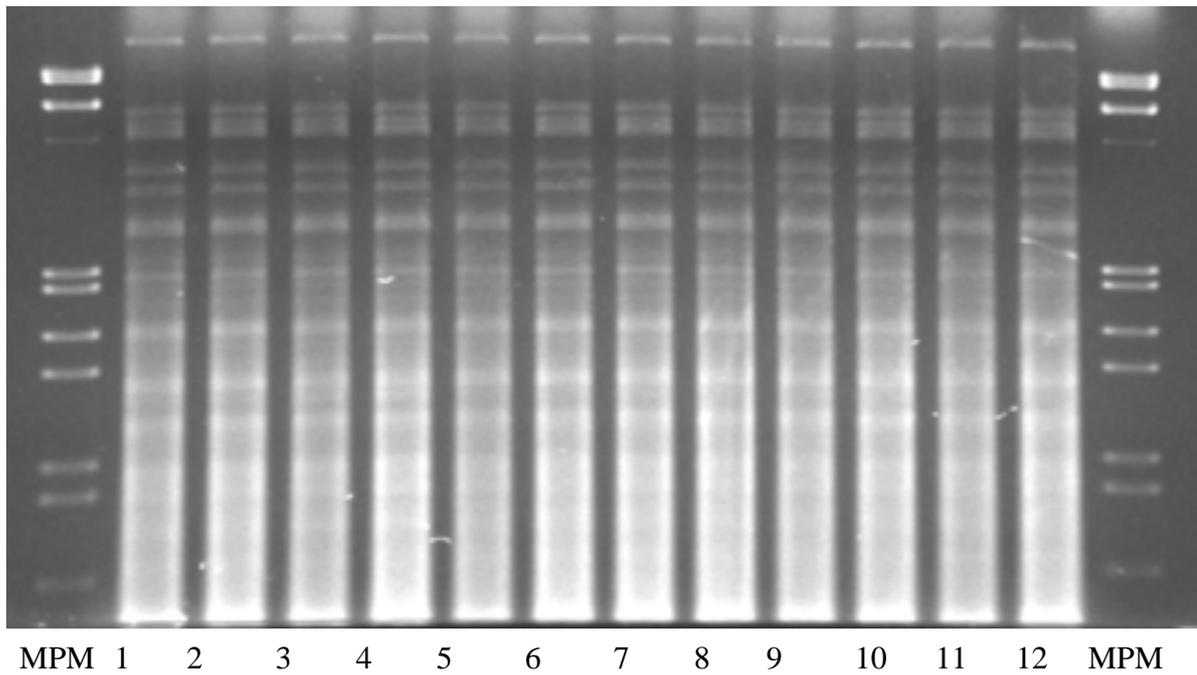
A lo largo de la fermentación se tomaron muestras de los diferentes lotes de vino al día 4 y al final de la fermentación, para realizar un análisis de caracterización y seguimiento de la cepa de levadura vínica inoculada, a través de la técnica RFLP-ADNmt. Esta técnica tiene un gran poder discriminante entre cepas de levaduras muy próximas, y su reproducibilidad y eficacia son muy válidas para realizar un seguimiento de las cepas sembradas en el zumo de uva durante la fermentación del vino (Querol *et al.*, 1992 a y b).

De cada muestra se aislaron 12 colonias de levaduras y se analizaron como muestras independientes. La Figura VI. 2 muestra los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de estas colonias aisladas y procedentes de los zumos en proceso de fermentación en el cuarto día. En cada uno de los geles, cada carril corresponde a una de las 12 colonias aisladas.

Todas las colonias analizadas, incluidas las obtenidas al final de la fermentación, (resultados no mostrados), presentaron el mismo perfil que la levadura inoculada en cada uno de los zumos de uva controles y presurizados MC y CE (Figura VI. 2).



**PERFIL DE LAS MUESTRAS**



**Figura VI. 2.** Perfil de bandas de ADNmt de distintos aislamientos de levaduras (1-12) mediante un análisis por electroforesis en gel de agarosa, procedentes de muestras de zumos de uva presurizados y controles microfiltrados (MC) y clarificados mediante enzimas (CE) en proceso de fermentación (cuarto día)

**MPM.** Marcador molecular correspondiente a una mezcla de ADN de fago lambda digerido con Hind III y EcoRI. **IOEC:** perfil correspondiendo a la levadura inoculada

Estos resultados indican que la cepa inoculada estuvo presente en un 100 % de los casos analizados, desde el cuarto día hasta el final de la fermentación, sea cual sea el tratamiento anterior aplicado a la muestra de zumo de uva.

### **6. 3. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN DE LOS VINOS OBTENIDOS A PARTIR DE ZUMOS DE UVA TRATADOS POR ALTA PRESIÓN Y ZUMOS CONTROL**

La composición del vino es mucho más compleja que la del zumo de uva debido a los nuevos componentes que aparecen tras su fermentación. Los resultados de composición de los vinos están directamente relacionados con la composición de los zumos de uva de los cuales proceden. La composición del zumo de uva es modificada mediante la fermentación alcohólica, que causa la desaparición de los azúcares, glucosa y fructosa, y la formación de alcoholes junto con productos secundarios como los diferentes ácidos orgánicos, glicerol, acetaldehído y otros compuestos volátiles (Cabanis *et al.*, 1980).

La variedad Parellada constituye una variedad de uva blanca muy importante en la zona del Penedès, y es una de las tres variedades que forman parte del vino base para la elaboración del cava (Macabeu, Xarel·lo y Parellada). La Parellada de mejor calidad se cultiva en las zonas altas del Penedès. Esta variedad confiere a los vinos un grado alcohólico bajo entre 7,5 y 10 (%vol), debido a su bajo contenido en azúcares, si la comparamos con otras variedades.

Se ha demostrado que los zumos de uva clarificados producen mejores vinos que los zumos de uva turbios. Estos últimos pueden presentar sabores y aromas desagradables (Amerine *et al.*, 1972; Singleton *et al.*, 1975).

La Tabla 6. 1 muestra los resultados de los análisis de composición de los vinos procedentes de los zumos de uva MC y CE controles y presurizados. Anteriormente hemos mostrado que el tratamiento de clarificación no afecta a los constituyentes principales del zumo de uva, y por otra parte que los tratamientos de alta presión aplicados sobre los zumos de uva MC y CE tampoco registraron efectos sobre su composición general. Sin embargo, se registraron algunos cambios en la composición de los vinos procedentes de zumos de uva de diferentes métodos de clarificación (MC y

CE), sobre todo en la cantidad de azúcares totales, grado alcohólico y acidez total. Los vinos MC registraron valores más bajos en el grado alcohólico y los azúcares totales. Estos dos parámetros están relacionados, ya que el grado alcohólico en el vino depende de la concentración de los azúcares en el zumo de uva.

**Tabla 6. 1.** Análisis físico-químicos de los vinos

<i>VINOS</i>				
<i>Composición de los vinos</i>	<i>Control MC</i>	<i><sup>1</sup>AP MC<sup>a</sup></i>	<i>Control CE</i>	<i>AP CE<sup>b</sup></i>
<b>Grado alcohólico (% vol)</b>	8,85	8,70	10,5	10,25
<b>Grado alcohólico total (% vol)</b>	8,86	8,71	10,13	10,3
<b>Densidad relativa a 20 °C</b>	0,9954	0,9955	0,9942	0,9936
<b>Masa volúmica a 20 °C (g/ml)</b>	0,9937	0,9938	0,9925	0,9919
<b>Extracto seco total (g/l)</b>	19,3	19,3	20,0	19,0
<b>Azúcar total (g/l)</b>	0,5	0,5	1,4	1,0
<b>Acidez total (g Ác. tartárico/l)</b>	5,7	5,7	5,0	4,8
<b>Restos de extracto (g/l)</b>	18,8	18,8	18,6	18,0

<sup>1</sup>Vino obtenido a partir de zumo de uva tratado por la alta presión

<sup>a</sup>Vino obtenido a partir de zumo de uva microfiltrado

<sup>b</sup>Vino obtenido a partir de zumo de uva clarificado por enzimas pectolíticas

Los zumos MC y CE controles y presurizados sufrieron el mismo proceso de fermentación en las mismas condiciones de temperatura y tiempo de vinificación, por lo tanto, el tratamiento de clarificación aplicado a los zumos de uva fue el responsable de esta diferencia en la composición final de los vinos. La microfiltración por membrana pudo haber arrastrado más azúcares totales comparada con el proceso de clarificación mediante enzimas, explicando el menor grado alcohólico obtenido en el vino procedente de los zumos MC.

La acidez total de los vinos, mostró los mismos comportamientos mencionados anteriormente para los zumos de uva (Capítulo V). La acidez total registró valores relativamente más altos en los zumos MC que en los zumos CE.

En cuanto a los vinos procedentes de zumos de uva tratados por alta presión para ambos métodos de clarificación, éstos presentaron esencialmente la misma composición que los vinos procedentes de zumos controles, por lo que la alta presión no tuvo ningún

efecto sobre la composición de estos vinos. Los zumos de uva presurizados se mostraron aptos para la fermentación, ya que los vinos procedentes de los mismos evolucionaron de manera similar que los vinos procedentes de zumos de uva controles.

#### 6. 4. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DEL COLOR

Los parámetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , así como las medidas de intensidad y tono de los vinos fueron determinados mediante espectrometría. La intensidad es la suma de las absorbancias del vino correspondientes a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm, y el tono es representado por el cociente  $A_{420} / A_{520}$  (Tabla 6. 2).

**Tabla 6. 2.** Valores de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$ , intensidad y tono de los vinos a partir de mostos microfiltrados (MC) y clarificados mediante enzimas (CE) controles y tratados por alta presión

	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$Abs\ 420\ nm$	$Abs\ 520\ nm$	Intensidad	Tono
Cont MC	97,9	-1,07	8,56	8,63	0,126	0,029	0,164	4,34
AP MC	98,5	-1,31	8,49	8,59	0,119	0,022	0,145	5,41
Cont CE	98,9	-1,04	6,38	6,47	0,089	0,020	0,094	4,50
AP CE	98,8	-1,01	6,42	6,50	0,090	0,017	0,110	5,29

Los vinos procedentes de los zumos de uva MC y CE, mostraron valores similares de  $a^*$  (rojo) y de  $L^*$  (claridad). Sin embargo, la coordenada  $b^*$  (amarillo) mostró valores más altos en los vinos elaborados a partir de los zumos de uva MC que en los vinos de zumos de uva CE (8,5 frente a 6,4), así como el parámetro  $C^*$  (croma), el cual está relacionado con  $b^*$ . Los mismos resultados se encontraron en la determinación de la absorbancia a 420 nm ya que este parámetro y  $b^*$  miden el color amarillo. En esta zona, los valores espectrofotométricos en los vinos CE fueron más bajos que en los vinos MC, esto se debe posiblemente a la reducción de los compuestos fenólicos en los zumos después de la clarificación mediante enzimas, y por lo tanto en

los vinos fermentados a partir de estos zumos. De forma similar la intensidad de color ( $A_{420} + A_{520} + A_{620}$ ) registró valores bajos en estos vinos. Sin embargo, el tono mostró valores similares entre los vinos procedentes de los zumos MC y CE.

Como veremos más adelante, estas diferencias en los parámetros de color entre los vinos procedentes de zumos clarificados mediante diferentes métodos no se ha reflejado en el análisis sensorial, en el cual no se mostraron diferencias apreciables en el color de estos vinos.

La aplicación de la alta presión sobre los zumos de uva no produjo cambios en los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$  de los vinos procedentes de la fermentación de éstos, tampoco se registraron diferencias entre estos vinos en cuanto a absorbancias e intensidad, sin embargo, un ligero aumento del tono fue observado en las muestras de vino a partir de zumos presurizados.

Según algunos trabajos, la microfiltración no afecta al color de los zumos de uva, si bien favorece el color de los vinos procedentes de ellos (Moutounet *et al.*, 1986). También se ha descrito que la microfiltración retiene las actividades ortodifenoloxidasas en el concentrado, y la PFO de la uva se conoce por ligarse a las partículas sólidas del zumo durante la clarificación (Dubernet, 1974; Sapis *et al.*, 1982).

La aplicación de las altas presiones se mostró muy útil para estabilizar el color en estos productos. Los vinos se mostraron brillantes y con mejor aspecto durante los 2 meses de almacenamiento. Según algunos autores (Castellari *et al.*, 2000; Puig *et al.*, 2002) las alta presión estabiliza el color de los vinos y previene la oxidación de éstos.

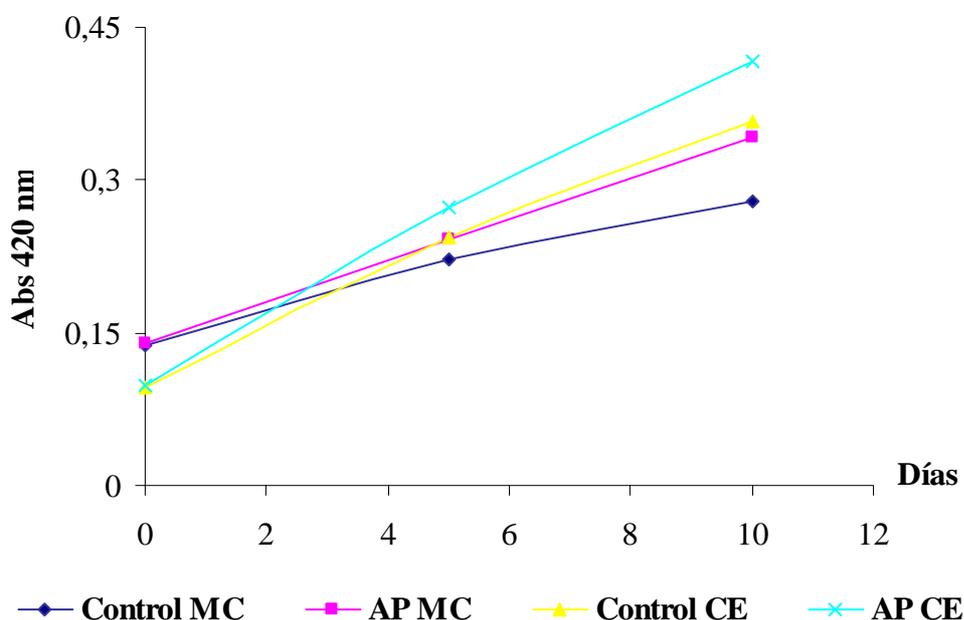
Según diferentes estudios (Ribéreau-Gayon, 1964, 1965; Cheynier *et al.*, 1993) los compuestos fenólicos son los principales responsables de los fenómenos de oxidación que pueden dar lugar a modificaciones de color y cambios organolépticos. La composición fenólica del vino depende mucho de la materia prima y de la vinificación adoptada.

Se ha descrito también que el ácido caftárico constituye la mayor fuente de polifenoles en los zumos de uva blancos (Nagel *et al.*, 1979), y que su derivado *o*-quinona oxida numerosos compuestos fenólicos en presencia de oxígeno.

Los vinos jóvenes (2 meses) fueron sometidos a un ensayo de oxidación (10 días) realizando medidas de absorbancia a 420 nm para predecir su oxidación en el tiempo (Figura VI. 3). Los resultados indicaron que los vinos procedentes de los zumos

de uva control y presurizados presentaron valores muy similares de absorbancia en el primer día del ensayo, así como en el día 5. La evolución de la absorbancia fue ascendiente con el tiempo en todos los vinos hasta alcanzar su máximo en el día 10, donde la absorbancia fue más alta en los vinos procedentes del zumo de uva CE que en los vinos procedentes del zumo de uva MC. Estos resultados sugieren la posibilidad de formación de complejos entre pectinas y fenoles solubles en los zumos, complejos que podrían ser precipitados con más eficacia en la clarificación enzimática, y con menos intensidad en el proceso de microfiltración lo que confirma los resultados encontrados en el capítulo anterior, el zumo clarificado mediante enzimas queda desprotegido y expuestos a una mayor oxidación durante cualquier contacto con el aire, a diferencia del zumo microfiltrado.

También se pudo observar en este último periodo de tiempo que los vinos procedentes de los zumos de uva presurizados presentaron una absorbancia más elevada respecto a sus controles.



**Figura VI. 3.** Ensayo de oxidación de los vinos procedentes de los zumos microfiltrados (MC) y clarificados mediante enzimas (CE) controles y presurizados (AP)

## 6. 5. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS VINOS

La fermentación alcohólica causa profundas modificaciones en el aroma y el sabor de los zumos de uva al transformarse en vinos jóvenes. La variedad Parellada produce vinos blancos aromáticos secos, de moderada graduación, con un aroma fresco y una delicada acidez frutal.

Los vinos jóvenes fueron evaluados dos meses después de la fermentación por 8 catadores habituados a este tipo de producto. Los resultados obtenidos en la cata se representan en la Figura VI. 4. Estos resultados indicaron que no hubo diferencias apreciables en el color y la acidez de los vinos, ni tampoco en el sabor de éstos. No obstante, se registraron diferencias considerables en el aroma entre los vinos procedentes de los zumos de uva MC y los procedentes de zumos de uva CE, sobre todo en el aroma a fruta y floral. Se observó que los vinos procedentes del zumo de uva MC presentaron un aroma a fruta y floral más intenso respecto a los otros vinos.

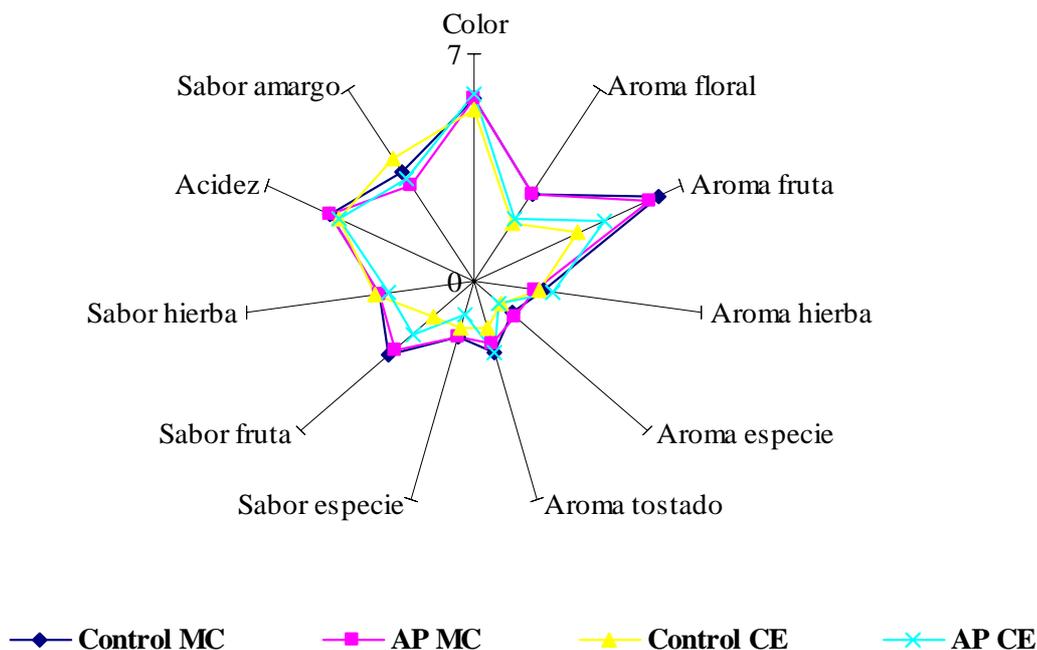
Los vinos elaborados a partir de zumos de uva MC y CE tratados por alta presión no registraron ningún efecto negativo sobre sus características organolépticas y no mostraron diferencias entre sus controles correspondientes, excepto en el caso del vino control elaborado a partir del zumo de uva CE, donde el aroma y sabor frutal fueron más bajos que en el vino procedente del zumo CE presurizado.

Pocos estudios existen actualmente sobre el efecto de la aplicación de altas presiones sobre la calidad organoléptica de zumos de uva o vinos. Lonvaud-Funel *et al.* (1994) mostraron que la aplicación de tratamientos de alta presión de 300- 350 MPa no indujo ningún efecto sobre las características organolépticas de los vinos. Otro estudio de Puig *et al.* (2002) mostró que los tratamientos de 500 MPa a 4 °C durante 7 min no tuvieron ningún efecto sobre las características organolépticas de los vinos blancos y tintos y que los catadores no pudieron distinguir entre los vinos control y los presurizados.

Según un estudio de Lao *et al.* (1997) sobre la calidad de tres tipos de zumos de uva y vinos blancos elaborados a partir de tres variedades de uva (Macabeo, Xarel·lo y Parellada), compararon los resultados de los valores promedios de color, aroma y sabor en cada variedad de zumo de uva y vino tratado por enzimas pectolíticas y una muestra control sin tratamiento. Los zumos de uva y vinos tratados por enzimas fueron de

calidad inferior a los controles. No hubo diferencias en el color, pero se registraron diferencias significativas en el sabor y el aroma de los zumos de uva y vinos tratados por enzimas.

Estos resultados confirman los encontrados en el caso de nuestros vinos procedentes de los zumos de uva CE. Parece ser que el uso de enzimas pectolíticos disminuye considerablemente la cantidad de sustancias coloidales presentes en el zumo de uva y vino. Estos componentes que influyen en el color, son muy importantes porque se encuentran unidos a componentes volátiles, estabilizando el aroma de los vinos (Lao *et al.*, 1996). Castino *et al.* (1990) y Bosso (1992) encontraron que algunos zumos de uva blancos tratados con preparaciones comerciales de enzimas pectolíticas, presentaron un descenso considerable en los ésteres totales de los vinos, compuestos que intervienen en el perfil aromático del producto.



**Figura VI. 4.** Perfil sensorial de los vinos elaborados a partir de zumos de uva microfiltrados (MC) y clarificados mediante enzimas (CE) control y tratados por alta presión (AP)

## **VII. CONCLUSIONES**

## EL GAZPACHO

1. El estudio realizado con los ingredientes vegetales por separado demostró que la adición de sal, aceite y vinagre provocó en todos los casos la reducción de la actividad PFO. Este efecto fue más acusado en el ajo. En el caso del pepino, hubo un incremento de la actividad POD al añadir sobre todo el aceite.
2. La pectinmetilesterasa es una enzima muy resistente a la presión. El tratamiento de 400 MPa, 15 min y 25 °C fue parcialmente efectivo, aunque posteriormente se produjo una reactivación de la enzima. Los tratamientos de 500 MPa a 50 °C, a pesar de que inicialmente produjeron una menor inactivación, durante el almacenaje la enzima no recuperó su actividad.
3. La polifenoloxidasas fue la enzima más sensible a la alta presión, respecto al resto de las enzimas estudiadas, y la mayor inactivación fue del 75 % en el tratamiento de 500 MPa, 30 min y 50 °C. Esta enzima mostró pérdidas de actividad a lo largo del almacenamiento en todos los tratamientos aplicados.
4. La peroxidasa es una de las enzimas más importantes del gazpacho debido a su capacidad de oxidar el producto y alterar sus características físico-químicas. Esta enzima fue muy sensible a los tratamientos de alta presión llevados a cabo a 50 °C registrándose una reducción inicial del 73% en el tratamiento de 500 MPa, 30 min. La peroxidasa, registró una recuperación de actividad a lo largo del almacenamiento en todos los tratamientos, sin embargo, el tratamiento de 500 MPa fue el más efectivo observándose una recuperación muy baja.
5. El tratamiento de alta presión produjo una reducción de la microbiota del gazpacho de dos unidades logarítmicas en los tratamientos de 400 MPa. La inactivación microbiana se incrementó hasta niveles de no detección en el tratamiento de 500 MPa, lo que permitió mantener estable el producto durante todo el periodo de

---

almacenamiento (30 días). El pH ácido del gazpacho contribuye como factor limitante en la evolución microbiana.

6. El incremento de la presión en las muestras presurizadas se correspondió con un incremento en las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  respecto a las muestras control. La alta presión indujo más pureza de color en el gazpacho presurizado. La disminución de las actividades enzimáticas polifenoloxidasas y pectinmetilesterasa por acción de las altas presiones, es en parte responsable de los cambios observados.
7. El tratamiento de 500 MPa durante 30 min y 50 °C produjo un mayor aumento de la viscosidad del gazpacho en comparación con los otros tratamientos estudiados. La consistencia del gazpacho tratado por la alta presión a 45 y 50 °C se mantuvo estable durante el almacenamiento, mientras que el control tuvo una pérdida de consistencia durante este periodo. La histéresis y el comportamiento reológico del gazpacho no se mostraron afectados por los tratamientos.
8. El análisis sensorial mostró que la aplicación de los tratamientos de alta presión, no afectaron la calidad organoléptica del gazpacho, y no causaron ningún cambio considerable en las características del gazpacho con relación al control.
9. En general las presiones entre 400 MPa y 500 MPa a 45 y 50 °C inactivan parcialmente las enzimas y producen la destrucción de los microorganismos que pueden alterar a la estructura del gazpacho, mejorando su color y consistencia. Así, la alta presión es un proceso potencialmente adecuado para la conservación de este producto durante su almacenamiento en frío.

## ZUMO DE UVA

1. El método de clarificación (microfiltración y clarificación enzimática) no afectó a las características físico-químicas de los zumos de uva.
2. Todos los tratamientos de alta presión aplicados, fueron suficientes para garantizar la estabilidad de los zumos de uva microfiltrados y clarificados mediante enzimas durante los 60 días de almacenamiento, sin afectar a sus características físico-químicas en comparación a sus correspondientes controles.
3. La actividad pectinmetilesterasa fue reducida a más del 50 % por todos los tratamientos de alta presión aplicados. La pectinmetilesterasa no mostró ninguna reactivación y se mantuvo estable durante todo el tiempo de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, no se detectó presencia de actividades enzimáticas polifenoloxidasas en ninguno de los zumos de uva debido al proceso de elaboración y a los tratamientos de clarificación aplicados a los zumos.
4. La aplicación de la microfiltración sobre el zumo de uva indujo una reducción inicial de ~2 log UFC/ml respecto al zumo clarificado mediante enzimas pectolíticas que presentaba recuentos iniciales de alrededor de 4 log UFC/ml.
5. Todos los tratamientos aplicados de alta presión indujeron una reducción inicial superior a 1 log UFC/ml en los recuentos totales. Las bacterias lácticas, mohos y levaduras sufrieron reducciones muy superiores consiguiendo reducciones por debajo del límite de detección.
6. Los zumos presurizados se mantuvieron estables durante todo el tiempo de almacenamiento y no se registró ningún crecimiento microbiano. Por lo tanto todos los tratamientos aplicados fueron eficientes para garantizar la estabilidad de los zumos de uva.

7. Los tratamientos de alta presión permitieron estabilizar los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  y  $C^*$  de los zumos de uva durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A los 60 días, se detectaron cambios con un aumento considerable en el valor de los parámetros de color, los cuales indicaron un inicio de pardeamiento en ambos zumos, excepto para la muestra del zumo microfiltrada tratada a 500 MPa, 2 °C y 10 min, muestra que fue la mejor en conservar los parámetros de color. Las muestras control sin embargo, presentaron signos de pardeamiento antes de los 30 días de almacenamiento.
  
8. El análisis sensorial dio a conocer que las muestras tratadas a 500 MPa durante 10 min a 2 °C y sus correspondientes controles presentaron las mismas características organolépticas, no registrándose diferencias entre muestras en el primer día después del tratamiento. Las muestras control sufrieron cambios importantes que afectaron sobre todo al dulzor y acidez a lo largo del almacenamiento. Los zumos tratados por alta presión mantuvieron las características organolépticas estables durante el almacenamiento.

### **APTITUD A LA VINIFICACIÓN DE LOS ZUMOS DE UVA**

1. Los zumos tratados por alta presión mostraron una cinética de fermentación similar a sus controles y fueron aptos para la vinificación. Todas las colonias analizadas, incluidas las obtenidas al final de la fermentación presentaron el mismo perfil que la levadura inoculada en cada uno de los zumos de uva controles y presurizados clarificados por microfiltración y por enzimas, lo que indica que la cepa inoculada estuvo presente en un 100 % de los casos analizados, desde el cuarto día hasta el final de la fermentación.
  
2. La composición físico-química de los vinos no presentó diferencias entre los procedentes de zumos tratados por alta presión y sus controles procedentes de zumos sin tratamiento. Los vinos elaborados a partir de zumos microfiltrados y

---

clarificados por enzimas mostraron valores similares en las características físico-químicas excepto para los azúcares totales y los alcoholes totales. Estos cambios podrían estar relacionados con el método de clarificación aplicado sobre los zumos.

3. Los parámetros de color  $L^*$  y  $a^*$  fueron similares en los vinos procedentes de zumos microfiltrados y clarificados por enzimas, mientras que los parámetros  $b^*$  y  $C^*$  mostraron diferencias. Estas diferencias se deben esencialmente al método de clarificación de los zumos. El tratamiento de alta presión aplicado a los zumos no tuvo efecto sobre el color final de los vinos.
  
4. Las evaluaciones sensoriales mostraron que no hubieron diferencias en el color ni en la acidez de los vinos y que la alta presión no tuvo ningún efecto sobre las características organolépticas de los vinos, los cuales fueron evaluados de buena calidad por los catadores. Sin embargo, se registraron diferencias considerables en el aroma entre los vinos procedentes de los zumos de uva microfiltrados y los procedentes de zumos de uva clarificados por enzimas, sobre todo en el aroma a fruta y floral. Los vinos procedentes del zumo de uva microfiltrado presentaron un aroma a fruta y floral más intenso respecto a los otros vinos.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

Amati, A., Castellari, M., Matricardi, L., Arfeli, G., & Carpi, G., 1996. Modificazioni indotte in mosti d'uva da trattamenti con alte pressioni idrostatiche (Effects of high pressure on grapes musts composition). *Industrie delle Bevande*, 25: 324-328.

Amerine, M. A., Berg, H. W., & Cruess, W. V., 1972. *The Technology of winemaking*. 3<sup>rd</sup> (ed.) Avi Publishing Co., Westport, Conn.

AOAC, 1990. Nitrogen (total crude protein) in plants. *Official Methods of Analysis*. 15 edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.

AOAC, 1990. Solids (total) in canned vegetables gravimetric method. *Official Methods of Analysis*. 15 edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.

Asaka, M., & Hayashi, R., 1991. Activation of polyphenoloxidases in pear fruit by high pressure treatment. *Agric. Biol.Chem.*, 55: 2439-2440.

Ballinger, W. E., Maness, E. P., Nesbitt, W. B. & Carroll, D. E., 1973. Anthocyanins of black grapes of 10 clones of *Vitis rotundifolia*, MiCHX. *Journal of Food Science*, 38: 909-912.

Balny, C. L., & Masson, P., 1988. Les hautes pressions outil d'investigation biochimique. *Innov. Biol. Med.*, 9: 294-320.

Balny, C. L., & Masson, P., 1993. Effect of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9: 511-512.

Barillère, J. M., Escudier, J. L., Moutounet, M., & Benard, P., 1986. Microfiltration tangentielle de moûts et de vins. 1re partie: Compte rendue des essaies 1984. Ultrafiltration et microfiltration tangentielle en œnologie. Institut Technique de la vigne et du vin. Paris. (ed). *Concours du Ministère de l'Agriculture (D.I.A.M.E.)*.

Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow D., 1983. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, New York.

Basak, S., & Ramaswamy, H. S., 1996. Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase. *Food Research International*, 29: 601-607.

Basak, S., Rmaswamy, H. S. & Simpson, B. K., 2001. High pressure inactivation of pectin methyl esterase in orange juice using combination treatments. *Journal of Food Biochemistry*, 25: 509-526.

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.

Berger, J. L., & Jhean, P. 1986. Microfiltration tangentielle de beaujolais, quelques essaies industrielles conduits en 1984-1985. Ultrafiltration et microfiltration tangentielle en œnologie. Institut Technique de la vigne et du vin. Paris. Ed. *Concours du Ministère de l'Agriculture (D.I.A.M.E.)*.

Berk, Z., 1976. Control of enzymatic browning. Introduction of Biochemistry of Foods. Elsevier Science. Amsterdam, 252-256.

Bognár, A., Butz, P., Kowalski, E., Ludwig, H., & Tauscher, B., 1993. Stability of thiamine in pressurized model solutions and pork. Proceedings of the International Conference Bioavailability, 352-356.

Bosso. A., 1992. La macerazione delle Buccie nella vinificazione in bianco in presenza di preparati pectoliticici. Vini d'Italia, 4: 25-40.

Brauch, U. H., & Ludwig, H., 1990. The effect of pressure on bacteriophage. High Pressure Research, 5: 767-769.

Brigman, P. W., 1914. The coagulation of albumen by high pressure on proteins. Food Reviews International, 9: 611-628.

Brown M. G., Kilmer, R. L. & Bedigian, K., 1993. Overview and trends in the fruit juice processing industry. Ch. 1, S. Nagy, C.S. Chen, and P.E. Shaw, p- 1-22 (ed.). In Fruit Juice Processing Technology. AgScience, Inc., Auburndale, FL.

Brulé, G., Maubois, J. L., & Fauquant, J., 1974. Etude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane. Le lait, 54: 600-615.

Buffa, M., Guamis, B., Royo, C., & Trujillo, A. J., 2001. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high pressure-treated milk. Food Microbiology, 18: 45-51.

Burnette, F. S., 1977. Peroxidase and its relationship to food flavour and quality. Journal of Food Science, 42: 1-6.

Butz, P. & Ludwig, H., 1986. Pressure inactivation of microorganisms at moderate temperatures. Physica, 139 - 140 B: 875- 877.

Butz, P., Koller, W.D., Tauscher, B., & Wolf, S., 1994. Ultra-high pressure processing of onions: Chemical and sensory changes. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 27: 463-467.

Butz, P. Edenharder, R., Fister, H., & Tauscher, B., 1997. The influence of high pressure processing on antimutagenic activities of fruit and vegetable juices. Food Research International, 3: 287-291.

Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., & Brun, S. 1980. Teneur en cobalt des moûts et des vins du midi de la France. Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 40: 15-22.

Cano, M. P., Hernández, A., & De Ancos, B., 1997. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. Journal of Food Science, 62: 85-87.

Capellas, M., Mor-Mur, M., Sendra, E., Pla, R. & Guamis, B., 1996. Population of aerobic mesophils and inoculated *E.Coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressure. Journal of Food Protection, 59: 582-587.

- Carlez, A., 1994. Traitements para hautes pressions d'aliments d'origine musculaire: Destruction microbienne, modification de couleur, gélification protéique. Thèse, Université Montpellier II. Montpellier.
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Rovere, P., & Amati, A., 1997. Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts. *Food Chemistry*, 60: 647-649.
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Carpi, G., & Galassi, S., 2000. Effects of high hydrostatic pressure processing and of glucose-catalase addition on the color stability and sensorial score of grape juice. *Food Science Technology International*, 6: 17-23.
- Castino, M., Bosso, A., & Giacomella, M., 1990. Elaborazione di vini bianchi con macerazione a freddo e in presenza de enzimi peptolítici. *Vini d'Italia*, 5: 7-20
- Certes, A., 1884. L'action des hautes pressions sur les phenomenes de la putrefaction et sur la vitalité des microorganismes d'eau douce et d'eau de mer. *Compte Rendue*. 99: 385-388.
- Cheftel, J. C., 1991. Application des hautes pressions en technologie alimentaire. *Actualités des Industries Alimentaires et Agro-Alimentaire*, 108: 141-153.
- 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), 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., & Cullioli, J., 1997. Effect of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 3: 211-236.
- Cheyrier V., Masson G., & Moutounet, M., 1993. Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *American Journal of Oenology and Viticulture*, 44: 393-399.
- Chong, P. L., Fortes, P. A., & Jameson, D. M., 1985. Mechanisms of inhibition of Na / K ATPASE by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *Journal Biology Chemistry*, 260: 14484-144890.
- Crelier, S., Tâche, M. C., Raemy A., Renken, A., & Raetz, E., 1995. High-pressure for the inactivation of enzymes in food products : Thermal and HHP treatment of tomato pectin methyl esterase. Poster presentation at the 9th World Congress on Food and Science and Technology, Budapest, Hungry.
- Crelier, S., Robert, M. C., & Juilerat, M. A., 1999. Effect of high-pressure treatment on the texture and enzyme activities of selected vegetables. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, 413-416. Berlin: Springer-Verlag.
- Crelier, S., Robert, M. C., Claude, J., & Juillerat, M. A., 2001. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygaluronase behaviours regarding heat and pressure-induced inactivation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 5566-5575.

- Dall'Aglio, G., Gola, S. & Carpi, G., 1992. Impiego delle alte presión nell'industria alimentare. *Ind. Conserve*, 67: 23-28.
- Daoudi, L., Quevedo, J.M., Trujillo, A., Capdevila, F., Bartra, E., Minguez, S. & Guamis, B., 2002. Effects of High Pressure Treatment on The Sensory Quality of White grape juice. *High Pressure Research*, 22: 705-709.
- De Lamo, S., Capellas, M., López, T., Hernández, M., Guamis, B., & Roig, A. En prensa. Behaviour of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in model cheese treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*.
- Delfini, C., Conterno, L., Carpi, G., Rovere, P., Tabusso, A., Cocito, C., & Amati A., 1995. Microbiological stabilization of grape musts and wines by high hydrostatic pressures, *Journal of Wine Research*, 73: 143-151.
- Denda, A., & Hayashi, R., 1992. Emulsifying properties of pressure-treated proteins. *High Pressure and Biotechnology*, 333-335. (eds) C.Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P.Masson. John Libbey Eurotext, Montrouge.
- Deuchi, T., & Hayashi, R., 1992. High pressure treatments at subzero temperature: Applications to preservation, rapid freezing and rapid thawing of foods. *High pressure and Biotechnology*, 261-267. (eds) C.Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P.Masson John Libbey Eurotext, Montrouge.
- Duburnet, M., 1974. Recherches sur la tyrosine de *Vitis vinifera* et la laccase de *Botrytis cinerea*. Applications Technologiques. Thèse doctorat Bordeaux.
- Eagerman, B. A., & Rouse, A. H., 1976. Heat inactivation temperature-time relationships for Pectinesterase inactivation in Citrus juice: a Kinetic study on inactivation of Pectin methyl esterase. *Food Research International*, 29: 601-607.
- Earnshaw, R., G., 1995. Kinetics of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Processing of Foods*, 37-46. (eds.) L. A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw & A. P. M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.
- Earnshaw, R. G., 1996. High pressure food processing. *Nutrition and Food Science*. 2: 8-11.
- Ector, B. J., Magee, J.B., Hegwood & Coign M., J., 1996. Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines, *American Journal of Oenological Viticulture*, 47: 57-62.
- Eshtiaghi, M.N. & Knorr, D. 1993. Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 58: 1371-1374.
- Eshtiaghi, M., N., Stute, R., & Knorr, D., 1994. High pressure and freezing pre-treatment effects on drying, rehydratation, texture and color of green beans, carrots and potatoes. *Journal of Food Science*, 59: 1168-70.
- Farkas, D. F., 1986. Novel process- Ultra high pressure processing. *Food Protection Technology*, p- 393-398 (ed.) C. W. Felix , Lewis Publishers, INC, Ann Arbor, Michigan.

- Farr, D., 1990. High pressure technology in the food industry. Trends in Food Science and Technology. July, 14-16.
- Felipe, X., Trujilo, A. J., Sendra, E., & Guamis, B., 1994. Utilización de los tratamientos de la alta presión para la conservación de alimentos. Alimentaria, Octubre, 35-39.
- Fernández García, A., Butz, P., & Tauscher, B., 2000. Effects of high-pressure processing on carotenoid extractability, antioxidant activity, glucose diffusion, and water binding of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Journal of Food Science, 66: 1033-1038.
- Ferragut, V., Martínez, V. M., Trujillo, A. J. & Guamis, B. 2000. Properties of yoghurts made from whole ewe's milk treated by high hydrostatic pressure. Milchwissenschaft, 55: 267-269.
- Flora, L. F., 1976. Time-temperature influence of muscadine grape quality. Journal of Food Science, 41: 1312-1315.
- Flora, L. F., 1979. Optimum quality parameters of muscadine grape juices, beverages and blends, Journal of Food Quality, 2: 219-229.
- Fonberg-Broczek, M, Arabas, J., Górecka, K., Grochowska, A., arlowski, K., Kostrzewa, E., Szczeek, J., Scieczynska, H., Windyga, B., Zdziennicka, D., Zurkowska-Beta, J., & Porowska, S., 1997. High pressure processed apple and strawberry desserts. High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry, p- 193-199 (ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Francis, F. J., Harbone, J. B. & Baker, W. G., 1966. Anthocyanins in the lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium*. Journal of Food Science, 31: 583-587.
- Fuchigami, M. & Teramoto, A., 1997. Structural and textural changes in *Kinu-tofu* due to high pressure-freezing. Journal of Food Science, 62: 828-837.
- Fuchigami, M., Kato, N., & Teramoto, A., 1997. High-pressure-freezing effects on textural quality of carrots. Journal of Food Science, 62: 804-808.
- Fuchigami, M., Kato, N., & Teramoto, A., 1998. High-pressure-freezing effects on textural quality of chinese cabbage. Journal of Food Science, 63: 122-125.
- Fukuhisa, K., Ogawa, H., & Fukumoto, H., 1993. High pressure treatment of *Satsuma* mandarin juice and lyokan sections in syrup. High Pressure Bioscience and Food Science (ed.) R. Hayashi, p- 36-342. Kyoto: San Ei. Pub. Co.
- Funtenerberger, S., Dumay, E., & Cheftel, J. C., 1995. Pressure agregation of  $\beta$ -lactoglobulin isolate in different pH 7 buffers. Lebensmittel. Technol., 28: 410-418.
- Gaillard, M., & Berger, J. L., 1984. Ultrafiltration et Microfiltration tangentielle. Résultats d'essais sur les moûts et sur les vins. Vignes et Vins, 329: 39-48.
- Gásková, D., Sigler, K., Janderová, B., & Plásek, J., 1996. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cell: factors influencing the killing efficiency. Bioelectrochem. Bioenerg., 39: 195-202.

- Gekko, K., 1992. Effects of pressure on sol-gel transition of food macromolecules. *High Pressure and Biotechnology, Colloque INSERM Vol. 244*, p- 1 5-113 (eds.) C. Blany, R. Hayashi, K. Heremans, and P. Masson. John Libbey Eurotext/Les editions ISERM, Montrouge, France.
- Glories, Y., 1988. Anthocyanins and tannins from wine: organoleptic properties. *Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*, 2: 123-134.
- Golan-Goldhirsh, A., & Whitaker, J. R., 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thilo compounds on mushroom polyphenoloxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 32: 1003-1009.
- Gomes, M. R., & Ledward, D. A., 1996. Effect of high hydrostatic pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidase. *Food Chemistry*, 56: 1-5.
- Goodner, J. K., Bräddok, R. J., & Parish, M. E., 1998. Inactivation of pectinmethylesterase in orange and grape juices by high pressure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 1997-2000.
- 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.
- Gross, M., & Jaenicke, R., 1994. Proteins under high pressure: the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. Journal of Biochemistry*, 221: 617-630.
- Gustin, D., Bera, F., Dumont de Chassart, Q., & Mertens, B., 1997. Pectin gelification under HHP: gel and formation mechanisms. K. Heremans, *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p-195-200. (ed.) K. Heremans. Leuven University Press. Leuven, Bélgica.
- Haard, N. F., & Tobin C. L., 1971. Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit. *Journal of Food Science*, 36: 854- 857.
- Haard, N. F., 1977. Physiological roles of peroxidase in post-harvest fruits and vegetables. *Enzymes in Food and Beverage Processing* (eds. Ory, R. L. & St. Angelo, A. T.), American Chemical Society Symposium series 47. En: American Chemical Society, Washington DC.
- Hagerman, Ann E., & Austin, J., 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *American Chemical Society*, 34: 440- 444.
- Hamada, K., & Shimada S., 1991. *High pressure Science of Food*, (ed.) Hayashi, R., San-Ei Pub. Co., Kyoto, 16: 181-188.
- Hara, A., Nagahma, G., Ohbayashi, A., & Hayashi, R., 1990. Effects of high pressure on inactivation of enzymes and microorganisms in non-pasteurized rice wine (namaske). *Nippon Nogeikgaku Kaishi*, 64: 1025-1030.
- Harrison, T. A., Hindorff, L. A., Kim, H., Wines, R. C. M., Bowen, D. J., McGrath, B. B., & Edwards, K. L. 2003. Family history of diabetes as a potential public health tool. *American Journal of Preventive Medicine*, 24: 152-159.

- Hassan, K. S., & Krishnaswamy, S., 1992. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73: 241-243.
- Hayashi, R., 1989. Application of high pressure to food processing and preservation: Philosophie and developpement. *Engineering and Food*. W.E.L. Spiess, H. Schubert (eds.), Elsevier Applied Science, London, 2: 815- 826.
- Hayashi, R. & Hayashida, A., 1989. Increased amylase digestibility of pressure treated starch. *Agric. Biolo. Chem.*, 53: 2543-2544.
- Hayashi, R., 1992. Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology. *High Pressure and Biotechnology*, 185-193. (eds) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson John Libbey Eurotext, Montrouge.
- Hayashi, R., 1997. *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p-1-4 (ed.) K. Heremans, Leuven University Press, Leuven.
- Hendrickx, M., Ludickhuyze, L., Van den Broeck, I. & Weemaes, C., 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 197-203.
- Heremans, K., 1995. High pressure effects on biomolecules. *High pressure Processing of Foods*, 81- 98. (eds), Ledward L. A., Johnston, D. E., Earnshaw, R. G., & Hasting, A. P. M., Nottingham University Press, Leicestershire.
- Hernández A., & Cano, M. P., 1998. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Tomato Puree. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 266-270.
- Hite, B. H., Giddings & Weakly, C. E., 1914. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruit and vegetables. *W. Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin*, 146: 1-67.
- Hite, B. H., 1899. The effects of pressure in the preservation of milk. *Bull. West Virginia Univ. Agric. Expert. Sta.*, Morgan Town, 58: 15-35.
- Homma, N., Ikeuchi, Y., & Suzuki, A., 1994. Effects of high pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat. *Meat Science*, 38: 219-228.
- Hong, S. I., & Kim, D. M., 2001. Storage quality of chopped garlic as influenced by organic acids and high- pressure treatment. *Journal of Science and Food Agriculture*, 81: 397-403.
- 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.
- Hoover, D. G., 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technology*, 47: 150-157.
- Horie, Y., Kimura, K., Ida, M., Yoshida, Y., & Ohki, K., 1992. Identification and pressure sterilization of a candida strain resistant to high pressure. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 66: 713-18.

- Irwe, W., & Olsson, I., 1994. Reduction of pectinesterase activity in orange juice by high-pressure treatment. *Minimal Processing of Foods and Process Optimization. An interface*; Raton, FL., 35- 43.
- Isaacs, N. S., Chilton, P., & Mackey B., 1995. Studies on the inactivation by high pressure of micro-organisms. *High Pressure Processing of Food*, p-65- 79 (ed.) D. A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw y A. P. M. Hasting. Nottingham University Press, Leicestershire, Reino Unido.
- Ivaldi, F., 1986. Ultrafiltration et microfiltration tangentielle: généralités, principe. Ultrafiltration et microfiltration tangentielle en œnologie. Institut Technique de la vigne et du vin. Paris. Ed. Concours du Ministère de l'Agriculture (D.I.A.M.E.).
- Jolibert, F., Tonello, C., Sagegh, P., & Raymond, J., 1994. Les effets des hautes pressions sur la polyphenoloxidase des fruits. *Bios. Boissons*, 251: 27-35.
- Joylyn, M. A. & Pilnik, W., 1961. Enzymes and enzyme activity. Ch. 12 in the orange: Its Biochemistry and Physiology, p- 373-435 (ed.), W.B. Sinclair. University of California.
- Kimura, K., 1992. Developpement of a new fruit processing method by high hydrostatic pressure. First European Meeting. Novembre, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Kimura, K., Ida, M., Yosida, Y., Ohki, K., Fukumoto, T., & Sakui, N., 1994. Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavour component, hue, and nutrients during storage. *Biosci, Biotechnol, Biochem.*, 58: 1386-1391.
- Knorr, D., 1994. High pressure effects on plant derivate foods. *Proceedings of High Pressure Conference*, Reading, Mar. 28-29.
- Knorr, D., Böttcher, A., Dörnenberg, H., Eshtiaghi, M., Oxen, P., Richwin, A., & Seyderhelm, I., 1992. High pressure effects on microorganisms, enzyme activity and food functionality. 211-218, (eds) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson John Libbey Eurotext, Montrouge.
- Ko, W. C., Tanaka, M., Nagashima, Y., Taguchi, T. & Amano, K., 1990. Effect of high pressure treatment on the thermal gelation of sardine and Alaska pollac meat and myosin pastes. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37: 637-642.
- Krebbes, B., Master, M. A., Hoogerwerf, S. W., Moezelaar, R., Tomassen, M. M. M., & Van Den Berg, R. W., 2003. Combined high pressure and thermal treatment for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 377-385.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel A. E., & Etherton, T. D., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113: 71-88.
- Kübel, J., Ludwig, H. & Tauscher, B., 1997. Influence of UHP on vitamin A acetate content. *High Pressure Research in the Biosciences and Bitechology*, p-331-334 (ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.

- Kumar, M., & Berwal, J. S., 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Alium sativum*). *J. Appl Microbiol.*, 84: 213-215.
- Kunugi, S., & Tanaka, N., 1997. Effect of pressure on protease reactions activation-desactivation and specificity. En *High Pressure Research in the Bioscience and Biotechnology*, p-79-82 (ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- Liu, J. R., Gallader, J. F., & Wilker, K. L., 1987. Effect of juice clarification on the composition and quality of eastern US table wines. *Journal of Oenology and Viticulture*, 38: 147-150.
- Lao, C., López-Tamames, E., Buxaderas, S., & De la Torre-Boronat, M. C., 1996. Grape pectic enzyme treatment effect on white musts and wines composition. *Journal of Food Science*, 612: 553-556.
- Lao, C., López Tamames, E., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., & De la Torre-Boronat, M.C., 1997. Pectic Enzymes treatment effects on quality of white grape musts and wines. *Journal of Food Science*, 62: 1142-1149.
- Lee, M., & Macmillan, J. D., 1968. Mode of action of pectic enzymes. I. Purification and certain properties of tomato pectinesterase. *Biochemistry*, 7:4005-4010.
- Lonvaud-Funel, A., Damazeau, G., & Bignon, J., 1994. Essais de mutage de vins blancs liquoreux par traitement aux hautes pressions. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28: 5-66.
- Lubbers, S., Voille, A., Charpentier, C., & Feuillat, M., 1993. Mise en evidence d'interactions entre les macromolécules et les arômes du vin. *Rev. Frac. Oenol.*, 144: 12-19.
- Ludwig, H., Bieler, C., Hallbauer, K., Scigala W., 1992. Inactivation of microorganisms by high hydrostatic pressure. *High Pressure and Biochemistry*, (ed.) C. Blany, R. Hayashi, K. Heremans, P. Masson Paris: INSE and John Libbey.
- Ludwig, H. & Schreck, Ch., 1997. The inactivation of vegetative bacteria by pressure. *High pressure Research in the Bioscience and Biotechnology*, p-221-224 (ed.) K. Heremans. Leuven University Press, Leuven. Bélgica.
- Lukton, A., Chichester, C.O., & Mackinney, G., 1956. The breakdown of strawberry anthocyanin pigment. *Food Technology*, 10: 421-425.
- Mackey, B. M., Forestière, K., & Isaacs, N. S., 1995. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 9: 1-11.
- Mandava, R., Fernandez, I., & Juillerat, M., 1994. Effect of high hydrostatic pressure on sausagebatters. A Proceeding of the 40<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology. La Haya, Países Bajos.
- Mantis A. J., Koidis P. A., Karaioannoglou, P. G. & Panetsos, A. G., 1979. Effect of garlic extract on food poisoning bacteria, *Cl perfringens*. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 12: 330-332.
- Marshal, M. R., Marco, J. E., & Barrack, R.J., 1985. Effect of total solid level on heat activation of pectin esterase in orange juice. *Journal of Food Science*, 50: 220-222.

- Masson, P., 1992. Pressure denaturation of proteins. En: High pressure and Biotechnology. 89-100 (Eds.) C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson John Libbey Eurotext, Montrouge.
- Matsumoto, T., & Hayashi, R., 1990. Properties of pressure-induced gels of various soy protein products. *Nippon Norgeikagaku Kaishi.*, 64: 1455-1459.
- Mermelstein, N.H., 1997. High pressure processing reaches the U.S. Market. *Food Technology*, 51: 95-96.
- McCalloch, R. J., Nielsein, B. W., & Beavens, E. A., 1950. Factors influencing the quality of tomato paste, pectic changes during processing. *Food Thecnology*, 5: 691- 693.
- McLellan, K. M. & Robinson, D.S., 1981. The effect of heat on cabbage and brussel sprout peroxidase enzymes. *Food Chemistry*, 7: 257-66.
- McLellan, K. M., & Robinson, D. S., 1983. Cabbage and Brussels sprout peroxidase isoenzymes separated by isoelectric focussing. *Phyto Chemistry*, 22: 645-7.
- Mertens, B., & Deplace, G., 1993. Engineering aspects of high pressure technology in the food industry. *Food Technology*, June, 164- 169.
- Moio, L., La Pietra, L., Cacace, D., Palmieri, L., De Martino, E., Carpi, G., & Dall'Aglio, G., 1994. Prove di stabilizzazione di mosti mediante la tecnologia delle alte pressioni. *Industrie delle bevande*, 23: 436-441.
- Morlid, E., 1981. The theory of pressure effects on enymes. *Advances Proteins Chemistry*, 34: 93-166.
- Mosahev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., & Blany, C., 1994. Exploting the effect of high hydrostatic presssure in biotechnological aplications. *Tibtech*, 12: 493-501.
- Moutounet, M., Escudier, J. L., Brillère, J. M., & Benard, P., 1986. Microfiltration tangentielle de moûts et de vins. 2<sup>e</sup> partie: Données chromatique. Ultrafiltration et microfiltration tangencielle en œnologie. Institut Technique de la Vigne et du Vin. Paris. (ed.) Concours du Ministère de l'Agriculture (D.I.A.M.E.).
- Mussa, D. M & Ramaswamy, H. S., 1997. Ultra high pressure pasteurization of milk: Kinetics of microbial destruction and changes in physico-chemical characteristics of microbial destrucction and changes physico-chemical characteristics. *Lebensmittel Wissenscheft and Technologie*, 33: 345-363.
- Nagel, C. W., Baranowski, I. D., Wulf, L. W., & Powers, J. R., 1979. The hydroxycinnamic acid tartaric acid ester content of musts and grape varieties grown in the acific NorthWest. *American Journal of Oenology and Viticulture*, 30: 198-201.
- Ochiai, S. & Nakagawa, Y., 1991. Package of high pressure food processing. *Pressure Science for Food*. (Ed.) R. Hayashi. Japan. 381-386.
- Office International de la Vigne et du Vin. 1990. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts, Paris.

- 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. (Tokyo)*, 54: 1219-1225.
- Ohmiya, K., Fukami, K., Shimizu, S., & Gekko, K., 1987. Milk curdling by rennet under high pressure. *Journal of Food Science*, 52: 84-87.
- Ohmiya, K., Kajino, T., Shimizu, S., & Gekko, K., 1989. Effect of pressure on the association states of enzymes treated caseins. *Agricultural Biology and Chemistry*, 53: 1- 7.
- Ohshima, T., Ushio, H., & Koizumi, C., 1993. High pressure processing of fish and fish products. *Trends in Food Science and Technology*, 4: 370-375.
- O'Reilly, C. E., O'Connor, P. M., Murphy, P. M., Kelly, A. L., & Beresford, T. P., 2000. The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar cheese ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1: 109-117.
- Ough, C. S., & Berg H. W., 1974. The effect of two commercial pectic enzymes on grape musts and wines. *American Journal of Oenology and Viticulture*, 25: 208-211.
- Ough, C. S., Noble, A. C., & Temple, D., 1975. Pectic enzymes effects on red grapes. *American Journal of Oenology and Viticulture*, 26: 195-200
- Ough, C. S., & Crowel, E. A., 1979. Pectic enzyme treatment of white grapes: temperature variety skin-contact time factors. *American Journal of Oenology and Viticulture*, 30: 22-27.
- Oxen, P., & Knor, D., 1993. Preparation of high quality of tomato products using enzyme inactivation by microwave heating. *Engineering and Food*. p- 251-258, Vol. II (ed.) W. E. L. Spiess & H. Schubert, Elsevier Applied science, London.
- Otake, T., Mori, H., Kawahata, T., izumoto, Y., Nishimura, H., Oishi, I., Shighisa, T., & Ohno, H., 1997. Effects of high hydrostatic pressure treatment of HIV infectivity. *High Pressure Research in Biosciences and Biotechnology* (ed.) K. Heremans, p-234-236. Leuven University Press, Lovaina, Bélgica.
- Palou, E., López- Malo, A. Barbosa-Casanovas, G.V., Welti-Chanes, J., & Swanson, B. G., 1999. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high pressure treated banana puree. *Journal of Food Science*, 64: 42-45.
- Parish, M. E., 1991. Microbial concerns in citrus juice processing. *Food Technology*, 45: 128, 130 y 132-136.
- Parish, M. E., 1993. Review of high pressure processing for shelf-life extension of orange juice. Presented at the 44<sup>th</sup> annual Citrus Processors' Meeting, Univ. of florida, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, FL, USA.
- Parish, M. E., 1988. Microbiological aspects of fresh squeezed citrus juice. *Proceeding of Food Industry Short Course: Ready to Serve Citrus Juices and Juice Added Beverages* (ed.) R. F. Mattheews. Univ. of Florida, Gainesville, FL, USA.

- Parish, M. E., 1998. High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. *Journal of Food Safety*, 18: 57-65.
- Patterson, M. F., Quin, M., Simpson, R., & Gilmour, A. 1995. The effect of high pressure on vegetative pathogens. Ch. 5. High Pressure Processing of Foods. D. A., Ledward, D.E., Johnstone, R.G. Earnshaw, & A. P. M. Hasting, p- 47-63 (ed.). Nottingham University Press.
- Patterson, M. F., Margey, D. M., Mills, G., Simpson, R., & Gilmour, A., 1997. The effect of high pressure treatment on microorganisms in foods. High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, K. Heremans, p- 269-272 (ed.) Leuven University Press, Leuven.
- Patterson, M. F., & Kilpatrick, A., 1998. The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61: 432-436.
- Pilnik, W., & Voragen, A. G. J., 1991. The significance of endogeneous and exogeneous pectic enzymes in fruit and vegetable processing. *Food Enzymology*; Fox, P.F., p- 303-309 (ed.) Elsevier Scientific Publishers, Belfast.
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., & Mor-Mur., M., 1998. Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure in inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 15-19.
- Pontes., L. A., Fornells, L. A., Giongo, V., Araujo, J. R. V., Sepulveda, A., Villas-Boas, M., Bonafe, C. F. S., & Silva, J. L., 1997. Pressure inactivation of animal viruses: Potential biotechnological applications. High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology (Ed.) K. Heremans. P- 91-94. Leuven University Press, Lovaina, Bélgica.
- Ponting, J. D., Sanshuck, D. W., & Brekke, J. E., 1960. Color measurement and deterioration in grape and berry juices and concentrates. *Food Research*, 25: 471-475.
- Porretta, S., & Leoni, C., 1990. Preparation of high-quality tomato products using enzyme inactivation by microwave heating. *Engineering and food*. Vol II. (Ed.) W. E. L. Spiess & H. Schubert. Elsevier Applied Science. London. P- 251-258.
- Porretta, S., 1991. Nonenzymatic browning of tomato products. *Food Chemistry*, 40: 323-335.
- Porretta, S., 1992. Profili quantitative descrittivi (QDA, Quantitative Descriptive Analysis) e analisi delle curve Tempo-Intensità. L'analisi Sensoriale. *Tecniche nuove*, 192-224.
- Porretta, S., Carpi, G., Dall'Aglio, G., & Ghizzoni, C., 1992 a. Use of Ultrafiltration for preparing improved tomato pulp. *International Food Science and Technology*, 27: 427-433.
- Porretta, S., Sandei, L. Crucitti, P. M., Poli, G. M., & Attolini, M. G., 1992 b. Comparison of the main analytical methods used in quality control of tomato paste. *International Food Science and Technology*, 27: 145- 52.
- 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.

- Puig, A., Vilavella, M., Daoudi, L., Guamis, B., & Mínguez, S., 2002. Estabilización microbiológica y bioquímica de vinos por aplicación de la técnica de altas presiones. International Meeting of Wines, Bratislava.
- Qin, B. L., Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G., 1996. Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr., 36: 603-627.
- 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.
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D., 1992 a. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Syst. Appl. Microbiol., 15: 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón D., 1992 b. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol., 58: 2948-2953.
- Rao, M.A., & Cooley, H. J., 1992. Rheology of tomato pastes in steady dynamic shear. Journal of Texture Studies, 12: 521-538.
- Reynold, T.M., 1963. Chemistry of non-enzymatic browning. Advanced in Food and research, Vol. 12. C. O. Chishester, (ed.) E. M. Mark and G. F. Stewart. Academic Press, London.
- Ribéreau-Gayon, P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides. Ann. Physiol. Vég., 6: 211-242.
- Ribéreau-Gayon, P., 1965. Identification d'esters des acides aminiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera* CR Acad Sci, Paris. 260-341.
- Rouse, A. H., & Atkins, C. D., 1955. Pectinesterase and pectin in comercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experimental station. Fla. Agric. Exp. Sta. Bull., 570: 1- 9.
- Rovere, P., Sandei., L., Colombi, A., Munari, M., Ghretti, G., Carpi, G., & Dall'Aglio, G., 1997. Effect of high-pressure treatment on chopped tomatoes. Industria Conserve, 72: 3-12.
- 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, p- 191-194 (Ed.) K. Heremans Leuven University Press, Leuven, Bélgica.
- 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.
- Sale, A. J. H., & Hamilton, W. A., 1967. Effect of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yests. Biochim. Biophys. Acta, 148: 781-788.
- Sale, A. J. H., & Hamilton, W. A., 1968. Effect of high electric fields on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. Biochim. Biophys. Acta, 163: 37-43.

- Sale, A. J. H., Gould, G. W., & Hamilton, W. A., 1970. Inactivation of bacterial spores by high hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.*, 60: 323- 334.
- Salvadó, J., Bladé, C. I., & Arola, L., 2001. Antioxidants del vi i salut. *Enologia avui. Resums de les ponències presentades a les Cinquenes Jornades en Viticultura i Enologia. Universitat Rovira i Virgili.*, 7-14.
- Sancho, F., Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., Bouvier, J. M., & Narbonne, J. F., 1999. Effect of ultrahigh hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins. *Journal of Engineering*, 39: 247-253.
- 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.
- Sapis, J. C., Macheix, J. J., & Cordonnier, R., 1982. Browning capacity and polyphenoloxidase activities in mature grapes. 33th Congrés of American Society of Oenologists. Los Angeles, USA.
- Schwimmer, S., 1981. Food color, the phenolases and undesirable enzymatic browning. En: *SourceBook of Food Enzymology*. AVI Publishing CO., West Port, Connecticut., 267- 283.
- Seyderhelm, I., Boguslovski, S., Michaelis, G., & Knorr, D., 1996. Pressure induced inactivation of selected food enzymes. *Journal of Food Science*, 61: 308- 310.
- Senter, S. D., Cox, N. A., Bailey, J. S., & Forbus, Jr., 1985. Microbiological changes in fresh market tomatoes during packing operations. *Journal of Food Science*, 50: 254-255.
- Skrede, G., 1985. Color quality blackcurrant syrups during storage evaluated by Hunter L, a, b values. *Journal of Food Science*, 38: 1060-1066.
- Silva, J. L., Luan, P., Glaser, M., Voss, E. W., & Weber, G., 1992. Effects of hydrostatic pressure on a membrane -enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *Journal of Virology*, 66: 2111-2117.
- Sims, C. A., Bates, R. P., & Mortensen, J. A., 1991. Effects of must polyphenoloxidase activity and timing of sulfite addition on the color and quality of *Vitis rotundifolia* and Euvitis hybrid white wines. *American Journal of Oenology and Viticulture*, 42: 128-132.
- Singleton, H. A., Sierhagen, P., & Van Wyk, C. J., 1975. Composition and Sensory qualities of wines prepared from white grapes by fermentation with and without grape solids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26: 62-69.
- Smelt, J. P. P. M., 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Science and Technology*. 9: 152-158.
- Smith, C. J. B., & Nortje, B. K., 1958. Observations on consistency of tomato paste. *Food Technology*, 12: 356- 358.
- Sudraud, P., 1958. Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges, *Ann. Technol. Agri.*, 7: 203-208.

- 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.
- Takahashi, Y., Ohta, H., & Ifuku, Y., 1993. Microbial effect of high pressure on *satsuma* mandarin juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 28: 95- 102.
- Taukis, P. S., Panagiotidis, P., Stoforos, N.G., Butz, P., Fister, H., & Tauscher. B., 1998. Kinetics of vitamin C degradation under high pressure-moderate temperature processing in model systems and fruit juices. *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, p-310-316. (Ed.) N.S. Isaacs. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Tauscher, B., 1995. Pasteurization of food by high hydrostatic pressure. *Chemical Aspects, Z. Lebensm Unters Forsch*, 200, 3-13.
- Tonello C., Largeteau A., Jolibert F., Deschamps A., & Demazeau G., 1992. En *High Pressure and Bitechology* . C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans and P. Masson (eds). John Libbey Eurotext, Montrouge, France.
- Tonello C., 1995. New fruit products development. Animal report of institut Français des Boissons de la Brasserie Malterie (I.F.B.M.), partner 12 of the AIR project n° AIRI-CT92-0296. 1-15. I.F.B.M., Vandoeuvre Cedex, France.
- Tonello C., Largeteau A., Demazeau G., & Lonvaud-Funel A., 1996. Les applications éventuelles des hautes pressions en enologie, *Revue Française d'Enologie*, 36: 13-16.
- Tongwongchai, R., Ledward, D. A., & Ames, J., M. 2000. Effect of high-pressure treatment on the texture of cherry tomato. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1434-1441.
- Tressler, D. K., & Joslyn, M. A., 1971. *Fruit and vegetable juice, Processing Technology II*, [Westport USA: AVIPublishing Company, Inc.].
- Trujillo, A. J., Ferragut, V., Gervilla, R., Capellas, M., & Guamis, B., 1997. High hydrostatic pressure effects on milk and milk products, *Recent Research Developments. Agriculture and Food Chemistry*, 1: 137-159.
- Trujillo, A., Royo, C., Guamis, B., & Ferragut, V., 1999. Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft*, 54: 197- 199.
- Usseglio Tomasset, L., 1998. *Química enológica*. (eds). Mundi-Press. Barcelona, España.
- Vercet, A., Sánchez, C., Burgos, J., Montañés, L., & López Buesa, P., 2002. The effect of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of food Engineering*, 53: 273-278.
- Versaud, A., Dulau, L., & Hallet J. N., 1993. Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des charentes et approche moléculaire de la diversité infra spécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *R.F. Oenologie*, 142, 20.
- Walsby, A. E., 1972. Gas filled structures providing buoyancy in photosynthetic organisms. Sleigh, M.A. and Macdonald, A.G., p- 233-239 (eds.). *The effects of pressure on living organisms*. Academic Press, New York.

- Watanabe, M., Makino, T., Kumeno, K., & Arai, S., 1991. High pressure sterilization of ice nucleation- active bacterial cells. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 291- 292.
- Weber, G., & Drickamer, H. G., 1983. The effect of high pressure up on proteins and other biomolecules. *Quarterly Reviewa of Biophysics*, 16: 89-112.
- Weemaes, C., Rubens, P., DeCordt, S., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Hendrickx, M., Heremans, K., & Tobback, P., 1997. Temperature sensitivity and pressure resistance of mushroom polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 62: 261-266.
- Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Hendrickx, M., 1998. High pressure inactivation of polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 63: 873-877.
- Whitaker, J.R. 1972. Polyphenol oxidase. *Principles of enzymology for the food Sciences*, p- 571-582 (ed.) O.R. Fennema. Marcel Dekker, New York.
- Wuytack, E., Soons, J., & Michiels, C., 1997. Rapid measurement of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores expressing green fluorescencet protein. *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, p- 261-264 (ed.) K. Heremans, Leuven University Press.
- Yoshika, K., Kage, Y., & Omura, H., 1992. Effects of high pressure on texture and ultrastructure of fish and chickenmuscles and their gels. *High Pressure and Biochemistry*. 325- 328 (eds.) C. Blany, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson. John libbey Eurtex, Montrouge.
- Yuste, J., M. Mor-Mur, M., Capellas, M., Guamis, B., & Reyes Pla, 1999. Mechanically recovered poultry meat sausages manufactured with high hydrostatic pressure. *Poultry Science*, 78: 914-921.