



Aplicación de la Ultra Alta Presión de Homogenización (UHPH) en la elaboración de licuados vegetales de almendra de alta calidad.

Directoras:

Victoria Ferragut Pérez
Manuela Hernández Herrero

Tesis Doctoral

DORA CECILIA VALENCIA FLORES
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2015

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Estudis de Doctorat de Ciència dels Aliments



VICTORIA FERRAGUT PÉREZ y MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO, profesoras titulares del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona.

HACEN CONSTAR: que DORA CECILIA VALENCIA FLORES, ha realizado, bajo su dirección, en el Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado “Aplicación de la Ultra Alta Presión de Homogenización (UHPH) en la elaboración de licuados vegetales del almendra de alta calidad” que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste firmamos el presente documento en:

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 8 de Junio del 2015.

Dra. Victoria Ferragut Pérez

Dra. Manuela Hernández Herrero

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras, Victoria Ferragut Pérez y Manuela Herrero Hernández, por ofrecerme la oportunidad de trabajar con ellas, porque siempre por más ocupadas que estuvieran tuvieron tiempo para atenderme, por su paciencia, por haber tenido confianza en mí, por su comprensión y porque trabajando con ellas aprendí muchísimo.

A Joan, Joan Miquel, Roger, Dolors, Tony, Sonia, Julia, Ramón, Arthur, Jordi y todos aquellos que siempre tuvieron tiempo para mí y me ayudaron en todo momento.

A mis amigos, Fabio, Rita, Jacira, Katy, Aisha, Diana, Angela, Nelly, Vanesa, Abel, Fabio Fontecha, Sonia Moises, Rodrigo, Genaro, Natalia y Susana, por su apoyo, no solo en lo académico, sino también moralmente y propiciando charlas, convivios y paseos muy agradables.

A mi amigo Marco, por siempre impulsarme a seguir adelante.

A mis compañeros y amigos del IT Morelia, Luz, Cele, Mary, Perita, Domingo, por su apoyo y confianza.

A mi familia, mi madre Cecilia Flores, y mis hermanos Alfonso, Marco, Luis Manuel y Mario por su apoyo incondicional en todos los aspectos.

Quiero dedicarle esta tesis a mi hijo Diego, quien es el motor que me impulsa a seguir adelante, es mi compañero en esta aventura y que su amor me ha dado fuerzas para cumplir con este objetivo.

In memoriam, un agradecimiento especial a mi padre, Alfonso Valencia Lua, quien siempre estuvo a mi lado para consolarme, animarme y apoyarme en todos mis triunfos y fracasos y sobre todo por el inmenso amor que me dio, y a Dora, mi tocaya, que tuve la gran dicha de conocerla y contar con su amistad, además, de brindarme sus consejos y compañía en momentos difíciles.

Gracias al IT Morelia, DGEST y PROMEP, por el apoyo económico y las facilidades brindadas.

Abstract

In the last years the almond beverage has experimented an increase on the consume, therefore, the commercialization area has been expanded, almost all around the world. This beverage further than be an alternative to milk for people with lactose intolerance, it is claimed because of its functional qualities that can contribute to reduce or prevent diseases, which are besetting society; this mainly due thanks to the content of the fatty acids, monounsaturated and polyunsaturated, and the antioxidants just like E vitamin, phenolic compounds and polyamines.

This thesis project was focused on the application of an emerging technology, Ultra High Pressure Homogenization (UHPH), in the production of almond beverage. This non-thermal technology consists of a high pressure machine capable of applying pressures of up to 400 MPa using a special homogenizing system designed to produce a conserving effect, improving the colloidal and microbial stability while maintaining good nutritional and sensory qualities. Considering this hypothesis, UHPH could be an alternative technology to those commonly applied in the food industries. For that, a comparative study of UHPH with thermal treatments (pasteurization) was carried out in this work.

This investigation has been conducted through four successive studies. The first study was aimed to optimize processing conditions of the elaboration of a base product of almond beverage for being used in subsequent studies. Moreover, influence of the addition of lecithin as an emulsifier in the stability of pasteurized beverage was studied and the most relevant analytical parameters related to the overall quality of the food were analyzed.

In the second study, the influence of the UHPH treatments (200 and 300 MPa, 55, 65 and 75 °C) were evaluated in the almond beverage characteristics, and they were compared with samples treated with convectional pasteurization, UHT and with based crude product. UHPH at 200 MPa 55 and 75 °C of inlet temperature were revealed as alternative treatments to pasteurization, and 300 MPa 65 y 75°C as alternative to UHT. The UHPH condition of 300 MPa and 65 and 75°C inlet temperature was able to produce commercial sterile almond beverages.

The third study was the identification of potentially contaminating spoilage microorganisms in treated almond beverage, to evaluate subsequently the lethality produced by UHPH treatments 300 MPa, 55, 65, 75 and 85 °C, in microorganisms with higher resistance to UHPH and most frequently isolated. These microorganisms were *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Lysinibacillus* spp. Lethality was complete when treatment was used 300 MPa and 75 and 85°C inlet temperatures.

The second part consisted in the shelf-life evaluation of soymilk treated by UHPH using the selected optimal conditions determined in the previous step

Finally, with the selected conditions of UHPH treatments (200 MPa, 55 and 75 °C), was studied the microbiological, physical and chemical quality of the almond beverage during cold storage time and it was compared with pasteurized almond beverage. Monitoring was conducted every 7 days for 3 weeks. During cold storage, almond beverage samples treated by UHPH at both inlet temperatures had generally better characteristics than pasteurized ones.

Resumen

La bebida de almendra ha experimentado en los últimos años un notable aumento en su consumo, y por tanto, se ha expandido el área de comercialización de este producto, en casi todo el mundo. Esta bebida, además de ser una alternativa a la leche (aunque no son comparables) para personas con intolerancia a los productos lácteos, se demanda por sus cualidades funcionales que pueden contribuir a reducir o prevenir enfermedades, que aquejan en la actualidad a la sociedad; esto debido principalmente al contenido de ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados, y a las fracciones con propiedades antioxidantes, como vitamina E, compuestos fenólicos, flavonoides y poliaminas.

El principal propósito de este estudio fue aplicar una tecnología emergente como la Ultra Alta Presión de Homogeneización (UHPH) y compararla con tecnologías que actualmente se utilizan en la industria para procesar este tipo de bebidas tales como los tratamientos térmicos (pasteurización y UHT). Dicha tecnología UHPH, utiliza homogeneizadores con un diseño específico capaces de soportar presiones hasta de 400 MPa, lo cual ayuda a producir alimentos de excelente calidad, ya que al aplicar tan elevadas presiones, se producen una serie de fenómenos que conllevan a la disminución en el tamaño de partículas, que conduce a la mejoría de factores como la estabilidad coloidal, la destrucción microbiana, etc. Por todo ello, la hipótesis de partida es que los tratamientos UHPH pueden constituir una alternativa mejorada a los tratamientos térmicos convencionales.

Esta investigación se realizó a través de cuatro estudios sucesivos. El primero, sirvió para optimizar las condiciones de elaboración de la bebida de almendra en planta piloto, ya que será el producto de partida para los posteriores estudios. Asimismo se estudió la influencia de la adición de lecitina como emulgente en la estabilidad de los licuados pasteurizados, evaluándose los análisis más relevantes relacionados con la calidad global del alimento.

En el segundo estudio se evaluó la influencia de las condiciones de tratamientos UHPH (200 y 300 MPa, 55, 65 y 75 °C) en las características de los licuados de almendra y se compararon con tratamientos convencionales de pasteurización y UHT y con el producto base crudo. Los tratamientos que se revelaron como alternativos de la pasteurización fueron 200 MPa, tanto a 55 como a 75 °C de temperatura de entrada. Mientras que 300 MPa a 65 y 75°C fueron los

alternativos a la UHT, en los que se pudo conseguir bebidas de almendra comercialmente estériles.

El tercer estudio consistió en la identificación de los microorganismos potencialmente alterantes en la bebida de almendra tratada por UHPH, para posteriormente evaluar la letalidad producida por los tratamientos de UHPH de 300 MPa, 55, 65, 75 y 85 °C en los microorganismos que fueron más frecuentes aislados y que habían mostrado previamente, cierta resistencia a este tipo de tratamientos, que fueron *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Lysinibacillus spp.* La letalidad fue completa cuando se utilizó el tratamiento de 300 MPa con 75 °C y 85 °C de temperatura de entrada.

Por último, con las condiciones seleccionadas de los tratamientos UHPH, alternativos a la pasteurización (200 MPa, 55 y 75 °C), se estudió la calidad microbiológica, física y química de la bebida de almendra durante el almacenamiento a 4°C y se comparó con la bebida de almendra pasteurizada. Se realizó un seguimiento, analizando los licuados almacenados en refrigeración cada 7 días durante tres semanas. Los resultados demostraron que durante el almacenamiento a 4°C las bebidas de almendra tratadas por UHPH a ambas temperaturas de entrada, tuvieron en general, mejores características que las pasteurizadas.

Tabla de Contenidos

CAPITULO I: <i>Revisión Bibliográfica</i>	1
1.1 Almendra	2
1.2 Composición de la almendra.....	2
1.3 Propiedades de la semilla de almendra	6
1.3.1 Propiedades funcionales de las proteínas	6
1.3.2 Propiedades nutritivas de las proteínas de la almendra	7
1.4 Características de los lípidos.....	8
1.4.1 Oxidación de lípidos.....	8
1.4.2 Oxidación de la almendra.....	9
1.4.3 Compuestos Volátiles.....	10
1.5 Propiedades antioxidantes.....	13
1.6 Bebida de almendra	14
1.7 Características de la Ultra-alta presión de homogeneización (UHPH).....	15
1.7.1 Funcionamiento general de los equipos UHPH.....	18
1.8 Equipos UHPH	20
1.8.1 Panda (Gea Niro Soavi).....	20
1.8.2 Microfluidizer (Microfluidics International Corporation).....	20
1.8.3 Nanojet (Haskel).....	21
1.8.4 Emulsiflex (Avestin)	21
1.8.5 Stansted (Stansted Fluid Power Ltd)	21
1.9 Efectos de la UHPH.....	23
1.9.1 Efecto de la UHPH sobre los microorganismos	23
1.9.2 Efectos de la UHPH en enzimas de interés	26
1.9.3 Efecto de la UHPH en la estabilidad de las emulsiones	27
1.9.4 Efecto de las proteínas en los tratamientos UHPH y en la estabilidad de las emulsiones	29
1.9.5 Investigación de la aplicación de la UHPH en diferentes alimentos.....	30
CAPITULO II: <i>Antecedentes, objetivos y plan de trabajo</i>	41
2.1 Objetivos.....	43
2.1.1 Objetivos específicos.....	43
2.1.2 Plan de trabajo	44

CAPITULO III: <i>Materiales y Métodos</i>	50
3.1 Elaboración de la bebida de almendra	51
3.1.1 Tratamientos de la bebida de almendra: UHPH, Pasteurización y UHT.....	51
3.1.2 Almacenamiento y conservación de los licuados en todos los estudios o etapas	52
3.2 Composición química de la almendra y la bebida de almendra.....	53
3.3 Análisis microbiológicos	53
3.3.1 Calidad microbiológica	53
3.3.2 Aislamiento, identificación y selección de esporas UHPH resistentes	54
3.3.3 Condiciones de esporulación	55
3.3.4 Inoculación y recuperación de las esporas	55
3.4 Análisis de tamaño de Partículas	56
3.5 Sedimentación de partículas sólidas por centrifugación.....	56
3.6 Evaluación del color	56
3.7 Hidrofobicidad de las proteínas	57
3.8 Evaluación de la oxidación lipídica	58
3.8.1 Determinación de la actividad lipooxigenasa (LOX).....	58
3.8.2 Determinación del índice de hidroperóxidos.....	58
3.8.3 Determinación del índice TBARS.....	59
3.8.4 Análisis del perfil de compuestos volátiles	60
3.9 Análisis estadístico.....	61
CAPITULO IV: <i>Resultados y Discusión</i>	62
4.1 Optimización de la elaboración de un licuado de almendra	63
4.1.1 Composición química.....	63
4.1.2 Análisis microbiológicos	64
4.1.3 Estabilidad física.....	65
4.1.4 Evaluación de la oxidación lipídica.....	67
4.2 Estudio de las condiciones de tratamiento UHPH en las características de licuados de almendra	69
4.2.1 Composición química de la almendra y del licuado.....	69
4.2.2 Efecto de los diferentes tratamientos sobre los microorganismos.....	70
4.2.3 Efecto de la UHPH en la estabilidad física de las bebidas de almendra	73
4.2.4 Hidrofobicidad.....	80

4.2.5	Oxidación lipídica	83
4.2.6	Efecto de los tratamientos aplicados sobre los compuestos volátiles.....	85
4.3	Eficacia de los tratamientos UHPH en la letalidad de microbiota potencialmente alterante de la bebida de almendra	102
4.4	Estudio de la calidad de licuados de almendra durante el almacenamiento	110
4.4.1	Calidad microbiológica y evaluación del pH	110
4.4.2	Estabilidad física durante el almacenamiento de las bebidas de almendra	113
CAPÍTULO V: Conclusiones		124
CAPÍTULO VI: Referencias		127

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
APA	Aislado de proteína de almendra
APS	Aislado de proteína de almendra
PDCAAS	Digestibilidad proteínica corregida por la relación de aminoácidos
PER	Relación eficiente de proteína
LOX	Lipooxigenasas
ND	No detectados
U.D.L	Debajo de la detección límite
UHPH	Ultra alta presión de homogeneización
µm	Micrometros
MPa	Megapascales
L	Litros
h	Horas
m	metros
s	segundos
HP	Alta presión
HPH	Alta presión de homogeneización
T₀	Temperatura de entrada
T₁	Temperatura después de la válvula HP
T₂	Temperatura de salida
UHT	Ultra alta temperatura
PBCL	Producto base con lecitina
PBSL	Producto base sin lecitina
PACL	Bebida de almendra pasteurizada con lecitina
PASL	Bebida de almendra pasteurizada sin lecitina
TBA	Ácido tiobarbiturico
PB	Producto base
ufc	Unidades formadoras de colonias

mL	mililitros
MDA	malonaldehido
PA	Pasteurización
MYA	Agar de extracto de levadura-carne
PCA	Plate count agar
p/p	Relación peso peso
mm	milímetros
MSA	Manitol sal/agar
TGB	Caldo de glucosa triptona
g	Gramos
GYA	Agar de levadura glucosa
ASE	Aceleración de extracción del solvente
nm	nanómetros
D_{3,2}	superficie del diámetro medio ponderado
D_{4,3}	Diámetro medio ponderado del volumen
ΔE	diferencia de color entre cada tratamiento UHPH y PB de bebida de almendra
TEM	microscopía electrónica de transmisión
M	Molar
HOT	Tetróxido de osmio
HCl	Ácido clorhídrico
DDSA	Docecil anhídrido succinico
DBP	dibutil ftalato
BDMA	plastificador benzildimetilamina
ANS	8-anilino-1-naftaleno de ácido sulfónico
DVB/CAR/PDMS	Divinylbenzene/Carboxen™/Polydimethylsiloxane
cm	centímetros
ACP	Análisis de componentes principales
SE PT	<i>Salmonella enteritidis</i> tipo fago
U/L	Unidades por litro

Kg	Kilogramo
TBARS	Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
AM	Bebida de almendra sin lecitina
AML	Bebida de almendra con lecitina
CP1	Primer componente principal
CP2	Segundo componente principal
T1	UHPH (200 MPa, 55 °C)
T2	UHPH (200 MPa, 75 °C)
ID	identificación
MS	Espectro de la masa
RI	Índice de retención comparado con base de datos
KI	Índice de Kovats
L*	Luminosidad
a*	Valores: negativo, verde; positivo, rojo
b*	Valores: negativo, amarillo; positivo, azul
C*	la pureza de color, o saturación
h*	tono
ΔE_{PA}	diferencia de color cuando se tomo como referencia a la leche tratada por pasteurización
meq	Miliequivalentes

Índice de tablas

Tabla 1.1	Composición química de la semilla de almendra determinados por diferentes investigadores.	3
Tabla 1.2	Aminoácidos en la almendra expresadas en miligramos por 100 g de almendras	4
Tabla 1.3	Valor promedio \pm desviación estándar de ácidos grasos en la semilla de almendra determinado por diferentes investigadores	
Tabla 1.4	Contenido en minerales en la semilla de almendra determinado por diferentes investigadores	6
Tabla 1.5	Compuestos volátiles promedio de almendra cruda determinada por diferentes investigadores	12
Tabla 1.6	Contenido de compuestos fenólicos en extracto crudo de almendra	13
Tabla 1.7	Investigaciones realizadas con equipos de ultra alta presión de homogeneización en alimentos	45
Tabla 2.1	Tratamientos UHPH de bebida de almendra, utilizados en el estudio 2	61
Tabla 4.1	Valores medios (% p/p \pm DE) de la composición química de licuados de almendra	63
Tabla 4.2	Recuentos microbianos (log ufc/mL) de las bebidas de almendra	65
Tabla 4.3	Valores medios de los sólidos sedimentados (% p/p \pm DE) de las bebidas de almendra	66
Tabla 4.4	Valores promedio de los parámetros de oxidación de la bebida de almendra	68
Tabla 4.5	Registros de las temperaturas de las bebidas de almendra durante el procesamiento UHPH.	71
Tabla 4.6	Población microbiana (log ufc/mL \pm desviación estándar) de producto base y bebidas de almendras después de aplicar los tratamientos	72
Tabla 4.7	Valores medios \pm desviación estándar de tamaño de partículas (μ m) y sedimentación de sólidos (% p/p) por centrifugación después de un día de tratamiento de las bebidas de almendra sin lecitina (AM).	75
Tabla 4.8	Valores medios \pm desviación estándar del tamaño de partículas (μ m) y sedimentación de sólidos (% p/p) de bebida de almendra con lecitina (AML) después de la centrifugación a un día del tratamiento.	78

Tabla 4.9	Valores medios ($\times 10^{-4}$) \pm desviación estándar de índice de peróxidos (meq/mL) de bebida de almendra sin lecitina (AM) y con lecitina (AML), un día después del tratamiento.	84
Tabla 4.10	Abundancia de compuestos ¹ volátiles por familias químicas en bebidas de almendra tratada.	87
Tabla 4.11	Abundancia ² de aldehídos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra.	91
Tabla 4.12	Abundancia ² de alcoholes detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra	93
Tabla 4.13	Abundancia ² de compuestos aromáticos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra	94
Tabla 4.14	Abundancia ² de cetonas detectadas en la fracción de volátiles de la bebida de almendra	96
Tabla 4.15	Abundancia ² de piridinas, pirrolidinas y piperidinas detectadas en la fracción de volátiles de la bebida de almendra	97
Tabla 4.16	Abundancia ² de alcanos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra	98
Tabla 4.17	Abundancia ² de ácidos carboxílicos, terpenos, esterres, furanos y otros compuestos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra	100
Tabla 4.18	Control de la temperatura y de la presión durante el procesado UHPH de la bebida de almendras.	104
Tabla 4.19	Letalidad calculada (log ufc/mL) en <i>B. subtilis</i> y <i>B. cereus</i> en función de la temperatura alcanzada tras la válvula de homogeneización (Tv) en los tratamientos UHPH a 300 MPa, a 55, 65, 75 y 85 °C.	109
Tabla 4.20	Evolución del recuento de bacterias aerobias mesófilas, esporas aerobias mesófilas y and <i>B. cereuss</i> (log cfu/mL) en el product base (BP), pasteurizado (PA) and UHPH (200 MPa, 55 y 75 °C) en bebidas de almendras conservadas a 4 °C durante 21 d.	112
Tabla 4.21	pH de bebidas de almendra almacenadas a 4 °C, por un periodo de 28 días.	113
Tabla 4.22	Efecto del tratamiento sobre los parámetros CIE-L* a* b*, en la bebida de almendra (promedio \pm desviación estándar).	117
Tabla 4.23	Compuestos volátiles de mayor abundancia en la bebida de almendra.	119
Tabla 4.24	Evolución de compuestos volátiles detectados en la bebida de almendra PA y tratada durante el almacenamiento.	111

Índice de Figuras

Figura 1.1	Diseño de válvula del homogeneizador convencional APV-Gaudin.	17
Figura 1.2	Válvulas de ultra alta presión de homogeneización con asiento de diamante y aguja de cerámica	19
Figura 1.3	(a) Representación esquemática de homogeneizador de alta presión con dobles intensificadores. T_{in} , la temperatura inicial del fluido en el tanque de alimentación; T1/P1, sondas de temperatura y de presión situado en la entrada de la válvula HP; T2/P2, sondas de temperatura y de presión situado en la salida de la válvula HP; T3 y T4, las sondas de temperatura después de la primero y segundo de los dispositivos de refrigeración. (b) Representación esquemática de un marcado ángulo de la válvula de HP-Stansted (c) Representación esquemática de la válvula-HP en forma de Y.	19
Figura 1.4	Vista esquemática de la nano válvula (GEA Niro Soavi North America).	20
Figura 1.5	Vista esquemática del sistema de homogeneización de los equipos de Microfluidics International Corporation.	21
Figura 1.6	Vista esquemática de la válvula Stansted de alta presión de homogenización (Floury et al., 2004).	22
Figura 2.1	Plan de trabajo Estudio 1: establecimiento y optimización del proceso de elaboración de la bebida de almendra. Estudio preliminar del efecto de la pasteurización.	46
Figura 2.2	Plan de trabajo Estudio 2: prospección de diferentes condiciones de tratamiento UHPH con el objetivo de realizar una comparativa con los tratamientos térmicos convencionales.	47
Figura 2.3	Plan de trabajo Estudio 3: Aislamiento e identificación de esporas potencialmente alterante de la bebida de almendras y evaluación de la eficacia de la UHPH en su letalidad.	48
Figura 2.4	Plan de trabajo Estudio 4: valoración de los tratamientos UHPH seleccionados para producir un licuado o bebida de almendras de almacenamiento en refrigeración	49

Figura 4.1	Curvas de distribución de tamaño de partículas en las bebidas de almendra sin lecitina (PB, producto base; A, Pasteurización; UHT, ultra alta temperatura)	74
Figura 4.2	Curvas de distribución de tamaño de la bebida de almendra con lecitina (PB, producto base; PA, Pasteurización; UHT, ultra alta temperatura).	77
Figura 4.3	Hidrofobicidad de las proteínas de las bebidas de almendra. a) Bebida de almendra sin lecitina (AM) y b) Bebida de almendra con lecitina (AML). (PB, producto base; PA, Pasteurización; UHT, ultra alta temperatura).	82
Figura 4.4	Letalidad de los tratamientos UHPH a 30 MPa, 55, 65, 75 y 85 °C sobre esporas de <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>Lysinibacillus</i> spp.	105
Figura 4.5	Peso de sólidos sedimentados (% p/p) de las bebidas de almendra.	115
Figura 4.6	Evolución del hexanal, durante el periodo de almacenamiento, en diferentes tratamientos aplicados.	121

CAPITULO I: Revisión Bibliográfica

1.1 Almendra

El árbol de la almendra pertenece a la familia de las rosáceas, y dentro del género *Prunus* se incluye el subgénero *amygdalus* (Agunbiade y Olanlokun, 2006), que se subdivide en dos variantes, una es el *Prunus amygdalus* variedad *dulcis* y la otra *Prunus amygdalus* variedad *amara*. Ésta última, es la que contiene un glucósido tóxico, la amigdalina, que rápidamente se descompone en ácido prúsico, por lo cual generalmente su uso está prohibido como alimento humano.

El árbol de la almendra es originario de la parte cálida del occidente de Asia y del norte de África, pero actualmente su distribución alcanza la región templada de Europa, siendo principalmente cultivado en áreas de clima mediterráneo (Agunbiade y Olanlokun, 2006), aunque a nivel mundial el principal país productor de almendras es Estado Unidos de América (Shate y Sze, 1997). Este árbol, es de pequeño tamaño, y al igual que muchos otros árboles frutales de la familia *Rosaceaus*, a menudo son auto-estériles, por lo que requieren polinización cruzada para su fertilidad y producción del fruto. La calidad de la semilla de almendra, de alto valor nutritivo, hasta ahora ha sido definida exclusivamente por los parámetros físicos: tamaño, forma, semillas dobles, etc. Sin embargo, sus diferentes usos pueden requerir semillas con una composición específica, en función de cada producto (Kodad y Socias, 2008). Las almendras dulces tienen un sabor suave y forman una emulsión blanca cuando se trituran con agua y se caracteriza por ser inodora (Agunbiade y Olanlokun, 2006).

1.2 Composición de la almendra

La almendra disfruta de una amplia aceptación en el mundo y se utiliza como aperitivo o como ingrediente en otros productos alimenticios. Además el interés por conocer mejor sus propiedades y atributos ha potenciado que se realice una mayor investigación. Químicamente se caracteriza por contener principalmente lípidos y proteínas, siendo, además una buena fuente de fibra, minerales, ciertas vitaminas y glúcidos. En la Tabla 1.1, se puede observar la composición química de diferentes variedades de almendras, en la que se puede apreciar que hay divergencias en la composición determinada por diferentes investigadores, que pueden ser debidas a las distintas condiciones de cultivo, a las diferencias bioquímicas de cada tipo de variedad, a la variación genética, a las condiciones ecológicas y a los diferentes grados de

maduración durante la cosecha (Calixto *et al.*, 1981; Barbera *et al.*, 1994; Schirra *et al.*, 1994; Buransompov *et al.*, 2003; Ahrens *et al.*, 2005). En relación al contenido en glúcidos, aunque la mayoría de los investigadores determinaron glúcidos totales, Calixto *et al.* (1981), determinaron que la sacarosa, era el azúcar mayoritario.

Tabla 1.1 Composición química de la semilla de almendra determinados por diferentes investigadores.

Composición química (%)	Calixto <i>et al.</i> (1981)	Barbera <i>et al.</i> (1994)	Buransompov <i>et al.</i> (2003)	Ahrens <i>et al.</i> (2005)
Agua	6.93	5.93-7.27	4.4	3.05–4.33
Glúcidos	5.52	4.15-5.29	20	5.35–7.45
Proteína	20.51	23.03-23.98	20	20.68–23.30
Lípidos	53.38	53.67-54-26	52	43.37–47.50
Cenizas	3.05	8.03-8.13	5	3.74–4.56

Las proteínas son el segundo componente mayoritario de la almendra. Además de su importancia por su valor nutricional, también lo tienen por su carácter alergénico, motivo por el cual se han realizado numerosas investigaciones (Esteban *et al.*, 1985; Sathe, 1993; Wolf y Sathe, 1998; Tiwari-Ras *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012). La proteína principalmente relacionada con los procesos alérgicos, es la amandina, una proteína globular que constituye el 60-70% del total de proteína (Wolf y Sathe, 1998; Acosta *et al.*, 1999), que es la principal proteína de reserva de la almendra y que se utiliza para detectar trazas de almendra en otros productos alimenticios (Shate *et al.*, 2002). Sin embargo, no es la única con actividad alergénica, pues se han caracterizado genéticamente ocho proteínas diferentes en la semilla de almendra que pueden ocasionar reacciones alérgicas en individuos susceptibles, como la Pru du 1 (homólogos de la Bet V 1), Pru du 2 (TLP, similares a taumatina), Pru du 2S (albúmina 2S, proteína de reserva), Pru du 3 (nsLTP, proteínas del transporte lipídico), Pru du 4 (profilinas), Pru du 5 (r60sRP, proteínas ribosomales), Pru du 6 (amandina) y Pru du γ -conglutinasas, (Costa *et al.*, 2012).

Las proteínas de la semilla de almendra contienen un 29 % de aminoácidos esenciales, aunque tienen cierta limitación en aminoácidos azufrados como la metionina y cisteína. En su

composición aminoácida predominan los aminoácidos acidificados como el ácido aspártico y glutámico (Wolf y Sathe, 1998). En la Tabla 1.2 se muestra la composición en aminoácidos de la semilla de almendra.

Tabla 1.1. Aminoácidos en la almendra expresadas en miligramos por 100 g de almendras (Calixto *et al.*, 1981)

Aminoácidos esenciales	mg/100 g	Aminoácidos no esenciales	mg/100 g
Isoleucina	671	Arginina	2095
Leucina	1137	Histidina	483
Lisina	653	Alanina	689
Metionina	272	Ácido aspártico	1695
Cistina	452	Ácido glutámico	4232
Fenilalanina	819	Glicina	938
Tirosina	713	Prolina	715
Treonina	467	Serina	758
Valina	691		

El componente mayoritario de las almendras son los lípidos que constituyen una importante fuente de calorías (Shate y Sze, 1997; Kodad y Socias, 2008), pero que no contribuyen al incremento de colesterol en los seres humanos, debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados, principalmente, ácidos grasos monoinsaturados y en concreto ácido oleico (Tabla 1.3).

Tabla 1.2. Valor promedio \pm desviación estándar de ácidos grasos en la semilla de almendra determinado por diferentes investigadores. Los resultados se expresan en % en relación al total de ácidos grasos.

Ácido graso	Zacheo <i>et al.</i> (1998)	Mexis <i>et al.</i> (2009)
Ácido palmítico (C16:0)	5.40 \pm 0.22	8.42 \pm 0.01
Ácido heptadecanoico (C17:0)	-	0.09 \pm 0.01
Ácido esteárico (C18:0)	2.83 \pm 0.05	3.2 \pm 0.08
Ácido araquidónico (C20:0)	-	0.12 \pm 0.02
Ácido palmitoleico (C16:1)	0.60 \pm 0.03	0.59 \pm 0.11
Ácido oleico (C18:1)	70.80 \pm 1.15	69.10 \pm 2.21
Ácido linoleico (C18:2)	20.20 \pm 0.42	18.46 \pm 0.34
Ácido linolénico (C18:3)	0.22 \pm 0.02	-

En la Tabla 1.4 se muestra la composición en minerales de la semilla de almendras, observándose también ciertas divergencias entre los investigadores (Calixto *et al.*, 1981; Barbera *et al.*, 1994 y Schirra *et al.*, 1994). Los minerales predominantes, según Calixto *et al.* (1981) fueron el potasio, fosforo, magnesio y calcio, que constituyeron el 50,56 % del total del contenido en cenizas (3050 mg/100 g), mientras que otros elementos esenciales como el hierro, manganeso, molibdeno cobre y zinc sólo sumaron 8,9 mg/100 g. Si bien la almendra, contiene calcio, se ha demostrado que no es asimilable en su totalidad porque precipita parcialmente como oxalato en las vacuolas del fruto (Souty *et al.*, 1971).

Tabla 1.3. Contenido en minerales en la semilla de almendra determinado por diferentes investigadores.

Minerales (mg/100 g)	Calixto <i>et al.</i> (1981)	Barbera <i>et al.</i>(1994)	Schirra <i>et al.</i>, (1994)
K	766	1546-1685	1050
P	364	253-259	300
Mg	227	447-494	300
Ca	185	640-678	467
Cu	-	2.43-2.58	0.5
Zn	-	7.63-8.05	3.4
Fe	-	5.48-6.53	7.0
Mb	-	3.77-3.78	-

1.3 Propiedades de la semilla de almendra

Las proteínas y los lípidos que representan la mayor parte de la materia seca en las almendras, contribuyen en la textura y funcionalidad del fruto y de los alimentos derivados.

1.3.1 Propiedades funcionales de las proteínas

Los tratamientos tecnológicos como el térmico produce la desnaturalización de la proteína de la almendra que contribuye de forma deseable en la textura de la semilla, especialmente en el carácter crujiente y en los atributos de masticabilidad (Shate y Sze, 1997). Sin embargo, es importante determinar el efecto de la temperatura en las proteínas, para lo cual los autores anteriormente mencionados, prepararon un extracto de proteína de almendra a partir de harina de almendra desgrasada, que denominaron “almond protein isolate” (API), a partir del cual realizaron una solución al 4% en agua observando que en esta solución de API la formación de agregados de proteína era directamente proporcional a la temperatura y el tiempo de exposición, que se asociaban a un proceso rápido de desnaturalización y que afectó a las propiedades de gelificación.

Entre las proteínas de la almendra, se encuentran en mayor proporción las que son solubles en agua (> 95%), como la proteína oligomérica presente en gran cantidad, que presentó características de sedimentación, de rápida formación de agregados a 100 °C y de gelificación a 90 °C similares a la proteína 11S de la soja. Además, determinaron que un método para disminuir la agregación fue añadir NaCl, ya que, actúa alterando la atracción iónica entre las moléculas de proteína, rompiendo los enlaces de hidrógeno, e indirectamente promueven la interacción hidrofóbica.

En otro estudio realizado por Tao y Shate, (1999) con el extracto de proteína de almendra (API), en el que evaluaron otras propiedades funcionales de estas proteínas determinaron que la absorción de aceite era más elevada en el extracto de almendra (API) que el de soja (SPI), que se asoció con la presencia de grupos hidrofóbicos en la superficie de la proteína de almendra. En relación a otras propiedades, estos autores observaron que generalmente la viscosidad, estabilidad espumante, actividad emulsificante (EAI) y estabilidad de la emulsión era mejor en el extracto de soja (SPI). Sin embargo, en medio ligeramente ácido (5-6,46) la estabilidad espumante fue mejor en el extracto de almendra (API). Además, determinaron que con una reducida concentración de proteína, la adsorción de la proteína a la interface aceite-agua permite una difusión controlada. Mientras que a elevadas concentraciones, la barrera de energía de activación dificultó la migración de las proteínas, lo cual explicaría parcialmente porqué la actividad emulsificante disminuyó al incrementar la concentración de la proteína. Finalmente, evaluaron la digestibilidad *in vitro* del API utilizando pepsina a diferentes concentraciones y con un tiempo de digestión de 0 a 60 minutos, concluyendo tras la evaluación del grado de hidrólisis de los polipéptidos con un peso molecular aproximado de 38-42 KDa y 20-22 KDa, que los extractos de almendra (API) son fácilmente digestibles.

1.3.2 Propiedades nutritivas de las proteínas de la almendra

Calixto *et al.*, (1981) determinaron la composición de aminoácidos de la proteína de almendra de cinco variedades españolas (Tabla 1.2), concluyendo que la proteína de la almendra era de buena calidad nutricional, sin embargo, no tuvieron en consideración otros aspectos como su digestibilidad. En este sentido, Ahrens *et al.* (2005), evaluaron la digestibilidad de la proteína de almendra pura de las variedades carmel, misión y nonpareil, que fue de $88,55 \pm 1,26$;

92,25±1,05; y 82,62±1,47, respectivamente. Sin embargo, al evaluar la digestibilidad proteica corregida por la relación de aminoácidos (PDCAAS, *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score* por sus siglas en inglés), concluyeron que las proteínas de almendra tenían una pobre calidad nutricional. De igual forma, y evaluando otros índices de calidad nutricional, Cowan *et al.* (1963), reportaron que si bien las almendras dulces contenían 19.4% de proteína, la relación corregida de la eficiencia proteica (PER, *protein efficient relation*, por sus siglas en inglés) era de sólo 0.32 al ajustarla con el control de caseína (PER=2.5), siendo la metionina el primer aminoácido limitante seguido por la lisina y la treonina, coincidiendo en este punto con las investigaciones realizadas por otros autores (Calixto *et al.*, 1981; Sathe *et al.*, 1993; Ahrens *et al.*, 2005).

1.4 Características de los lípidos

1.4.1 Oxidación de lípidos

El componente mayoritario de la semilla de almendra son los lípidos. Estos lípidos contienen cantidades substanciales de triacilglicéridos, y ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, los cuales son susceptibles a la rancidez oxidativa e hidrolítica (Shate y Sze, 1997; Buransompob *et al.*, 2003; Watkins 2005) que depende de la concentración de ácidos grasos insaturados y la presencia de sustancias pro o antioxidantes, tales como tocoferol, enzimas y trazas de metales. En estas reacciones, la degradación subsecuente de los ácidos grasos en peróxidos conduce a la producción de compuestos de sabores desagradables. La formación de hidroperóxidos es un paso importante en la oxidación lipídica y puede ser catalizada por lipooxigenasa (LOX) o por simple autooxidación. En el caso de las lipooxigenasas son numerosos y diferentes los grupos de isoenzimas lipooxigenasas de las diferentes especies de plantas o vegetales. Estas LOX parecen tener un rol importante en el metabolismo lipídico durante la germinación de la semilla (Feussner *et al.* 1995; Holtman *et al.* 1996), particularmente en leguminosas, como guisantes, habas y en cacahuates (Whitaker, 1991).

Las LOX son enzimas dioxigenasas que contienen proteína no hémica y catalizan la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados que contienen unidades *cis,cis*-1,4-pentadieno ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) con oxígeno para producir hidroperóxidos de ácidos grasos

poliinsaturados conjugados (Robinson *et al.* 1995). El ácido linoleico y linolénico son los substratos más comunes de las LOXs de los vegetales, pues son los principales constituyentes de su membrana fosfolipídica, siendo habitual que el ácido linoleico, linolénico y araquidónico, contengan una o más unidades de *cis,cis* penta-1,4-dieno. Los productos derivados de la hidroxidación de la actividad LOX son rápidamente convertidos a un número de compuestos implicados en defensa de los vegetales como, la senescencia, la germinación de semilla, el crecimiento del vegetal y en su desarrollo. Estos hidroperóxidos de los ácidos grasos poliinsaturados se pueden convertir en aldehídos volátiles, alcoholes, y cetonas por medio de otras enzimas de la ruta de la lipooxigenasa (Siedow, 1991). La frecuencia y el modo de acción de la LOX ha sido estudiada por diversos autores (Gardner, 1991; O’Conner & O’Brien, 1991; Whitaker, 1991).

1.4.2 Oxidación de la almendra

La tendencia de la almendra al enranciamiento durante el almacenamiento y el transporte conduce a una pérdida de calidad (Kodad y Socias, 2008). Por tal motivo, la estabilidad del aceite y la composición de los ácidos grasos, esencialmente la proporción de ácido oleico y ácido linoleico, se consideran un criterio importante para evaluar la calidad de la semilla de almendra (Shate y Sze, 1997; Kodad y Socias, 2008;). Sin embargo, Kosári *et al.* (2004), determinaron que la tendencia al enranciamiento de las almendras crudas o sin procesar es reducida, y que su procesado basado en su molienda para ser utilizadas en la elaboración de mazapán incrementó significativamente su oxidación, debido a que se produjo una intensa interacción superficial entre los lípidos de la almendra molida y el oxígeno.

Un sistema para reducir la oxidación es tratar térmicamente las semillas a temperaturas de 55 o 60 °C, por 2 o 10 minutos, lo cual disminuye los valores de peróxidos y de malonaldehído, manteniendo el índice de peróxidos dentro de los límites de calidad aceptables según los estándares reconocidos de calidad de Paramount Farms (Bakersfield, CA), que es de menos de 2,0 meq de peróxidos por kilogramo de almendra y de 25 meq de peróxidos por kilogramo de aceite de almendra (Buransompob *et al.*, 2003). Estos tratamientos térmicos suaves (55 °C, 2 min) producen una reducción considerable de la actividad LOX, lo que retarda el desarrollo de la rancidez oxidativa, y, por lo tanto, prolonga la vida de anaquel de las almendras durante su

distribución y almacenamiento (Buransompob *et al.*, 2007). La termosensibilidad de la LOX, también ha sido demostrada en frijoles pintos en los que la aplicación de tratamientos de 100 °C por 15 s redujeron su actividad un 100 %, y a 65 °C por 10 min un 93% (McCurdy *et al.*, 1983).

1.4.3 Compuestos Volátiles

La oxidación lipídica es la causa principal del desarrollo de mal sabor y olor de las almendras, debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados y la presencia de riboflavina, que actúa como un fotosensibilizador en la foto-oxidación (Mexis *et al.*, 2009). Los compuestos volátiles que se forman, son esenciales para el sabor de los alimentos en general, pero se convierten en indeseables, si las concentraciones exceden ciertos límites, por lo cual, la determinación de los volátiles es importante.

Beltran *et al.* (2011), al evaluar la oxidación del aceite de almendra por medio de la determinación de compuestos volátiles, determinaron 22 compuestos volátiles: hexanal, (E)-2-hexenal, 5-metil-2-hexanona, heptanal, (E)-2-heptenal, 1-octeno-3-ol, 2-pentilfurano, octanal, ácido hexanoico, (E)-2-octenal, ácido hexanoico anhídrido, nonanal, 3-noneno-2-ona, (E)-2-nonenal, 4-Eetilciclohexanol, (E,E)-2,4-nonadienal, (E)-2-decenal, (E,E)-2,4-decadienal, ciclododecanona, (E)-2-undecenal, 1-ciclooctiletanol, d-ecalactona. Entre ellos cabe destacar, 7 compuestos de la familia de los aldehídos que se relacionan con la rancidez del aceite de almendra: hexanal, 2-heptanal, 2-octanal, nonanal, 2-nonenal, 2,4-nonadienal y 2,4-decadienal. Los principales volátiles derivados de la oxidación secundaria son el 2-heptanal y 2-octanal que derivan de la descomposición del ácido linolénico, y el 2,4-decadienal y 2-nonenal que derivan del ácido oleico (Mexis *et al.*, 2009; Beltran *et al.*, 2011), siendo el 2,4-decadienal el que se relaciona con el aroma característico de las almendras oxidadas. El compuesto volátil mayoritario en la almendra es el benzaldehído, el cual deriva de la oxidación de todos los aldehídos (Mexis 2009 y 2010; Beltran *et al.*, 2011).

En otro estudio, realizado en almendra y en el que se evaluó el efecto de la irradiación (Mexis *et al.*, 2009), se observó que los principales compuestos volátiles identificados en la almendra no irradiada pertenecían a la clase química de aldehídos, cetonas, alquenos, alcoholes e hidrocarburos cíclicos (Tabla 1.5), pero que al irradiarse incrementaron notablemente la

concentración de estos compuestos volátiles como resultado de la oxidación de lípidos. Entre los compuestos volátiles que se formaron por efecto de la irradiación cabe destacar el acetaldehído, 2-butanona, 1-hexanol, ciclodecano, ácido acético, nonanal y el decanal. Los compuestos tales como, acetaldehído, el 1-pentanol y las cetonas se derivan de la oxidación del ácido linoleico, mientras que el ácido acético, a su vez, es un producto secundario de la oxidación del ácido oleico. Entre los aldehídos que se incrementaron de forma significativa durante el proceso de irradiación destacó el hexanal, que deriva de la oxidación del ácido linoleico (Mexis *et al.*, 2009), aunque Beck *et al.* (2011) sugieren que también puede derivar de la oxidación térmica de los linoleatos. Este compuesto volátil (hexanal) se relaciona directamente con el desarrollo de sabores desagradables de oxidación y se considera un indicador de la calidad del aceite de almendra (Mexis *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2011). Otros compuestos, como ciertos alcanos (pentano, hexano y 2,2-dimetil-butano) desaparecieron por el efecto de la irradiación, mientras que los alcoholes como el hexanol, benceno-metanol y etanol-benceno incrementaron su concentración tras la irradiación debido a reacciones secundarias de la oxidación lipídica (Mexis *et al.*, 2009).

Otros compuestos volátiles determinados en la almendra, en este caso contaminada con *Aspergillus*, han sido el grupo de las (γ -lactonas) (Tabla 1.5) que son comunes en vinos, en plantas de orquídeas y también se han encontrado en grandes cantidades en granos de café tostado (Beck *et al.*, 2011). Entre ellas cabe destacar la γ -butirolactona, un derivado del ácido oleico, que se cree que se formó debido al estrés de la semilla de almendra a los procesos de oxidación, calentamiento y la presencia de microorganismos. En esta misma investigación, también se identificaron sustancia terpenoides y otros compuestos aromáticos posiblemente asociada a una mejora en las técnicas usadas para la determinación de volátiles.

Tabla 1.4 Compuestos volátiles promedio de almendra cruda determinada por diferentes investigadores

Compuestos volátiles	Mexis <i>et al.</i>, (2009) (mg/kg)	Mexis <i>et al.</i>, (2010) (mg/kg)	Beck <i>et al.</i>, (2011) (Área integrada)
acetona	52.8±0.9	UDL	ND
2-propanona	UDL	6.10±1.16	ND
2-heptanona	ND	ND	1178
2-octanona	ND	ND	1282
2-decanona	ND	ND	1491
3-octen-2-ona	ND	ND	1404
butirolactona	ND	ND	1618
γ-hexanolactona	ND	ND	1692
γ-octanolactona	ND	ND	1907
γ-nonanolactona	ND	ND	2022
2,2-dimetil-butano	20.0±3.6	U.D.L	ND
pentano	535.4±7.5	U.D.L	ND
hexano	57.4±0.8	U.D.L	ND
dodecano	ND	ND	1198
2-pentilfuran	ND	ND	1228
limoneno	ND	ND	1195
cloroformo	11.0±3.1	8.69±0.99	ND
3-metil-3-buten-1-ol	7.2±0.8	5.89±1.20	ND
1-pentanol	11.6±0.5	5.11±0.88	ND
2-pentanona-4-metil-i.s	64	U.D.L	ND
3-metil-2-buten-1-ol	11.2±0.2	8.35±2.13	ND
tolueno	8.4±0.2	5.16±0.44	ND
fenol	ND	ND	2002
hexanal	9.6±1.2	0.27±0.09	1077
heptanal	ND	ND	1181
octanal	ND	ND	1285
nonanal	ND	ND	1390
decanal	ND	ND	1495
benzaldehído	1839.2±84.1	1912±73.2	ND
benzeno-etanol	10.6±0.2	6.17±0.12	ND
benceno-metanol	UDL	3.23±0.76	ND
1-hexanol	ND	ND	1354
undecano	ND	ND	1098
2-butilfurano	ND	ND	1126
ácido acético	ND	ND	1455
ácido hexanoico	ND	ND	1855
tetrametilpirazina	ND	ND	1474

UDL = por debajo del límite de detección. ND = no detectados

1.5 Propiedades antioxidantes

Otros componentes minoritarios de la semilla de almendra, aunque no menos importantes son los compuestos fenólicos que se encuentran generalmente tanto en las partes de los vegetales comestibles como en las no comestibles, además, son caracterizados por poseer actividad antioxidante, y por lo tanto, son también responsables de la inhibición o el retardo de la oxidación de diferentes biomoléculas.

Estos compuestos antioxidantes, se han evaluado tanto en extractos de la semilla completa, de la piel y de la almendra, determinándose que los extractos de la piel inhibieron mejor la formación de productos de oxidación primarios y secundarios, siendo los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico y sinápico los principales ácidos fenólicos extraídos (Subhashine *et al.*, 2002). Otros investigadores (Garrido *et al.*, 2008), también compararon muestras de piel de almendra obtenidas de diferentes procesos de almendra industrial (tostado y escaldado) y, demostraron que la transformación industrial que permite obtener extractos de la piel de almendras con mayor capacidad antioxidante, es el tostado, confirmando que la capacidad antioxidante de la piel de almendra es mayor debido a la presencia de compuestos fenólicos, cuyo contenido varía en función del proceso realizado en la separación de la piel. Además, observaron que, ciertos productos derivados de la reacción de Maillard y formados durante el procesado de la almendra, interferían en la evaluación de la capacidad antioxidante total. Finalmente, cuando se determinaron los compuestos fenólicos (Tabla 6) y se valoró la actividad antioxidante de semillas de almendra desgrasada (extracto crudo), además de dos fracciones de dicho extracto, una etanólica en la que quedaron retenidos los compuestos fenólicos de bajo peso molecular y otra con acetona constituida por taninos, se observó que la que presentó mayor actividad antioxidante fue la acetónica con un valor de 3.93 mmol trolox/g, mientras que el extracto crudo y la fracción etanólica fue solo de 0.24 y 0.09 mmol de trolox/g, respectivamente (Amarowicz *et al.*, 2005).

Tabla 1.5 Contenido de compuestos fenólicos en extracto crudo de almendra (mg/g) (Amarowicz et al., 2005).

Compuestos fenólicos	Contenido (semilla de almendra)
Ácido vanílico	0.10
Ácido cafeico	0.01
Ácido p-cumárico	0.03
Ácido ferúlico	0.02
Delfinidina	0.05
Cianidina	1.76
Quercitina	0.14
Kampferol	0.17
Isorhamnetina	0.15
Procianidina B ₂	1.24
Procianidina B ₃	3.16

1.6 Bebida de almendra

Este tipo de bebida, es un producto de extensa implantación en el mercado español, especialmente útil para personas con problemas de intolerancia a la lactosa o con alergia a las proteínas de la leche de vaca. A estos usos clásicos se suma desde hace algunos años sus destacados efectos saludables especialmente en la protección frente a las enfermedades cardiovasculares (Mandalari *et al.*, 2008).

La bebida de almendra es una emulsión de aceite en agua, aunque la fase dispersa es más compleja ya que además de gotas de aceite también puede haber en dispersión proteína y partículas sólidas procedentes de la molienda de la almendra, así como otras estructuras coloidales derivadas de la interacción de las anteriores. Las emulsiones son sistemas inestables termodinámicamente y tienden a desestabilizarse con el tiempo debido a diferentes mecanismos físico-químicos que pueden ocurrir simultáneamente, tales como cremado, floculación, coalescencia, inversión de fases, etc. (McClements, 2005).

La estabilidad de la emulsión es uno de los factores más importantes que rigen la vida útil de los alimentos coloidales. Por esa razón, la incorporación de energía mediante agitación, homogeneización, o procesos de pulverización son necesarios para obtener una emulsión fina con propiedades precisas de textura y un alto grado de estabilidad (Desrumaux y Marcand, 2002). Las operaciones de homogeneización disminuyen el tamaño de los glóbulos de grasa con el fin de prevenir el cremado y coalescencia de la grasa durante el almacenamiento de las emulsiones alimenticias. Las proteínas de la almendra, actúan como emulsionantes, siendo fundamentales para proteger y permitir la dispersión en la fase acuosa de los glóbulos de aceite en la de bebida de almendra. Sin embargo, en función de la presión aplicada en la operación de homogeneización, la nueva superficie generada de las gotas de aceite puede ser demasiado alta en relación con la fracción de proteína, por lo cual puede ser necesario agregar un emulsionante para completar la protección de las gotitas de aceite frente a los fenómenos de desestabilización. Los emulsionantes tales como la lecitina se encuentran entre los más utilizados para el procesamiento de alimentos debido a su biocompatibilidad y propiedades funcionales (Dickinson, 2003). Esto, facilita la formación de la emulsión y mejora su estabilidad mediante la reducción de las tensiones interfaciales de aceite-agua y por formación de una capa protectora alrededor de las gotitas de grasa para evitar la agregación (Guzey y McClements, 2006).

La bebida de almendra es un medio nutritivo, lo que favorece el crecimiento de esporas y microorganismos patógenos. Esta bebida, también contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados susceptible a la oxidación y rancidez hidrolítica, lo cual favorece la formación de volátiles y sabores indeseables. Por lo tanto, los tratamientos térmicos, se aplican a la bebida de almendras con el fin de ampliar su conservación (Hayes *et al.*, 2005). Estudios anteriores (Athisaya *et al.*, 2003), mostraron que la pasteurización también puede ser usada para reducir algunas sustancias indeseables como lipoxigenasas que promueven a la rancidez.

1.7 Características de la Ultra-alta presión de homogeneización (UHPH)

Los consumidores aprecian cada día más aquellos alimentos que mantienen sus cualidades nutricionales y características organolépticas mínimamente modificadas respecto a los productos frescos. Por otra parte, la garantía de seguridad de alimentos es un aspecto

ineludible. Por esta razón, se investigan y desarrollan alimentos con un procesamiento térmico mínimo, para aumentar su tiempo de almacenamiento y garantizar la calidad microbiológica, nutricional y sensorial lo más similar posible a las características del producto fresco. Estas nuevas tendencias de mercado han hecho que tecnologías tradicionales como el tratamiento térmico comiencen a ser sustituidas en algunos productos por tecnologías alternativas que eviten las pérdidas nutricionales y los cambios en las características organolépticas de los alimentos cuando son sometidos a altas temperaturas. Dentro de estos nuevos tratamientos no térmicos se encuentran: pulsos eléctricos, campos magnéticos oscilantes (Datta y Deeth 2004b), irradiación, ultrasonidos, microfiltración y altas presiones hidrostáticas (Deeth y Datta, 2004a), además de la UHPH.

Los homogeneizadores convencionales que trabajan a presiones moderadas (20-50 MPa) se utilizan comúnmente en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética para dispersar fases no miscibles, estabilizar emulsiones o preparar productos con propiedades reológicas específicas (Thiebaud *et al.*, 2003). En la industria láctea se utiliza la homogeneización desde hace tiempo, para reducir el tamaño del glóbulo graso e incrementar la estabilidad del producto, evitando el cremado y la coalescencia durante el almacenamiento.

El diseño básico de un homogeneizador consiste en una bomba de desplazamiento positivo acoplada a un intensificador que fuerza al fluido a pasar a través de una válvula de homogeneización, de forma que la combinación de diferentes fuerzas mecánicas produce la disrupción de las gotas de grasa. Uno de los equipos más utilizados es el homogeneizador APV-Gaulin, Rannie. En la válvula clásica APV-Gaulin el fluido es introducido axialmente a través del asiento de la válvula y el cabezal. Una vez que el fluido deja este espacio (10-30 μm) impacta contra el cabezal de la válvula saliendo del homogeneizador a presión atmosférica (Floury *et al.*, 2004) (Figura 1.1)

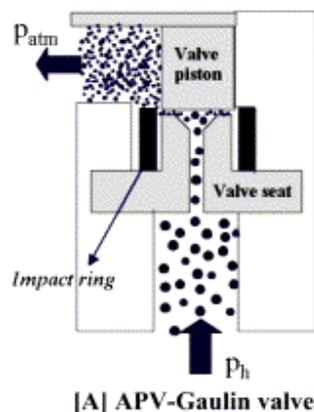


Figura 1.1 Diseño de válvula del homogeneizador convencional APV-Gaudin (Floury et al., 2004)

La UHPH es un proceso alternativo que se ha investigado como nuevo tratamiento para la pasteurización de alimentos líquidos (Vachon *et al.*, 2002). Esta tecnología está basada en los mismos principios de diseño de la homogeneización convencional, pero que permite alcanzar presiones muy superiores, que comprenden de 300 hasta 400 MPa, debido al nuevo diseño de las válvulas y a la utilización de nuevos materiales como la que se presenta en la Figura 1.2.



Figura 1.2 Válvulas de ultra alta presión de homogeneización con asiento de diamante y aguja de cerámica (The University of Tennessee, Knoxville, TN 37996).

Esta tecnología tiene la ventaja de trabajar en continuo. En los últimos años, se han utilizado diferentes equipos de homogeneización de alta presión, por diversas industrias con el fin de emulsionar, mezclar y procesar sus productos (Popper y Knor, 1990; Paquin, 1999; Floury *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2005; Gracia-Julia *et al.*, 2008). Concretamente, la tecnología UHPH se ha utilizado principalmente

para reducir el tamaño de partícula en suspensiones, dispersiones o emulsiones (Floury *et al.*, 2000; Thiebaud *et al.*, 2003), para producir emulsiones finas y estables, modificar propiedades de viscosidad de fluidos (Floury *et al.*, 2002, 2003; Cortés-Muñoz *et al.*, 2009), facilitar la extracción de metabolitos, además de poder alcanzar la inactivación de microorganismos y/o enzimas (Velázquez-Estrada *et al.*, 2012) o eventualmente algunos virus (Moroni *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2009; D'Souza *et al.*, 2011).

1.7.1 Funcionamiento general de los equipos UHPH

En la actualidad existen diversos equipos de alta presión de homogenización convencionales de uso habitual en la industria alimentaria, los cuales básicamente consisten en un generador de alta presión ensamblado a una válvula diseñada para resistir la aplicación de presiones elevadas. En cualquier tipo de válvula de homogenización, el fluido pasa a través de un espacio muy pequeño para después expandirse (Figura 1.3).

Los homogeneizadores de dos etapas son los de uso más frecuente y están equipados con dos válvulas: una válvula de alta presión (primera etapa) y otra de baja-presión (segunda etapa), en las que las transformaciones producidas dependen de las características geométricas de la aguja, el asiento, la altura y la forma del espacio de la válvula, además de las características fisicoquímicas del fluido (densidad, viscosidad y tasa de flujo). La utilización de la válvula de baja presión es opcional en el proceso de homogeneización de alta presión y se suele utilizar para dispersar los agregados que se pudieran formar a la salida de la primera etapa. En el caso de UHPH se utilizan homogeneizadores con diseño “pistón-gap” como los equipos desarrollados por AvestinTM, APVTM, NiroTM y Stansted Fluid PowerTM.

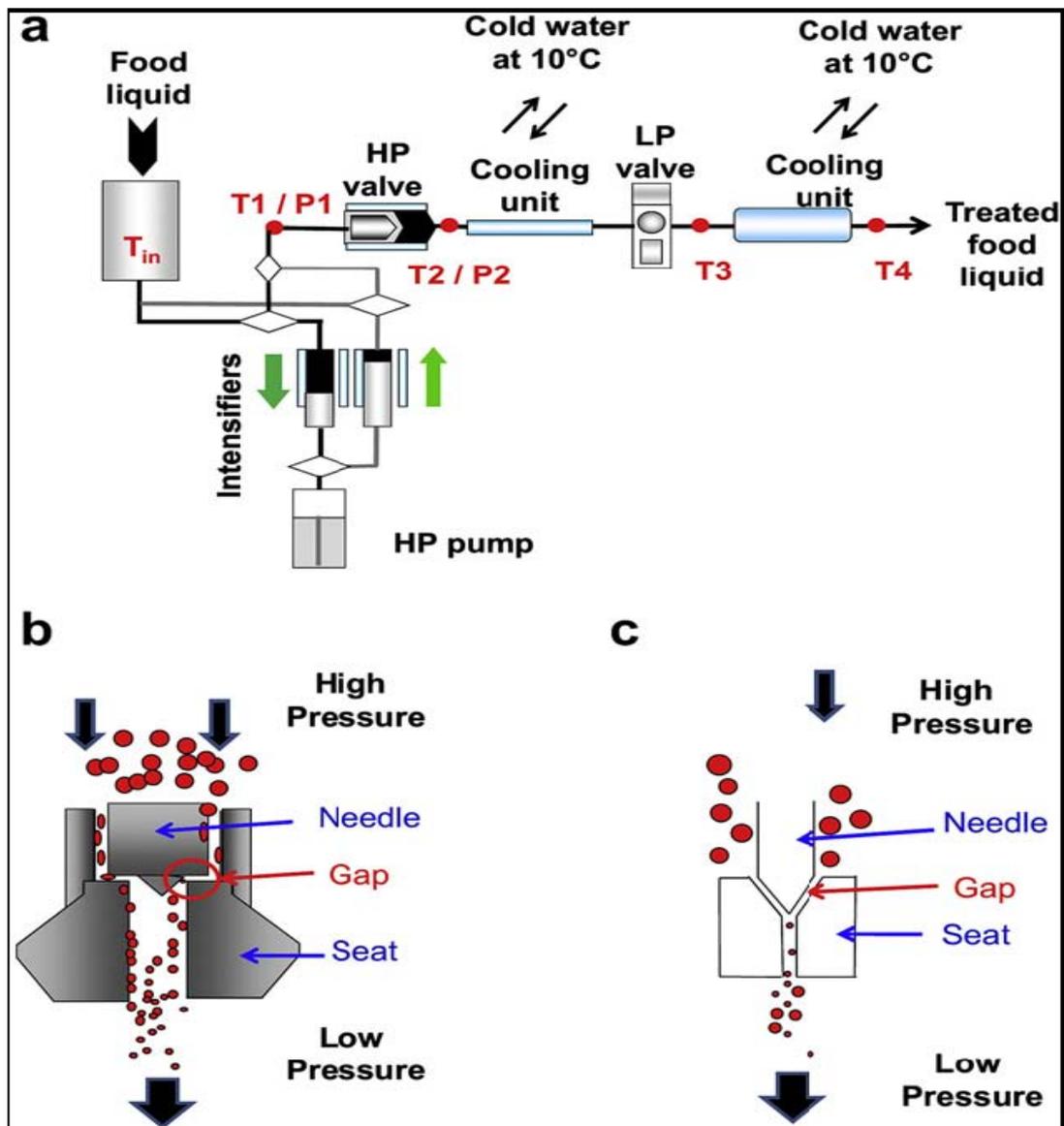


Figura 1.3 (a) Representación esquemática de homogeneizador de alta presión con dobles intensificadores. T_{in} , la temperatura inicial del fluido en el tanque de alimentación; $T1/P1$, sondas de temperatura y de presión situado en la entrada de la válvula HP; $T2/P2$, sondas de temperatura y de presión situado en la salida de la válvula HP; $T3$ y $T4$, sondas de temperatura después del primer y segundo dispositivo de refrigeración. (b) Representación esquemática de un marcado ángulo de la válvula de HP-Stansted (c) Representación esquemática de la válvula-HP en forma de Y. Figura obtenida de Dumay *et al*, (2012).

1.8 Equipos UHPH

1.8.1 Panda (Gea Niro Soavi)

Los equipos disponen de diferentes tipos de válvulas según las características del material a ser procesado. Niro dispone de una variedad de equipos de alta presión para laboratorio y planta piloto capaces de trabajar entre 100 y 150 MPa con un flujo máximo de 120 L/h (Figura 1.4).



Figura 1.4 Vista esquemática de la nano válvula (GEA Niro Soavi North America) (<http://www.nirosoavi.com/high-pressure-homogenization-technology.asp>)

1.8.2 Microfluidizer (Microfluidics International Corporation)

Estos equipos de laboratorio y de planta piloto pueden trabajar a presiones de 200-300 MPa, y operan mediante un mecanismo diferente y a mayores presiones que los homogeneizadores convencionales, que contienen una bomba intensificadora que provee alta presión para forzar al producto a pasar a través de una cámara de interacción formada por dos microcanales, que harán que el producto se divida en dos corrientes al entrar a la cámara. Dichas corrientes se acelerarán y terminarán colisionando entre sí desde direcciones opuestas (Olson *et al.*, 2004). El líquido se acelera dentro de la cámara debido a la disminución del diámetro del tubo, a la liberación de presión y a los cambios abruptos en la dirección que conducen a choques contra las paredes, causando estos fenómenos la ruptura de partículas en otras más pequeñas. La máxima velocidad de flujo que se puede alcanzar en la cámara es de 400 m/s y normalmente a

la salida de la cámara de interacción se coloca un intercambiador de calor para enfriar rápidamente el producto tratado (Perrier-Cornet *et al.*, 2005).

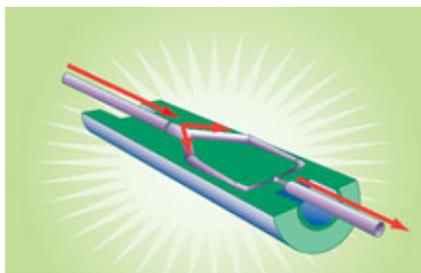


Figura 1.5 Vista esquemática del sistema de homogeneización de los equipos de Microfluidics International Corporation (<http://www.iesmat.com/Productos-MFL-LAB-M-110P.htm>)

1.8.3 Nanojet (Haskel)

Estos homogeneizadores alcanzan una alta presión por medio de dos corrientes de flujo opuestas y se utilizan principalmente para la producción de microemulsiones, nanosuspensiones y liposomas estables (Burgaud *et al.*, 1990). Los equipos que actualmente se comercializan son equipos de laboratorio cuya presión y flujo máximos son 200 MPa y 30 L/h.

1.8.4 Emulsiflex (Avestin)

Estos homogeneizadores pueden alcanzar presiones de hasta 200 MPa trabajando con flujos de 1.5-160 L/h, mientras que los equipos industriales alcanzan como máximo presiones de 100 MPa. La presión se alcanza gracias a una válvula especialmente diseñada para soportar altas presiones.

1.8.5 Stansted (Stansted Fluid Power Ltd)

En este tipo de equipo, la válvula de homogeneización está fabricada con un material cerámico capaz de soportar presiones de hasta 400 MPa., Además, su geometría es diferente comparada con la válvula APV-Gaulin (Figura 1). La primera diferencia radica en que la válvula Stansted la dirección de flujo es contraria a la que se tendría en una válvula convencional de homogeneización. En la válvula Stansted el flujo es alimentado axialmente a lo largo de la

parte móvil de la válvula y luego se acelera radialmente por el espacio entre el cabezal y el espacio de la válvula (Floury *et al.*, 2004), (Figura 1.6). La presión de homogeneización alcanzada, es dependiente del espacio que hay entre el asiento y el cabezal de la válvula, así mismo, también influye la velocidad de la corriente del fluido y la presión de éste, antes de pasar a través de la válvula. La caída de presión del líquido en la válvula es llamada presión de homogeneización (Floury *et al.*, 2004). La segunda diferencia consiste en que al utilizar la válvula Stansted se pueden alcanzar presiones de hasta 400 MPa, mientras que en una válvula APV-Gaudin las presiones que se alcanzan son mucho más bajas (70-100 MPa).

En la válvula de homogeneización Stansted ocurren cambios intensos de energía cuando el líquido pasa de alta presión y baja velocidad entre el espacio del pistón y la válvula a baja presión y alta velocidad al pasar por el espacio de la válvula y fluir a través del asiento hacia la salida del homogeneizador.

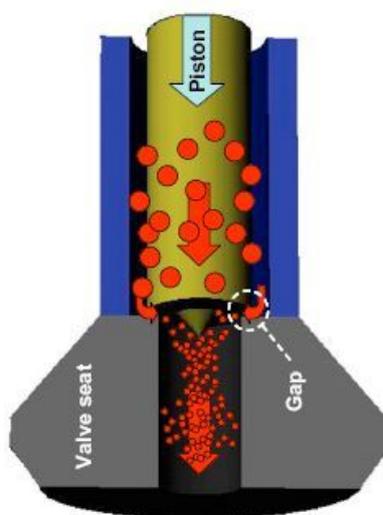


Figura 1.6 Vista esquemática de la válvula Stansted de alta presión de homogeneización. (Donsi *et al.*, 2009a).

El líquido procesado pasa a través de una sección convergente, espacio de la válvula, que es el comprendido entre el cabezal y el asiento de la válvula. Este espacio puede reducirse para aproximarlo al asiento de la válvula, lo que incrementa el nivel de presión (Floury *et al.*, 2004). El fluido es bombeado por un estrecho espacio a través del asiento contra el cabezal de la válvula, produciéndose un choque contra éste y el anillo de impacto con lo que se produce una

ultrarrápida depresión. Consecuentemente, tiene lugar una combinación de fuerzas de cizalla, cavitación, turbulencia y coalescencia en la superficie del fluido que, entre otros efectos, puede causar la ruptura de las células microbianas (Floury *et al.*, 2004).

Debido al incremento de la presión y a la fricción, se produce un aumento de temperatura, de aproximadamente 2-2.5 °C por cada 10 MPa, de manera que el grado de destrucción microbiana, y los cambios en las propiedades físicas y químicas del producto dependerá no solo de la presión aplicada sino, también de la temperatura alcanzada. Es posible modificar el efecto térmico, minimizándolo o potenciándolo al máximo, dependiendo de la sensibilidad de la matriz y del objetivo que se pretenda alcanzar. Esto puede hacerse introduciendo el producto a bajas temperaturas y controlando el calentamiento en la válvula (modalidad sin efecto térmico), o de forma que la temperatura alcanzada durante la homogenización sea la máxima posible, introduciendo el producto a temperaturas iniciales a partir de 40 °C (con modalidad efecto térmico), lo que permitirá alcanzar temperaturas muy superiores. Sin embargo, se ha de remarcar si se ensambla al sistema un intercambiador de calor para el enfriamiento final, que el tiempo al que el producto permanece a la temperatura máxima alcanzada en la válvula de alta presión es instantáneo, inferior a 0.5 s (Guamis *et al.*, 2006).

1.9 Efectos de la UHPH

1.9.1 Efecto de la UHPH sobre los microorganismos

La homogeneización de alta presión se ha utilizado frecuentemente para la inactivación de microorganismos (Middelberg, 1995). A pesar de que se han realizado diversas hipótesis, el mecanismo exacto de cómo se inactivan los microorganismos por homogenización alta presión aún no ha sido dilucidado completamente (Diels *et al.*, 2005). Los gradientes de alta presión, la fuerza de cizalla, los choques a alta velocidad, la turbulencia y los fenómenos de cavitación que se producen a través de la válvula de alta presión pueden inducir la ruptura mecánica, así como también la alteración de la membrana celular (Middelberg, 1995; Kleinig *et al.*, 1998; Gogate *et al.*, 2008). Este hecho, es decir, la alteración y rotura mecánica de las paredes celulares de los microorganismos, la presencia de restos de membrana y/o de células colapsadas, se han observado tanto por microscopía electrónica (Vachon *et al.*, 2002; Tribst *et al.*, 2009) como por microscopía inversa (Donsi *et al.*, 2009; Maresca *et al.*, 2011).

La eficiencia de UHPH para la inactivación microbiana aumenta al incrementar el nivel de presión y/o el número de ciclos a través del homogeneizador, siendo importante la temperatura del fluido durante su procesado, concretamente la que se alcanza en la válvula de alta presión y depende de varios factores como el nivel de presión, las características del fluido y la intensidad de los fenómenos de calentamiento, como resultado de los efectos de cizallamiento, en el que influye además el diseño y la eficiencia de la válvula de alta presión (Thiebaud *et al.*, 2003; Picart *et al.*, 2006; Donsí *et al.*, 2009; Maresca *et al.*, 2011). Por lo tanto, los efectos adicionales o sinérgicos entre las fuerzas mecánicas y el calentamiento son importantes en la inactivación microbiana, especialmente cuando las temperaturas son superiores a los 60 °C (Thiebaud *et al.*, 2003; Picart *et al.*, 2006). Al comparar la inactivación inducida por tratamientos de UHPH o térmicos de corto tiempo a 4 s, se determinó que por debajo de ~60-68 °C (dependiendo de la sensibilidad térmica de los microorganismos), los efectos mecánicos son principalmente los responsables de letalidad microbiana (Picart *et al.*, 2006), mientras que Pathanibul *et al.*, (2009) consideraron que la inactivación microbiana se asocia principalmente a los efectos térmicos cuando la temperatura del fluido tras la válvula de alta presión alcanza los 80 °C.

El número de ciclos, también es un factor a considerar. Así, Picart *et al.* (2006) obtuvieron una mayor eficacia en la letalidad microbiana en leche entera previamente inoculada con *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus* o *Pseudomonas fluorescens* al aplicar 3 ciclos a 200 MPa a una temperatura de entrada de 24 °C, que cuando se trató a un solo ciclo a 300 MPa. Igualmente, también se necesitaron múltiples ciclos de homogenización a 100 MPa para reducir la carga microbiana inoculada en zumos de zanahoria, durazno o naranja (Tahiri *et al.*, 2006; Patrignani *et al.*, 2009, 2010; Maresca *et al.*, 2011).

Otros factores que influyen en la letalidad microbiana son las características de la matriz alimenticia (agua, contenidos grasos, viscosidad, pH, etc.), así como el tipo de microorganismo y su concentración. La pared y membrana celular son las principales estructuras afectadas al aplicar tratamientos UHPH, y asociado a ello, los estudios indican que las bacterias Gram negativas con una pared más delgada son más sensibles que las Gram positivas (Vachon *et al.*, 2002; Wuytack *et al.*, 2002). En relación a la concentración inicial, parece que también juega un papel importante en la eficacia de la UHPH, siendo mayor al

disminuir el número de microorganismos. Así Tahiri *et al.* (2006) y Donsì *et al.* (2006) demostraron que la efectividad en la letalidad bacteriana era superior al disminuir el inóculo inicial.

En cualquier caso lo que se ha evidenciado es que los tratamientos UHPH no producen lesiones metabólicas (Kheadr *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002; Wuytack *et al.*, 2002; Thiebaud *et al.*, 2003; Diels *et al.*, 2005; Briñez *et al.*, 2006a, 2006b; Picart *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2007; Roig-Saguès *et al.*, 2009; Pedras *et al.*, 2012), y sólo se ha sugerido que pueden desarrollarse bacterias resistentes si se aplican ciclos múltiples a niveles relativamente bajos de presión de homogeneización (Donsí *et al.*, 2009).

En los últimos años, ha aumentado de manera notable el interés sobre la potencialidad de UHPH para incrementar la seguridad y la estabilidad microbiana de los alimentos u otros productos líquidos perecederos. La eficacia de los tratamientos UHPH, aplicados en un único pase a presiones de al menos 200 MPa, se ha demostrado en la inactivación de las células vegetativas de las principales bacterias patógenas (*Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* o *Salmonella* spp.), inoculadas en leche, huevo entero o zumos de frutas (Briñez *et al.*, 2006a, 2006b, 2007; Velázquez *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Roig-Sagués *et al.*, 2009; Velázquez *et al.*, 2011) y de microorganismos de alteración (*Lactobacillus plantarum* o *Saccharomyces cerevisiae*) en zumo de naranja (Campos y Cristianini, 2007). También, los tratamientos de UHPH de entre 200-300 MPa se han mostrado tan eficaces como la pasteurización, garantizando la estabilidad microbiológica de alimentos como la leche (Kheadr *et al.*, 2002; Thiebaud *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2005; Pereda *et al.*, 2007; Smiddy *et al.*, 2007), leche de soja (Cruz *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012), zumos de fruta (Tahiri *et al.*, 2006; Suárez-Jacobo *et al.*, 2010; Velázquez-Estrada *et al.*, 2011; Maresca *et al.*, 2011; McKay *et al.*, 2011; Calligaris *et al.*, 2012; Suárez-Jacobo *et al.*, 2012), mostos (Puig *et al.*, 2008).

Sin embargo, la UHPH no es tan eficaz cuando se trata de inactivar esporas bacterianas. El efecto de la UHPH sobre *Alycyclobacillus acidoterrestris* fue evaluado por Bevilacqua *et al.* (2007), observando que tratamientos de entre 50 y 170 MPa apenas reducen de 1 a 2 log ufc/mL las células vegetativas en un caldo de cultivo y en menos de 1 log ufc/mL sus esporas en zumo de manzana (Bevilacqua *et al.*, 2007). En referencia a otras bacterias esporuladas de

importancia en los alimentos, como *Bacillus cereus*, que puede ser causa de toxiinfecciones alimentarias, o *B.subtilis*, involucrado en procesos de alteración de alimentos, Chaves-López *et al.* (2009) observaron que sólo cuando se encadenaban tres ciclos consecutivos de UHPH a 150 MPa se obtenían reducciones significativas cercanas a los 5 log ufc/ml de sus esporas. No obstante, la aplicación de varios ciclos encadenados de tratamientos UHPH, que ya había sido descrita anteriormente por Tahiri *et al.* (2006), no resultaría práctica desde el punto de vista industrial (Dumay *et al.*, 2013). Una forma de incrementar la eficacia de los tratamientos UHPH aplicados en un solo pase frente a esporas bacterianas es precalentar la matriz a una temperatura de entre 75 °C y 85 °C antes del tratamiento, lo que implica alcanzar unas temperaturas máximas durante el paso por la válvula de presión, cercanas a los 140 °C, y conseguir así una estabilidad similar a la de un tratamiento UHT, tal como se ha descrito recientemente en leche inoculada con *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B. sporothermodurans*, *B. coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus* o *B. subtilis* (Amador-Espejo *et al.*, 2014b) o en leche de soja envasada asépticamente (Polisei-Scopel *et al.*, 2014).

1.9.2 Efectos de la UHPH en enzimas de interés

Las enzimas son de gran importancia en la elaboración y conservación de los alimentos, tanto por su efecto negativo por lo que deben ser inactivadas, como por su efecto positivo utilizándose para mejorar y/o optimizar la elaboración de algunos alimentos. El efecto de la UHPH es muy variable en la actividad de los enzimas, aunque probablemente, los fenómenos producidos en la válvula de homogeneización, junto con el aumento de la temperatura producen modificaciones estructurales en la conformación de la enzima causando en muchas ocasiones una disminución de su actividad.

Diversos autores (Hayes & Kelly, 2003a; Datta *et al.*, 2005; Diels *et al.*, 2005; Picart *et al.*, 2006; Pereda *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2008) investigaron la inactivación inducida por UHPH de enzimas propios de la leche como la fosfatasa alcalina, plasmina-plaminogeno y lipasas, utilizando presiones entre 200 y 300 MPa, y aunque en general su inactivación aumentó al incrementar la presión y la temperatura de entrada, concluyeron que el efecto del tratamiento UHPH en estos enzimas, dependía de los parámetros de procesamiento, como la presión de homogeneización, la temperatura de entrada, la temperatura de la válvula de alta presión, el

tiempo de residencia, además de la sensibilidad de la propia enzima. También se han realizado investigaciones del efecto de la UHPH sobre la actividad de las lipasas endógenas y de origen bacteriano de la leche (Vannini *et al.*, 2004; Diels *et al.*, 2005), observando que eran más sensibles las lipasas de lipoproteína endógena que las lipasas de bacterias psicrotróficas.

En zumos de frutas, la aplicación de la UHPH en la inactivación enzimática ha sido efectiva, consiguiendo que con un solo ciclo a 300 MPa y una temperatura de entrada de 10 y 20 °C, en zumo de naranja, se redujera la actividad pectinmetilesterasa (PME) un 96% (Velázquez-Estrada *et al.*, 2012), se produce la completa inactivación de la actividad pectato liasa en zumo de plátano al aplicarse niveles de presión de 200 MPa con temperatura de entrada de 4 °C (Calligaris *et al.*, 2012) y la inactivación total de la polifenoloxidasas y la PME en zumo de manzana después del procesamiento a 300 MPa, con una temperatura de entrada de 4 °C (Suárez-Jacobo *et al.*, 2012).

Finalmente, en relación a la lipooxigenasa presente en los productos vegetales, como los cereales, soja y almendra, y que tiene repercusiones en la calidad del producto, se ha determinado que se produce su completa inactivación al aplicar el licuado de soja a presiones de 200-300 MPa y una temperatura de entrada de 40 y 50 °C (Cruz, 2008).

1.9.3 Efecto de la UHPH en la estabilidad de las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones se debe, entre otros factores, a la existencia de una cubierta proteica alrededor de las gotas de aceite que favorece la dispersión en la fase acuosa, por lo que es importante la integridad de la cobertura para evitar fenómenos de coalescencia.

En general las emulsiones aceite-agua son inestables termodinámica y cinéticamente, pudiéndose manifestar dicha inestabilidad de maneras diferentes. Por una parte, la diferencia de densidad entre la fase acuosa y la fase lipídica, según la ley de Stokes favorece la migración de las gotas de grasa de manera espontánea hacia la superficie, dando lugar a una capa de cremado. Por otra parte, cuando las gotas de grasa se aproximan debido a diferentes tipos de interacciones de atracción, éstas pueden flocular, y por tanto, favorecer la formación de agregados, que posteriormente pueden unirse en gotas de mayor tamaño, lo que se conoce como fenómeno de coalescencia. El proceso de separación espontánea de la grasa será mucho más rápido cuanto mayor sea, el tamaño de los glóbulos grasos y la temperatura del producto;

por esa razón las emulsiones suelen estabilizarse mediante la reducción mecánica del tamaño las gotas, que se consigue mediante la homogenización.

Desrumaux *et al.*, (2002) aplicaron presiones entre 50 y 350 MPa a emulsiones de aceite-agua con un 20% de aceite de girasol y con un 1,5% de proteínas séricas, y observaron que la máxima estabilización se consiguió al aplicar presiones de alrededor de 100 MPa, ya que a partir de esta presión, el tamaño de la gota de grasa volvió a aumentar. Los mismos autores, también observaron que cuando utilizaron presiones superiores a 200 MPa, las proteínas sufrieron cambios conformacionales que alteraron sus propiedades emulsionantes. Por otra parte, Flourey *et al.*, (2002) utilizaron proteína de soja como emulsionante y consiguieron emulsiones estables con comportamiento de gel utilizando presiones de hasta 350 MPa, donde el tamaño de la gota disminuyó a medida que aumentó la presión. Posteriormente, Flourey *et al.* (2003) investigaron la estabilidad de una emulsión preparada con 20% de aceite de girasol y un 0.75% de metilcelulosa después de tratarla con UHPH a 150 MPa y observaron un aumento de estabilidad y una disminución del tamaño de gota. Otros autores (Cruz *et al.*, 2007; Polisel-Scopel *et al.*, 2012) trabajaron con leche de soja, observando que a presiones de 200 y 300 MPa se produjo una alta estabilidad física.

Algunos autores (Flourey *et al.*, 2000, 2004; Jafari *et al.*, 2008), observaron que cuando se aplicaron tratamientos a 250-300 MPa se produjo un incremento del tamaño de los glóbulos de grasa, atribuyéndolo predominantemente a fenómenos de coalescencia (con o sin agregación de partículas), de los glóbulos de grasa cuando se incrementó la temperatura de entrada o cuando la concentración del surfactante ya no fue suficiente para cubrir la interfase aceite-agua recién creada, produciendo desestabilización. Además, los fenómenos de agregación/coalescencia podrían estar relacionados con una refrigeración insuficiente inmediatamente después de la salida del líquido de la válvula de alta presión, favoreciendo la desnaturalización de las proteínas en la interfase aceite-agua y la agregación de los glóbulos (Hayes *et al.*, 2005). Al respecto, Lee *et al.*, (2009) compararon el efecto de emulgentes de bajo peso molecular y proteínas, poniendo de manifiesto que las proteínas fueron más eficientes como agentes estabilizadores al aplicarse el tratamiento por UHPH en las emulsiones, debido a la capa más compacta y viscoelástica formada en la interfase aceite-agua.

A pesar de la diversidad de los estudios realizados en este ámbito, los investigadores, señalan que la estabilidad de las emulsiones depende además del tamaño de la gota de grasa, de la cantidad y estado de las moléculas que ejercen de emulsificantes, que en muchos casos son las propias proteínas que también se ven afectadas por el tratamiento UHPH.

1.9.4 Efecto de las proteínas en los tratamientos UHPH y en la estabilidad de las emulsiones

Los tratamientos de alta presión de homogeneización causan diferentes efectos sobre las proteínas. En el caso de la leche y derivados, se ha determinado que en las proteínas séricas uno de los efectos es la desnaturalización, tal como lo observaron Desrumaux y Marcand (2002), en emulsiones de aceite en agua estabilizadas con proteínas de suero de leche tratadas a presiones superiores a los 200 MPa. Esta desnaturalización se confirmó por Hayes y Kelly (2003a) a aplicar temperaturas de entrada superiores a 45 °C y 250 MPa, observando que en estas condiciones la desnaturalización fue mayor en la β -lactoglobulina que en las α -lactoalbúmina, Sin embargo, la desnaturalización fue mínima cuando se aplicaron presiones entre 50 y 200 MPa, coincidiendo con la observaciones de Sandra (2005) y Bouaouina, (2006). Sin embargo, Hayes, (2005), Datta, (2005), Zamora *et al.* (2007) y Pereda *et al.* (2008) determinaron que a esas presiones los tratamientos UHPH producía la desnaturalización parcial de las proteínas séricas, y Serra *et al.* (2008) observaron un incremento del 14 al 26% en el grado de desnaturalización de la β -lactoglobulina al utilizar presiones de 100 y 300 MPa, respectivamente.

En el caso de las micelas de caseína, a presiones inferiores a 150 MPa aplicada en leche desnatada, el efecto es mínimo, sin embargo, a presiones de 200 MPa su tamaño se redujo un 5 % (Hayes *et al.*, 2003a). Sandra y Dalgleish (2005), demostraron que el tamaño de la micela de caseína de leche en polvo desnatada reconstituida disminuye al aplicar 186 MPa de presión y al incrementar el número de ciclos a presiones superiores a 200 MPa, Esta disminución causó el aumento de la solubilidad de la κ -caseína y las α -caseína, debido a la ruptura de interacciones hidrofóbicas y/o a los efectos mecánicos de cizalla sobre las proteínas más cercanas a la superficie de la micela. De manera similar Roach *et al.* (2008), observaron una disminución lineal del 30% en la micela de caseína a presiones de 0 a 200 MPa.

En el caso de la leche de soja, Flourey *et al.* (2002) estudiaron los efectos de la UHPH en una disolución al 3% de globulina 11S, observando que su solubilidad se mantenía a presiones inferiores a 150 MPa, pero al aplicar presiones superiores a 200 MPa se producía una disminución de su solubilidad debido a su desnaturalización. A presiones mayores a 200 MPa, las fuerzas mecánicas, que inducen fenómenos de turbulencia y cavitación afectan la conformación de la macromolécula que tiende al desdoblamiento y a la agregación, aumentando los efectos hidrofóbicos que conducen a las interacciones entre proteína-proteína. Estos cambios pueden producir fenómenos como la floculación de la emulsión proteína-proteína, que a su vez provoca un aumento en la viscosidad de la emulsión (Cruz *et al.*, 2008).

1.9.5 Investigación de la aplicación de la UHPH en diferentes alimentos

En la Tabla 1.7, se muestra una revisión de las principales investigaciones relacionadas con la aplicación de la UHPH en alimentos.

Tabla 1.6 Investigaciones realizadas con equipos de ultra alta presión de homogeneización en alimentos. T₀ Temperatura de entrada de la muestra, T₁ Temperatura después de la primera válvula de presión, T₂ Temperatura de salida.

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Microfluidizer® Newton, MA, USA	Mezcla para helado inoculado con <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	50-200	-	33-50	-	-	-	(Feijoo <i>et al.</i> , 1997)
	Almidón de harina de arroz al 22, 32 y 36%	62-100	-	-	-	-	2	(Guraya y James, 2002)
	Emulsión de concentrado de proteínas séricas con aceite de girasol.	100-200	-	-	-	-	1,2,3 y 4	(Perrier-Cornet <i>et al.</i> ,2005)
Avestin Inc., Model EmulsiFlex-C5. Ottawa, Canada	Solución acuosa de β- lactoglobulina	0-140	-	-	-	-	-	(Subirade <i>et al.</i> , 1998)
	Leche tampón fosfato y permeado de suero inoculados con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LM0230	100-200	-	-	-	-	1,3,5	(Moroni <i>et al.</i> , 2002)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Avestin Inc., Model EmulsiFlex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato inoculado con <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria innocua</i> y <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>Salmonella entérica</i> serotipo typhimurium, <i>Shigella flexneri</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Escherichia coli</i> MG1655 y LMM1010	100300	-	-	-	42	-	(Wuytack <i>et al.</i> , 2002)
	Tampón fosfato inoculado con <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Tiphyimurium</i> .	100-200	-	-	-	-	-	(Wuytack <i>et al.</i> , 2003)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Avestin Inc., Model EmulsiFlex- C5. Ottawa, Canada	Emulsión de concentrado de proteína de soja con aceite de soja.	70	5	-	-	-	-	(Roesch y Corredig, 2003)
	Tampón fosfato inoculado con <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> .	100-300	-	5-50	-	18	-	(Diels <i>et al.</i> , 2003)
	Tampón fosfato inoculado con <i>Escherichia coli</i> MG 1655	100-300	-	5-50	-	18	-	(Diels <i>et al.</i> , 2004)
	Leche en polvo desnatada reconstituida.	41, 114 y 186	-	22	-	18	2, 4 y 6	(Sandra y Dalgleish, 2005)
	Tampón fosfato de potasio inoculado con <i>Escherichia coli</i> K12 MG 1655.	50-300	-	25	-	-	-	(Diels <i>et al.</i> , 2005)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Avestin Inc., Model EmulsiFlex-C5. Ottawa, Canada	Tampón fosfato y zumo de naranja inoculados con <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>Penicillium</i> ssp.	100, 150 y 200	-	25	-	-	1, 3 y 5	(Tahiri <i>et al.</i> , 2006)
	Leche cruda desnatada	179	-	25	-	-	6	(Sandra y Dalglish, 2007)
	Leche cruda inoculada con <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	200	-	28	-	-	5	(Kheadr <i>et al.</i> , 2002)
	Zumo de naranja	170	-	30	-	-	-	(Lacroix <i>et al.</i> , 2005)
GEA Niro Sozvi., Panda Parma, Italia.	Leche	100	-	-	-	-	-	(Guerzoni <i>et al.</i> , 1999)
	Leche	75	-	-	40	-	-	(Lanciotti <i>et al.</i> , 2004a)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
	Leche cruda inoculada con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactococcus spp lactis</i>	100	-	-	-	-	-	(Lanciotti <i>et al.</i> , 2004b)
GEA Niro Sozvi., Panda Parma, Italia.	Leche desnatada en polvo inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, <i>Salmonella enteritidis</i> E4, <i>S. typhimurium</i> T5, <i>Escherichia coli</i> 555, <i>Staphylococcus aureus</i> ST1, <i>Bacillus subtilis</i> A2, <i>Lactobacillus plantarum</i> E547, <i>Lactobacillus helveticus</i> 15009, <i>Pseudomonas putida</i> 754, <i>Proteus vulgaris</i> PV1.	75, 100 y 130	-	-	-	-	-	(Vannini <i>et al.</i> , 2004)
Rannie Mini-Lab ŽAPV, Wilmington MA, USA.	Productos lácteos inoculados con <i>Lactobacillus delbriekii</i> spp <i>bulgaricus</i> 11842.	135	-	-	-	-	3	(Bury <i>et al.</i> , 2001)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Manton-Gaulin pilot Homogenizer. Model 15MTBA.	Zumos de cítricos	0-30	-	-	-	-	-	(Betoret <i>et al.</i> , 2009)
Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK.	Emulsión de aceite de soja y solución acuosa de proteína sérica.	20, 150 y 300	-	4	-	-	-	(Floury <i>et al.</i> , 2000)
	Emulsión de aceite de girasol y solución acuosa de proteína sérica.	50-350	-	5	-	40	-	(Desrumaux y Marcand, 2002)
	Emulsión de aceite de girasol y solución acuosa de globulina de soja 11S.	50-350	-	-	-	-	-	(Floury <i>et al.</i> , 2002a)
	Solución de metilcelulosa	20-350	-	-	-	-	-	(Floury <i>et al.</i> , 2002b)
	Emulsión de aceite y metilcelulosa	20-350	-	5 y 20	-	-	-	(Floury <i>et al.</i> , 2003)
Stansted Fluid Power Ltd., Model FPG7400 H., Essex, UK.	Leche	100-300	-	4, 14 y 24	-	29,8-78,0	-	(Thiebaud <i>et al.</i> , 2003)
	Leche estandarizada 0-10% de grasa	50-200	3-20	6-10	-	26,4-53,6	-	(Hayes y Kelly, 2003a)
	Emulsión aceite de girasol y Tween 20.	200-350	-	-	-	-	-	(Floury <i>et al.</i> , 2004b)
	Leche entera	200	-	10-55	-	56,4-80,0	-	(Datta <i>et al.</i> , 2005)
	Leche entera	100-300	-	4 y 24	30,2-75,8	13,5	1, 2 y 3	(Picart <i>et al.</i> , 2006)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Stansted Fluid Power Ltd., Model DRGFPG7400 H: 350. Essex, UK.	Leche y zumo de naranja inoculados con <i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090).	300	30	6 y 20	-	16-18	-	(Briñez <i>et al.</i> ,2006a)
	Leche y zumo de naranja inoculados con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565 y <i>Staphylococcus carnosus</i> CECT 4491.	300	30	6 y 20	-	16-18	-	(Briñez <i>et al.</i> ,2006c)
Benchtop high-pressure homogenizer (model/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid Power Ltd., Essex,UK.	Huevo líquido inoculado con <i>Salmonella enterica</i> serovar Senftenberg 775Wtraim.	150, 200 y 250	-	6				(Velazquez-Estrada <i>et al.</i> ,2008)
	Leche con grasa inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> CCUG 15526	200, 300 y 400	-	4	-	-	-	(Roig <i>et al.</i> ,2009)
Leche	300 MPa		55,65, 75 y 85				Amador-Espejo <i>et al.</i> (2014b)	Leche

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
.	Leche estandarizada al 3,5% grasa	200-300	-	30 y 40	-	-	-	(Pereda <i>et al.</i> ,2006)
	Leche estandarizada al 3,5% grasa	100, 200 y 300	-	30 y 40	64,7-103,0	-	-	(Pereda <i>et al.</i> ,2007)
	Leche	100, 200 y 300	- y 30	30 y 40	-	25-36	-	(Serra <i>et al.</i> ,2007)
Stanted Fluid Power Ltd., Model FPG11300. Essex, UK	Leche estandarizada al 3,5% grasa	100, 200 y 300	- y 30	30	33-41	40	-	(Zamora <i>et al.</i> ,2007)
	Leche estandarizada al 3,5% grasa	200-300	-	30 y 40	78,5-101,5	21-27	-	(Pereda <i>et al.</i> ,2008a)
	Leche estandarizada al 3,5% grasa	200-300	-	30 y 40	-	-	-	(Pereda <i>et al.</i> ,2008b)
	Leche desnatada	100-300	- y 30	30	-	23,4-33,2	-	(Serra <i>et al.</i> ,2008a)
	Leche estandarizada al 3,5% grasa	200-300	40	30	-	23,4-33,2	-	(Serra <i>et al.</i> ,2008b)
	Leche estandarizada al 3,5% grasa	200-300	30 y 40	30	-	23,4-33,2	-	(Serra <i>et al.</i> ,2008c)
	Leche de soja	200 y 300	-	40	-	88-108	-	(Cruz <i>et al.</i> ,2008)
	Leche de soja	200 y 300	-	40 y 50	-	89-109	-	(Cruz <i>et al.</i> ,2009)
	Licuada de soja	200 y 300	-	50	95 y 108	-	-	(Ferragut <i>et al.</i> ,2009)

Equipo	Producto	Presión		Temperatura			Ciclos	Autores
		1ª Etapa	2ª Etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Stanted Fluid Power Ltd., Model FPG11300. Essex, UK	Zumo de manzana	100, 200 y 300	-	4 y 20	6,5-19,5	14,2-20,3	15,5-21,3	(Suarez <i>et al.</i> ,2010)
	Zumo de naranja	100, 200 y 300	-	10 y 20	20,0-37,8	41,8-95,3	20,0-22,3-	(Velazquez- Estrada <i>et al.</i> ,2012)
	Licuada de soja	200 y 300	-	55, 65 y 75	105,7, 111,7 y 117,0	27,1, 27,0 y 25,6	-	(Poliseli- Scopel <i>et al.</i> ,2012)
	Volátiles en licuado de soja	200 y 300	-	55, 75 y 80	-	-	-	(Poliseli- Scopel <i>et al.</i> ,2013)
	Leche	200 y 300 MPa		55,65, 75 y 85				Amador- Espejo <i>et al.</i> (2014a)

CAPITULO II: Antecedentes, objetivos y plan de trabajo

La bebida de almendra es un producto de extensa implantación en el mercado español, como alternativa a la leche de vaca, a pesar de que no son productos comparables. Esta bebida de almendra es consumida principalmente por personas con problemas de intolerancia a la lactosa o con alergias a las proteínas de la leche. A estos usos clásicos se suma desde hace algunos años sus destacados efectos saludables, especialmente en la protección frente a enfermedades cardiovasculares, al permitir la sustitución de los ácidos saturados de la leche por los ácidos grasos insaturados (principalmente monoinsaturados) que aporta esta bebida vegetal, a lo que se ha de unir el efecto antioxidante de sus flavonoides, de la vitamina E y de las poliaminas, el efecto protector de la fibra alimentaria y su contenido en fitosteroles, que reducen la absorción del colesterol, entre otros compuestos bioactivos.

En las sociedades modernas, las denominadas sociedades del bienestar, los conceptos de Seguridad, Calidad y Promoción de la Salud han pasado a adquirir un interés prioritario en diversos ámbitos, y más aún, en aquellos temas que son especialmente sensibles, como es el de la nutrición. En este contexto, los valores que intervienen en la definición y la apreciación de un alimento son complejos e incluyen factores que atañen a los tres aspectos citados. Esta tesis está situada en el contexto de un proyecto que, en parte, pretende contemplar dichos aspectos de la bebida de almendra, que por sus características de composición puede representar una alternativa dietética saludable, no solo en su aplicación más habitual como sustituto de leche, sino también para un sector más amplio de la población, ya que puede contribuir a reducir la incidencia de las denominadas enfermedades de la civilización, cáncer y enfermedades cardiovasculares entre otras, entrando de lleno en el ámbito de la promoción de la salud.

En la actualidad, existen en el mercado licuados de almendra obtenidos por la aplicación de tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización, pero no hay todavía productos estabilizados por la aplicación de altas presiones, a pesar de que esta tecnología podría evitar algunos de los efectos indeseables de la aplicación del calor en las propiedades sensoriales, nutricionales y biofuncionales de estos productos.

La alta ultra presión de homogenización (UHPH), en la que se aplican presiones entre 100 y 400 MPa, todavía no ha llegado a implantarse en la industria alimentaria, aunque si en la

farmacéutica. La gran eficacia conseguida en la operación de homogenización ha abierto nuevas perspectivas de aplicación de esta tecnología en el ámbito de la conservación de alimentos líquidos y en la obtención de productos derivados de éstos, con características de calidad mejoradas respecto de los productos procesados mediante tratamientos térmicos convencionales.

La UHPH posee la capacidad de destruir microorganismos, mientras que las pérdidas nutricionales y organolépticas pueden ser menores que las experimentadas en los tratamientos térmicos convencionales. Por otra parte, la UHPH aporta una excelente estabilidad física a los productos coloidales, tal como el licuado de almendra. Por ello, esta tecnología puede ser adecuada para solucionar en una sola operación los aspectos que se requieren en la obtención de licuados de almendra con unos buenos estándares de calidad. El presente trabajo se realizó con la financiación obtenida del proyecto nacional AGL2008-05430-C02-01 titulado “Aplicación de la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) en la elaboración de licuados vegetales (soja y almendra) de alta calidad”.

2.1 Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue estudiar los efectos de la aplicación de la tecnología UHPH en la elaboración de licuados de almendra como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales.

2.1.1 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de elaboración de licuados base de almendra en planta piloto.
- Estudiar diferentes combinaciones de presión y temperatura de entrada en tratamientos UHPH y seleccionar las condiciones óptimas de tratamientos para obtener bebidas que puedan conservarse en refrigeración y a temperatura ambiente.
- Estudiar las principales modificaciones físicas, químicas y bioquímicas de las bebidas tratadas por UHPH en comparación con las tratadas térmicamente en base a las características de calidad más relevantes de este tipo de productos.

- Identificar la microbiota potencialmente alterante de la bebida de almendra y evaluar su letalidad por el efecto de tratamientos UHPH.
- Establecer la vida útil de bebidas tratadas por UHPH en base a parámetros de calidad seleccionados en relación a su estabilidad higiénica, física, propiedades sensoriales y nutritivas.

2.1.2 Plan de trabajo

Esta tesis se llevó a cabo a través de cuatro estudios secuenciales, ya que al haber antecedentes bibliográficos escasos en relación a las bebidas de almendra, se tuvo que partir con la optimización de la elaboración de la misma en planta piloto, para continuar con el estudio del efecto de la UHPH.

Estudio 1

Consistió en un estudio preliminar para establecer el proceso de elaboración de la bebida de almendra que constituiría el producto base para el posterior tratamiento de pasteurización y tratamientos UHPH en los sucesivos estudios. Se realizaron dos bebidas de producto base, una con lecitina y otra sin dicho emulgente. En total se estudiaron cuatro bebidas de almendra: producto base con lecitina (PBCL), producto base sin lecitina (PBSL), bebida de almendra pasteurizada con lecitina (PACL) y bebida de almendra pasteurizada sin lecitina (PASL). Se realizaron análisis de parámetros relevantes en la calidad global tales como análisis microbiológicos, estabilidad física y análisis de oxidación, además de la composición química.

Después de evaluar los resultados se ajustó el proceso de elaboración del licuado, que fue utilizado en las siguientes etapas del plan de trabajo (Figura 2.1)

Estudio 2

Se realizó una prospección de diferentes condiciones de tratamiento UHPH (Tabla 2.1) en los licuados de almendra producidos en planta piloto y se compararon con tratamientos térmicos convencionales (pasteurización y UHT). Los licuados procedentes de los diferentes tratamientos aplicados se sometieron a análisis microbiológicos y fisicoquímicos. Concretamente, se realizaron análisis de composición química, análisis microbiológicos y

físicos, así como hidrofobicidad de las partículas de la bebida de almendra, además de otros factores de calidad de importancia en este producto, tales como actividad antitripsina y la oxidación lipídica. En total se estudiaron ocho tratamientos: producto base (PB), seis tratamientos por UHPH y los tratamientos térmicos convencionales (pasteurización y UHT) (Figura 2.2).

Tabla 2.1 Tratamientos UHPH de bebida de almendra, utilizados en el Estudio 2.

Temperatura de entrada (°C)	Presión (MPa)	Enfriamiento
55	200 y 300	Instantáneo
65	200 y 300	Instantáneo
75	200 y 300	Instantáneo

Estudio 3

Se evaluó el efecto letal de los tratamientos UHPH en esporas de *Bacillus*. Tras aislar e identificar algunas cepas bacterianas esporuladas de los licuados de almendra tratados a 300 MPa de la etapa anterior, entre las más frecuentemente aisladas, se seleccionaron tres cepas (*B. cereus*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus*) que se inocularon en el licuado de almendra estéril, determinando la letalidad producida al aplicar tratamientos de 300 MPa, y temperaturas de entrada de 55, 65, 75 y 85 °C (Figura 2.3).

Estudio 4

De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios 2 y 3, se seleccionaron las condiciones de tratamiento UHPH (200 MPa, 55 y 75 °C) como las más adecuadas para valorar tratamientos similares a la pasterización baja y alta, respectivamente, y compararlas con las muestras pasteurizadas de manera convencional. La comparación de éstas se realizó por medio del estudio de los análisis de estabilidad física, color, microbiología, microscopía y oxidación. Además, se hizo un seguimiento de los parámetros mencionados a lo largo del almacenamiento en refrigeración para determinar la calidad y vida útil de los licuados. En el estudio de oxidación de la bebida de almendra, y debido a los resultados en la primera etapa se decidió determinar los compuestos volátiles generados en las diferentes muestras

de bebida de almendra tratadas por UHPH y compararlas con las muestras pasteurizadas, (Figura 2.4).

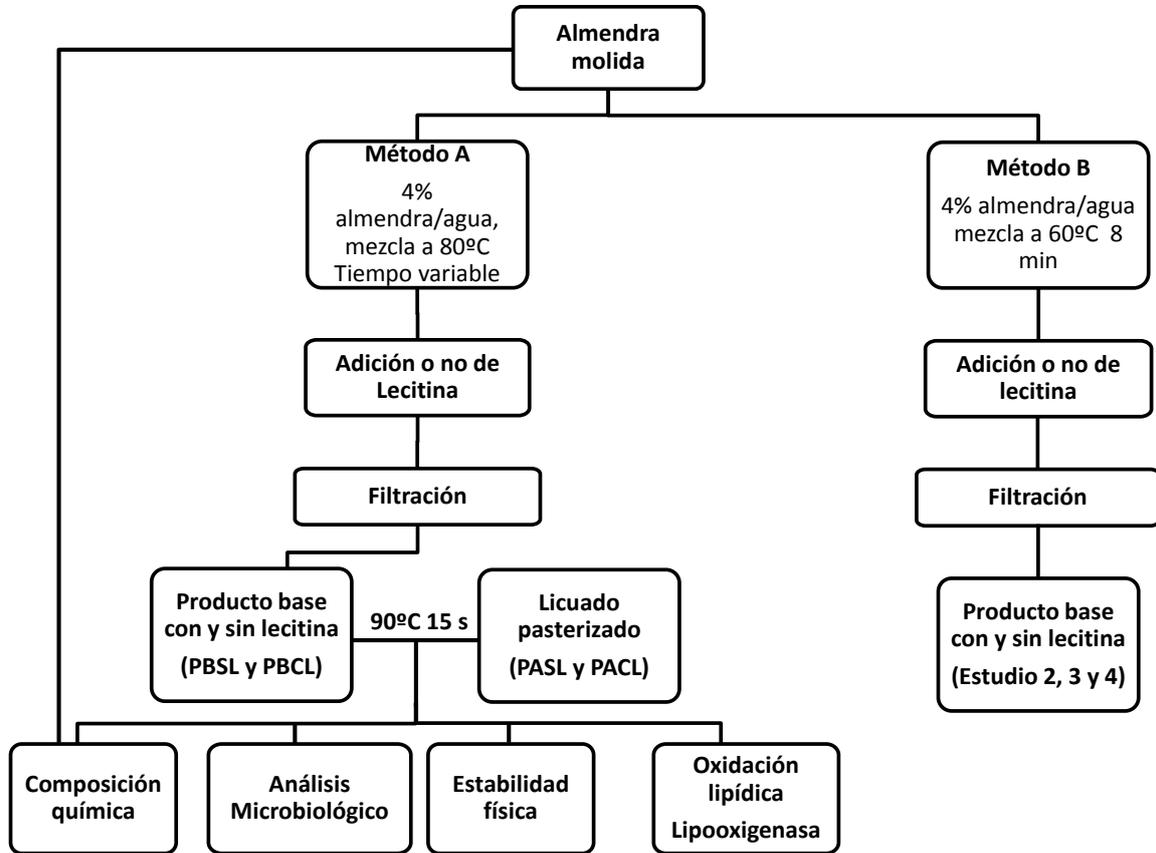


Figura 2.1 Plan de trabajo del Estudio 1: establecimiento y optimización del proceso de elaboración de la bebida de almendra. Estudio preliminar del efecto de la pasteurización.

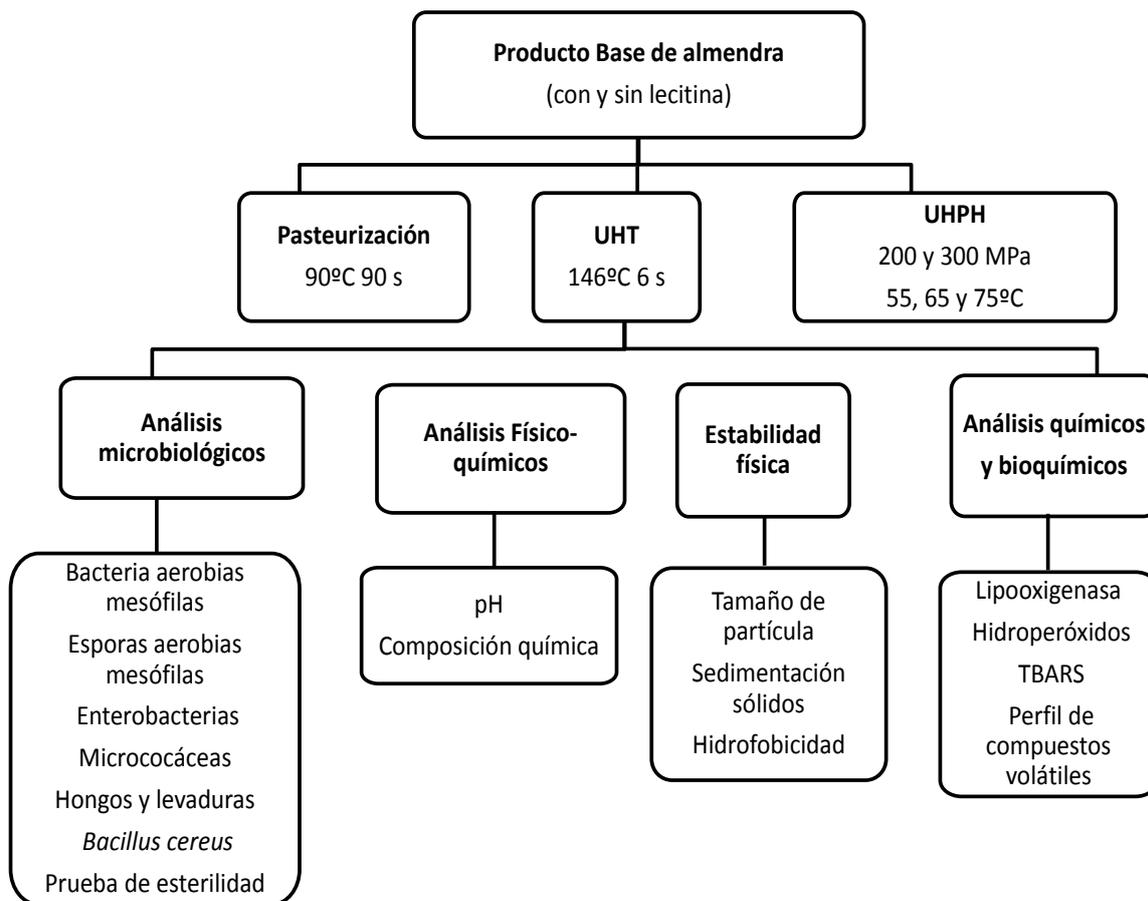


Figura 2.2 Plan de trabajo del Estudio 2: prospección de diferentes condiciones de tratamiento UHPH.

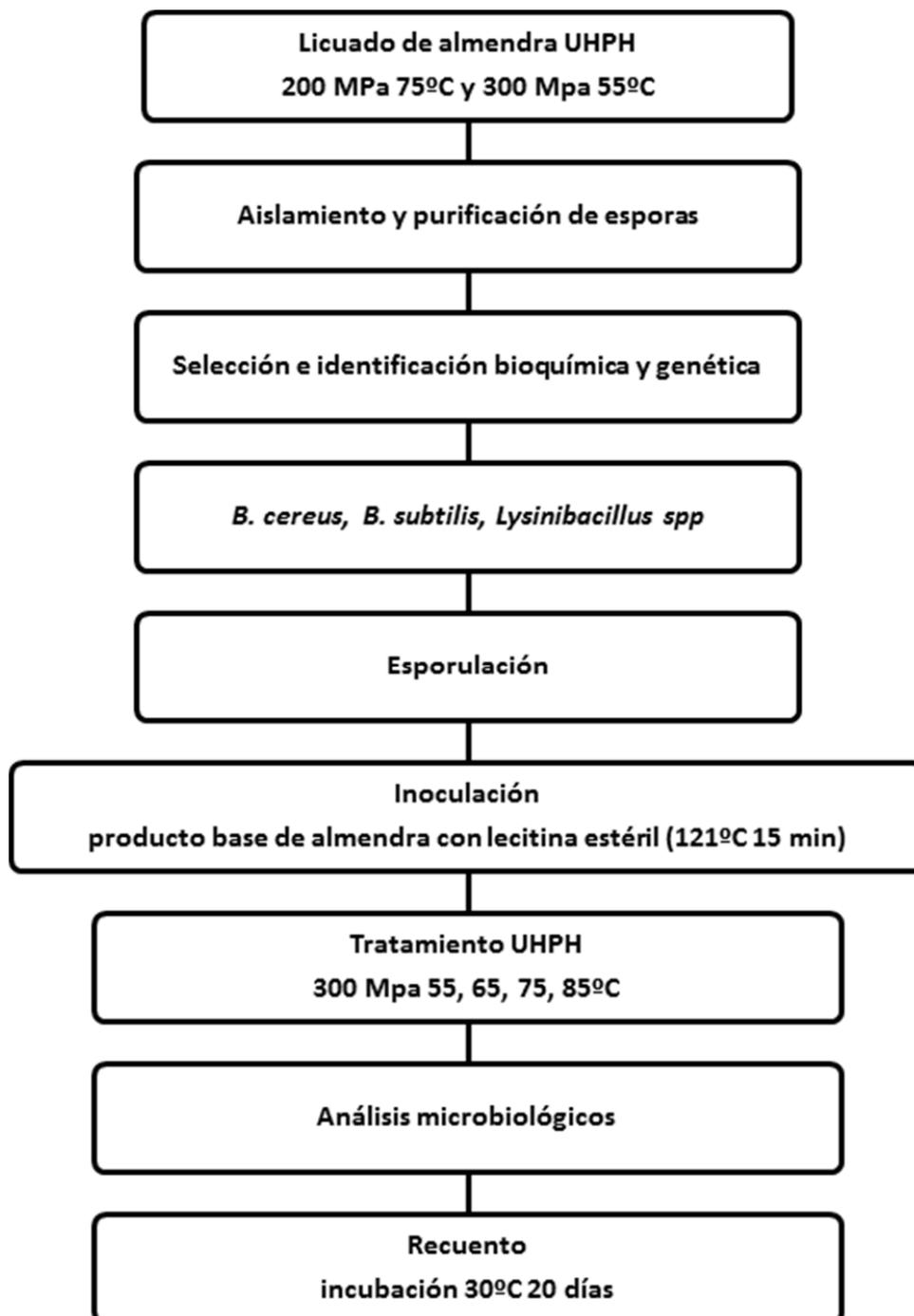


Figura 2.3 Plan de trabajo del Estudio 3: Aislamiento e identificación de esporas potencialmente alterantes de la bebida de almendras y evaluación de la letalidad mediante UHPH.

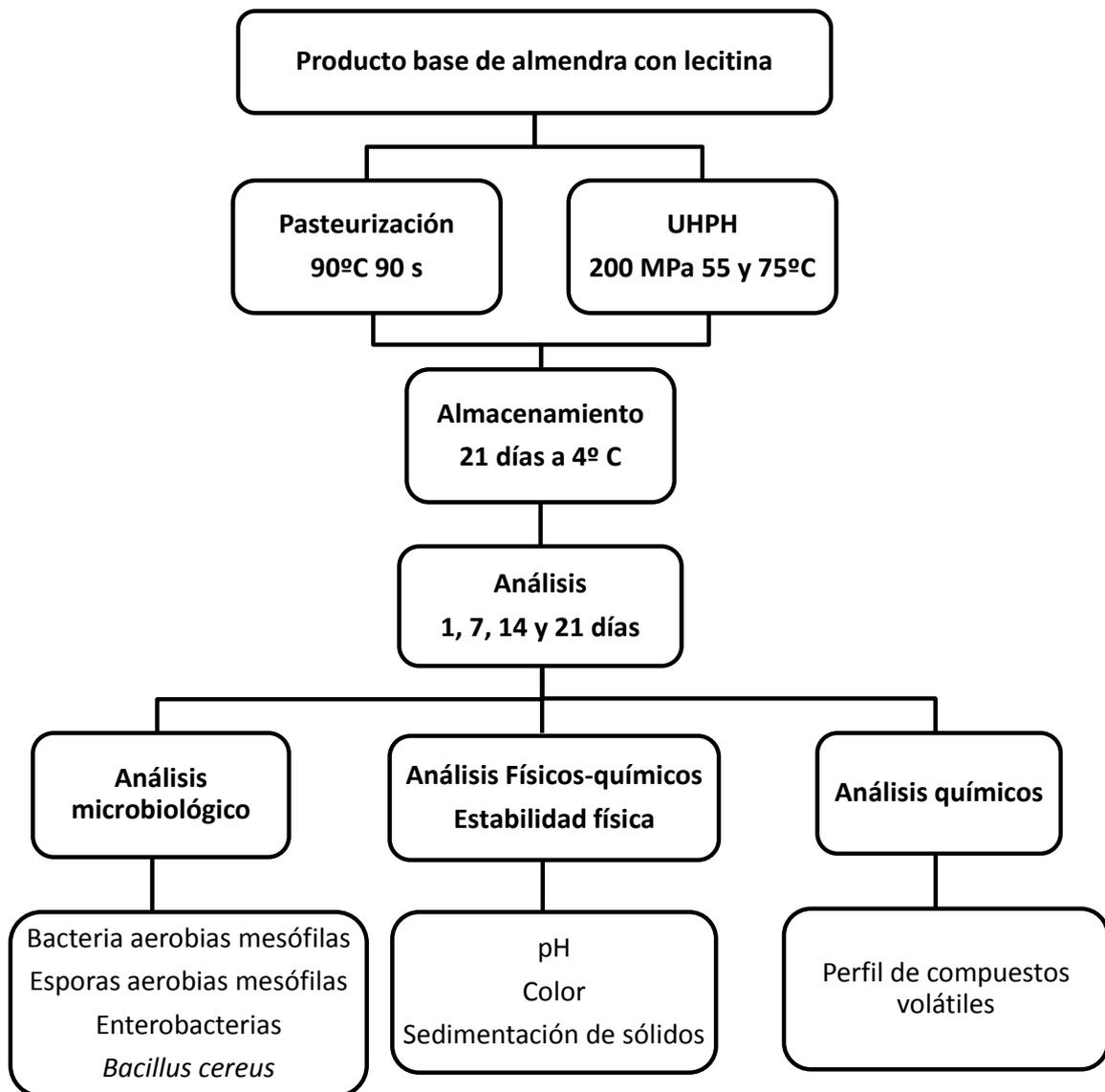


Figura 2.4 Plan de trabajo del Estudio: valoración de los tratamientos UHPH seleccionados para producir un licuado o bebida de almendras de almacenamiento en refrigeración.

CAPITULO III: Materiales y Métodos

3.1 Elaboración de la bebida de almendra

Con el objetivo de minimizar la contaminación de la bebida de almendra, antes de cada tratamiento, todos los equipos utilizados se desinfectaron haciendo circular una mezcla diluida al 0,1%, de una solución con 20 % de ácido peracético y peróxido de hidrógeno, en una relación de 10:1, respectivamente (P3-Oxonia Active, Ecolab Hispanic portuguese, Barcelona, Spain), por 15 min a 30 °C.

Método A (Estudio 1). Se utilizó semilla de almendra molida (Marcona) proporcionada por Nectina, S. A. (Ruidoms, Tarragona, España) para preparar la bebida de almendra. El 4 % (p/p) de almendra molida en agua a 80 °C se mezcló en un tanque, circulando en un molino coloidal (E. Bachiller, B. S. A. Barcelona, España), posteriormente la mezcla se filtró para separar la fase líquida usando una malla de acero de 0.100 mm. La fase líquida fue considerada como producto base (PBSL). Un procedimiento similar fue realizado para obtener bebida de almendra con lecitina (PBCL), en la cual se agregó 0.03% (p/p) de lecitina (ADM Non-GMO Soy Lecithin Product, Decatur, IL, Sabadell, España) al tanque, durante el proceso de mezclado.

Método B (los demás estudios). Utilizando la misma variedad de almendra descrita en el método A, la elaboración de la bebida de almendra fue la misma con algunas modificaciones que consistieron en disminuir la temperatura de la mezcla a 60 °C y se definieron los tiempos tanto de mezclado (8 min) como de recirculación (12 min). La lecitina se agregó en la misma proporción al inicio del mezclado.

3.1.1 Tratamientos de la bebida de almendra: UHPH, Pasteurización y UHT

Para la evaluación del efecto de la UHPH en el licuado de almendra, se utilizaron dos prototipos: el UHPH A para el estudio desarrollado en los capítulos 4.1, 4.2 y 4.4, y el UHPH B en el estudio del capítulo 4.3.

UHPH A. Los tratamientos UHPH se realizaron con un homogeneizador de alta presión (model FPG11300. Stansted Fluid Power Ltd., Essex, UK). El equipo trabaja a un caudal de 120 L/h, consta de dos intensificadores impulsados por una bomba hidráulica y una válvula de alta presión de cerámica capaz de soportar 400 MPa. Las temperaturas de entrada y salida de la bebida de almendra se controlaron mediante dos intercambiadores de

calor (Garvía, Barcelona, Spain) colocados antes de la entrada al equipo UHPH y después la válvula de alta presión, respectivamente. Mediante sondas se monitorizó la temperatura de entrada, la temperatura después de la válvula de alta presión y la temperatura de salida y la presión.

UHPH B. Homogeneizador de ultra alta presión Benchtop (model: FPG12500 Stansted Fluid Power Ltd., UK). Este equipo trabaja a un caudal de 15 L/h, consta de dos intensificadores, accionados por una bomba hidráulica, y una válvula cerámica de alta presión capaz de soportar hasta 400 MPa. La temperatura inicial se controló utilizando un intercambiador incluido en un baño de agua caliente localizado antes de la entrada a la máquina y la temperatura final mediante otro intercambiador de calor, localizado después de la válvula de alta presión. Mediante sondas, se monitorizaron la temperatura de entrada, la temperatura después de la válvula de alta presión, la temperatura de salida y la presión. Los tratamientos UHPH a 300 MPa y temperaturas de entrada a 55, 65, 75 y 85 °C se aplicaron para determinar la letalidad del tratamiento sobre cepas de esporas de *Bacillus* en la bebida de almendra.

Todas las muestras tratadas por UHPH se recogieron en recipientes estériles en condiciones higiénicas en campana de flujo laminar.

Pasteurización. Este tratamiento se llevó a cabo en un cambiador de calor tubular de haces múltiples (Finamat heat exchanger, Model 6500/010. Gea Finnah GmbH, Anhaus, Alemania) a 90 °C, 15 s (Estudio 1) o 90 s (restantes estudios de esta tesis), previa homogeneización a 18 MPa (LAB tipo: 22.51. Rannie, Denmark).

UHT. El producto base se homogenizó en dos etapas (18 y 4 MPa) en un homogeneizador (Niro Soavi, Model X68P, Parma, Italia) previo al tratamiento UHT (142 °C, 6 s) equipado con un sistema indirecto (6500/010. GEA Finnah GmbH Ahaus, Germany).

3.1.2 Almacenamiento y conservación de los licuados en todos los estudios o etapas

Los análisis microbiológicos se realizaron el mismo día del tratamiento. Las muestras para los análisis de estabilidad física y pH se almacenaron en refrigeración. Para el resto de análisis, los licuados de almendra se congelaron a -20 °C o -80 °C hasta el momento del análisis.

En la estudio 4, las muestras se recogieron higiénicamente en 5 diferentes frascos (por duplicado) de 100 mL, se conservaron a 4 °C y se realizaron los análisis correspondientes los días: 1, 7, 14, 21 y 28.

3.2 Composición química de la almendra y la bebida de almendra

El contenido de la **grasa** de la semilla de almendra y la bebida de almendra se determinaron mediante extracción acelerada de solventes con un equipo ASE 200 (Sunnyvale, USA). Para semillas de almendra se utilizaron 2 g de almendra molida que fue mezclada con tierra diatomeas. La mezcla se transfirió a una célula de extracción de 11 mL. Se aplicaron 3 ciclos de 10 min a 105 °C y 1500 psi. Se utilizó éter de petróleo como disolvente con la subsecuente evaporación con nitrógeno. Para la bebida de almendra, se mezclaron 2 g de muestra se con 1.1 g de tierra diatomea y 0,9 g de celita y se transfirieron a las células de extracción de 11 mL. Se aplicaron 3 ciclos de 1 min a 120 °C y 1500 psi. Como disolvente se usó una mezcla de eter de petróleo y 2-propanol en una proporción de 60:40 con la subsecuente evaporación con nitrógeno. El contenido de **nitrógeno total** se realizó en el Estudio 1 usando el método Kjeldahl (IDF, 2002), y en el resto de estudios el método Dumas (IDF, 2002). El contenido de **humedad** y las **cenizas** se analizaron según el método AOAC (2000). Los **carbohidratos** se estimaron por diferencia (Pearson, 1976) y el **pH** de la bebida de almendra se midió usando un pHmetro Crison (modelo MicropH2001 Crison, Barcelona, Spain). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.3 Análisis microbiológicos

Este apartado se ha dividido por una parte en los parámetros relacionados con la calidad microbiana del producto base y las bebidas de almendra tratadas, y por otra parte con el estudio de inactivación de las esporas inoculadas en bebida de almendra estéril.

3.3.1 Calidad microbiológica

La calidad microbiológica de la bebida de almendra se evaluó mediante la enumeración de los siguientes microorganismos: recuento total de bacterias aerobias mesófilas en medio PCA (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) y se incubó por 48 h a 30 °C; recuento de esporas aerobias mesófilas para el que se realizó inicialmente un shock térmico a 80 °C por

10 min, se enfrió rápidamente en hielo, y después se sembró en medio PCA (Oxoid) y se incubó por 48 h a 30 °C; enterobacterias en medio glucosa-agar bilis de rojo violeta (VRBG, Oxoid), incubadas a 37 °C durante 24 h; hongos y levaduras en medio de rosa de bengala con cloramfenicol (Oxoid), incubadas a 25 °C por 5 días; micrococáceas en medio manitol salt-agar (MSA, Oxoid), incubadas a 30 °C por 3 días; *Bacillus cereus* en medio de *Bacillus cereus* brilliant (Oxoid) con adición del suplemento selectivo para *Bacillus cereus* (Oxoid) e incubado a 30 °C por 48 h.

Prueba de esterilidad. Los frascos con 100 ml de bebida de almendra tratada por UHPH y UHT se incubaron a 30 °C por 20 días. Durante este periodo, se observó si presentaban coagulación y/o separación de fases, realizando además el recuento de bacterias aerobias mesófilas en medio PCA. Los análisis se realizaron por triplicado en cada uno de los tratamientos aplicados.

3.3.2 Aislamiento, identificación y selección de esporas UHPH resistentes

El aislamiento de colonias se realizó de las muestras de bebida de almendra tratadas a 200 MPa 75 °C y 300 MPa 55 °C, que tras su incubación a 30 °C durante 20 días mostraron crecimiento bacteriano. Visualmente y en función de su morfología, se seleccionaron de 1 a 5 colonias crecidas en el medio PCA, se sembraron en agar tripticasa soja (TSA) y se incubaron a 30 °C por 24 h para su purificación. De las colonias más diferenciadas se realizó de nuevo el aislamiento en el mismo medio, hasta conseguir la purificación del cultivo, conservándolas hasta su identificación en tubos inclinados con TSA a 4 °C. Para su identificación se realizaron pruebas bioquímicas, utilizando un el test API 50 CHB (*bioMérieux*, Marcy l'Etoile, Francia) y, tras seleccionar tres cepas diferenciadas se realizó la identificación genética. A partir de los cultivos puros obtenidos se procedió a la extracción del DNA con el kit comercial DNeasy Tissue and Blood (Qiagen, Valencia, EEUU), siguiendo los protocolos especificados por el fabricante. Posteriormente, se realizó la amplificación de un fragmento de DNA del gen 16S rDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo la metodología convencional. Tras la amplificación, el contenido de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% tras tinción con bromuro de etidio. Finalmente, se realizó la captación de las imágenes. Los productos de PCR se secuenciaron (Macrogen Inc, Korea). Por último, se analizaron las secuencias

obtenidas utilizando el método Clustal de MegAlign con el paquete informático DNASTAR (DNASStar Inc., EEUU) y at the National Center for Biotechnology Information y las bases de datos del National Center for Biotechnology Information.

3.3.3 Condiciones de esporulación

La esporulación de todos los grupos de bacterias seleccionados se realizaron siguiendo el método estándar UNE-EN-13704 (Anonimo. 2002). Se preparó una suspensión de esporas a partir de un cultivo en fase exponencial de las formas vegetativas en un caldo de glucosa-triptona (TGB) (0,25 % de extracto de levadura; 0,5 % de triptona; 0,1 % de glucosa y pH ajustado a 7,2). Entre 2-3 mL de este cultivo se adicionó ó a frascos Roux que contenían agar de extracto de levadura-carne (MYA) (1% de extracto de carne; 0,2 % de extracto de levadura; 0,004 % $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,5 % de agar y pH ajustado a 7,2) y se incubó entre 8 y 10 días a 30 °C hasta conseguir el 97 % de esporulación, que se observó mediante microscopio de contraste de fase. Las esporas se recuperaron con agua estéril realizándose 4 lavados mediante centrifugación a 10000 g por 20 min. Para inactivar las células vegetativas las suspensiones se trataron a 75 °C durante 30 min. Finalmente, las esporas se almacenaron en agua destilada estéril a 4 °C hasta su utilización, aunque previamente se realizó su recuento en agar de levadura glucosa (GYA), (0,1 % de amino ácidos cas sin vitaminas; 0,1 % de almidón soluble; 0,25 % de glucosa; extracto de levadura al 0,5 %; 0,01 de Fe SO_4 ; 0,00001 % de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,5 % de agar y pH ajustado a 6,8) que se incubó a 30 °C por 72 h.

3.3.4 Inoculación y recuperación de las esporas

Para el estudio de inoculación se adicionó entre 10 y 20 mL de la suspensión de esporas con un recuento entre 7 y 8 log ufg/mL en 1 litro de bebida de almendra con lecitina que previamente se esterilizó a 120 °C 15 minutos. Tras la aplicación de los tratamientos UHPH a 300 MPa y con una temperatura de entrada de 55, 65, 75 y 75 °C se cuantificó el número de esporas utilizando el medio GYA que se incubó a 30 °C durante 72 h. La letalidad se calculó por la diferencia entre el logaritmo de la cuenta de colonias de la muestra no tratada (N_0) y las muestras tratadas por UHPH (300 MPa, 55, 65, 75 y 85 °C) (N), ($\log N_0 - \log N$). Además, de cada uno de los tratamientos se tomaron asépticamente 50 mL de bebida de almendra tratada y se incubaron a 30 °C por 10 días, para verificar la completa inactivación

de las esporas. Durante este periodo, se observó si había crecimiento y si presentaban coagulación y/o separación de fases. En este estudio se realizaron tres producciones de cada microorganismo y de cada producción se realizó análisis por triplicado.

3.4 Análisis de tamaño de Partículas

La distribución de tamaño de partículas se determinó utilizando un difractómetro láser Beckman Coluter (Serie LSTM13 320, Beckman Coulter Inc, Fullerton, EEUU) que permite la medida del tamaño de partícula en un intervalo entre 0,04 y 2000 μm . Las muestras se diluyeron en una proporción 1:50 en agua destilada hasta para obtener una obscuración entre 2-7% en la celda de difracción. Para calcular el tamaño de partícula, se empleó un modelo óptico basado en la teoría de Mier sobre dispersión de partículas esféricas con las siguientes condiciones: índice de refracción real de la bebida de almendra 1.340, el correspondiente al agua 1,332. La distribución de tamaño de partículas se caracterizó a través del diámetro Sauter $D_{3,2}$ (valor medio del tamaño de las partículas en términos de superficie) y de los valores del parámetro $D_{4,3}$ (valor medio del tamaño de las partículas en términos de volumen).

3.5 Sedimentación de partículas sólidas por centrifugación

A las muestras se les adicionó inicialmente un 0,04 % de azida sódica (NaN_3) como conservante. Para evaluar la sedimentación de partículas sólidas se colocaron 30 g de bebida de almendra en tubos plásticos flexibles (32 mm de diámetro, 115 mm de largo) y se sometieron a centrifugación (1000 g, 45 min, 20 °C) en una centrífuga (Centrifuge Sigma 4K15, Postfch, Germany). Después de eliminar la fase líquida los tubos se pesaron y los resultados se expresaron como % (p/p) de depósitos sólidos. La estabilidad física de la bebida de almendra se midió en el día uno y quince después del procesamiento en los estudios 1 y 2. En el estudio 4, esta medida se realizó en los días 1, 7, 14, 21 y 28, después de realizar los tratamientos correspondientes. Los análisis se realizaron por triplicado.

3.6 Evaluación del color

El color de las bebidas de almendra se determinó usando un colorímetro Hunter Lab (MiniScan XETM, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, Virginia, USA). Se utilizó el

iluminante D₆₅ con un ángulo de observación de 10° usando un juego de anillo y disco para líquidos translucidos colocados en cubeta de vidrio (Hunter Lab, 2008) que permitió estandarizar el procedimiento de exposición de la muestra para la medida. El conjunto se cubrió con un capuchón negro especialmente dispuesto por el fabricante para evitar la transmisión de luz ambiente a través de la muestra durante la medida. Se obtuvieron las coordenadas de color CIElab, L* (luminosidad), a* (rojo-verde) y b* (azul-amarillo). Éstas coordenadas se utilizaron para calcular el tono, la pureza de color y la diferencia de color, utilizando las siguientes formulas:

Tono

$$h^* = \arctan \frac{b^*}{a^*}$$

Pureza de color

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Diferencia de color

$$\Delta E (\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}).$$

3.7 Hidrofobicidad de las proteínas

La hidrofobicidad de las proteínas de las bebidas de almendra se midió usando como reactivo 8-anilino-1-naftaleno de ácido sulfónico (ANS) (Shimoyamada *et al.*, 2008). Previamente, las muestras (50 µL) de bebida de almendra fueron descongeladas en baño de agua a 30 °C y se agitaron suavemente durante 20 segundos, se diluyeron con (50 µL) de tampón fosfato 0,01 M (pH 7,0) y se mezclaron con 20 µL de solución ANS (8 mM) y 4 mL del mismo tampón. Las mezclas resultantes fueron sometidas a espectrometría de fluorescencia (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, software: Cary Eclipse 1.1) midiendo la emisión a 420 nm tras la excitación a 390 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado en todas las muestras. Este análisis fue llevado a cabo el día 1 después de la producción.

3.8 Evaluación de la oxidación lipídica

3.8.1 Determinación de la actividad lipooxigenasa (LOX)

La extracción de la actividad LOX se realizó siguiendo el método descrito por Van der Ven *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Se depositaron 30 mL de bebida de almendra en un tubo de polipropileno (3,2 mm de diámetro y 115 mm de largo) para proceder a la centrifugación durante 60 min a 12000 g y 4 °C en una centrífuga (Centrifuge Sigma 4K15, Postfach, Germany). El sobrenadante se utilizó para el análisis de la actividad enzimática.

El ensayo de la actividad LOX se desarrolló siguiendo el método descrito por Axerold *et al.* (1981). La reacción se realizó a 25 °C adicionando a una cubeta de cuarzo de 1,0 cm, 2,975 mL de tampón borato (pH 9), 0,025 mL de sustrato de linoleato de sodio 10 mM, y 0,030 mL del extracto de LOX (enzima), agitando la mezcla en cada adición. La cubeta del blanco no contenía el extracto enzimático LOX. Se realizó la lectura continua de la absorbancia a 234 nm en el espectrofotómetro (Cecil 900, RU). La actividad LOX se expresó en unidades de actividad lipooxigenasas (UAL), que se definió como el cambio en 0,1 unidades de absorbancia por minuto del extracto enzimático.

3.8.2 Determinación del índice de hidroperóxidos

Los productos de la oxidación primaria en la bebida de almendra se analizaron determinando el contenido en hidroperóxidos por el método basado en la reacción de oxidación del ión ferroso a férrico por los hidroperóxidos en presencia de tiocianato de amonio para producir tiocianato férrico, donde la absorbancia se detectó a 500 nm, como esta descrito por Ostdal *et al.*, (2000) con algunas modificaciones. Se mezclaron 2 mL de bebida de almendra, 2 mL de metanol y 4 mL de cloroformo, durante 30 s aproximadamente. Después de centrifugar (Centrifuge Sigma 4K15, Postfach, Germany) a 12000 g, durante 10 min a 20 °C, se transfirió 1 mL de la fase clorofórmica a un tubo de ensayo al que se le añadió 1 mL de tiocianato de hierro (II) preparado en una solución de metanol/cloroformo (1:1). La mezcla se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente, midiéndose la absorbancia a 500 nm. La curva de calibración se preparó de acuerdo con la metodología descrita (IDF, 1991). La medida está basada en la lectura espectrofotométrica a 500 nm de una serie de diluciones que contienen Fe³⁺ en

cloroformo/metanol (70/30). Los datos se expresaron como meq de peróxido/mL de muestra como se describió por Hornero-Méndez *et al.* (2001), en función de la siguiente ecuación.

$$meq / L = \frac{(As - Ab)}{55.84 \times 2 \times m \times Vs}$$

Donde *As* es la absorbancia de la muestra, *Ab* es la absorbancia del blanco; 55,84 es el peso atómico del Fe; 2 es el factor para convertir miliequivalentes (meq) de Fe a meq de peróxido; *m* es la pendiente de la curva de calibración del Fe³⁺; *Vs* es el volumen de muestra en L. Debido a los bajos valores obtenidos en éste análisis, los resultados se convirtieron a meq/ mL.

3.8.3 Determinación del índice TBARS

La oxidación secundaria se realizó siguiendo el procedimiento de Fenaille *et al.* (2001). Se adicionó en un tubo pirex 3 mL de muestra, 2,4 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma aldrich, St Louis, USA) al 1% en ácido tricloroacético (Sigma aldrich, St Louis, USA) al 5 % y 2,4 mL de butilhidroxitolueno (Sigma aldrich, St Louis, USA) al 0,8 % en etanol. La mezcla se centrifugó (Sigma Model 4K 15, Postfach, Germany) a 2700 g, durante 5 min, a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de papel Watman N° 1 recogiénose en tubos que se mantuvieron en baño de agua a 70 °C durante 1 h. De la misma manera se preparó un blanco sin adicionarle la muestra.

Después de enfriar los tubos bajo chorro de agua fría, se midió la absorbancia usando un espectrofotómetro CECIL 9000 (CECIL Instrument, Cambridge, United Kingdom). Se obtuvo la tercera derivada del espectro de disoluciones de MDA-TBA, que fueron registradas en el intervalo 400-650 nm a una velocidad de de 240 nm/min frente al blanco. La medida de la altura de los picos se realizó a 521,5 nm. En este análisis, el reactivo TBA, aparte de reaccionar con malonaldehído (MDA), reacciona con otras sustancias como cetonas, cetoésteres, ácidos, proteínas oxidadas, etc., por lo que el ensayo se denomina TBARS (análisis de las sustancias que reaccionan con el TBA). La concentración de estos compuestos en las bebidas de almendra se determinó utilizando una curva de calibración externa con diferentes concentraciones de MDA (µg MDA/mL de bebida de almendra).

La curva patrón se preparó según el procedimiento de Botsoglou *et al.* (1994). Se pesó 72,2 µg de 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano (TEP), que se vertieron en un tubo de ensayo, para posteriormente diluirse con 10 mL de HCl 0,1 N. Se sumergió el tubo en agua a ebullición durante 2 min para hidrolizar el TEP.

Preparación de la solución madre de MDA (239 µg/mL). Se aforó el TEP hidrolizado con agua destilada a un volumen de 100 mL. A continuación, se transfirió 1 mL de solución madre de MDA a un matraz y se aforó con agua destilada a 100 mL, a partir de la cual se preparó la solución de trabajo de 2,39 µg/mL, con la que se realizaron diluciones para preparar la curva patrón.

3.8.4 Análisis del perfil de compuestos volátiles

Para la extracción de la fracción volátil se utilizó el sistema de microextracción en fase sólida (SPME) utilizando el método descrito por Pérez-González *et al.* (2014).

SPME – Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

La fibra utilizada fue la 23GA Stableflex™ de 2 cm de largo y 50/30 µm Divinylbenzene/Carboxen™/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (SUPELCO, Belafonte, EEUU). La extracción de los compuestos volátiles se realizó con 2 mL de bebida de almendra en niveles saturados de NaCl (0,8 g). Con una jeringa para gases Hamilton® de 10 µL, se adicionó a la muestra el 3 µL de 3,4-dimethylphenol (500 mg/L) que se utilizó como estándar interno. Los viales se sellaron con un tapón de aluminio que contenía un *septum* de silicona black Viton®. Las muestras se incubaron a una temperatura de 60 °C durante 60 min en agitación continua a 700 rpm para alcanzar el equilibrio.

Para la adsorción de los volátiles, la fibra fue insertada en el vial a una longitud de 1,5 cm en el vial atravesando la tapa de silicona y manteniéndola durante 60 min. Después de este tiempo la fibra se retiró del vial ajustándola a 3 cm para proceder a inyectarla en el cromatógrafo de gases. Después de cada inyección la fibra se limpió durante 10 min a 250 °C.

Identificación de compuestos. El análisis de cromatografía de gases de los compuestos absorbidos en la fibra (GC-MS) se realizó con una columna capilar de 60 m x 0.251 mm de

diámetro interno con una capa de espesor de 0,25 μm (J & W HP-INNOWAX). La identificación de los volátiles de la bebida de almendra se obtuvo utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado con un detector selectivo de masa (Agilent Technologies, PA, CA). La desorción de los volátiles de la fibra se realizó a 250 °C durante 3 min trabajando con el inyector en modo *splitless*. Se utilizó helio como gas de transporte a una velocidad de 25,641 cm/s. La temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante 5 min, la rampa de temperaturas fue de 10 °C/min hasta alcanzar 220 °C, manteniendo esta última temperatura durante 10 min. La identificación de los compuestos volátiles se realizó por comparación de: (1) los espectros de masa de los picos en tiempo y retención con las bibliotecas McLafferty (2000); (2) cálculo del índice de retención de Kovats de los compuestos encontrados en la literatura, y, (3) disponibilidad de los estándares químicos. La cuantificación se realizó mediante la utilización de un estándar interno.

3.9 Análisis estadístico

Todos los resultados son la media de tres producciones individuales de bebida de almendras realizadas en la planta piloto. Cada análisis fue realizado por triplicado, excepto en la determinación de volátiles en donde se determinó la media de dos producciones, por duplicado.

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA) y el método de Student's-Newman-Keuls para comparación de medias, utilizando el paquete estadístico SAS 9, 1. 3.

Las diferencias de todos los análisis estadísticos, fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

CAPITULO IV: Resultados y Discusión

4.1 Optimización de la elaboración de un licuado de almendra

4.1.1 Composición química

En la producción de la bebida de almendra, se utilizó almendra cruda molida al 4% para alcanzar valores de composición del licuado similares a las que comúnmente se encuentran en el mercado. La composición (% p/p) de la almendra cruda fue la siguiente: 94.95 ± 0.21 de extracto seco total; 20.39 ± 0.23 de proteína; 56.76 ± 0.98 de lípidos totales; 5.03 ± 0.08 de cenizas y 12.73 ± 0.05 de carbohidatos calculados por diferencia de los otros componentes. Estos resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Agumbiade *et al.*, (2006). Los valores promedio de composición de los licuados de almendra se muestran en la Tabla 4.1.

En este estudio de optimización, los licuados de almendra, fueron elaborados con la adición de lecitina (0.03%) y sin lecitina, obteniendo un total de cuatro licuados de almendra que correspondieron a: un producto base crudo con lecitina (PBCL), un producto base crudo sin lecitina (PBSL), un producto pasteurizado (90 °C, 15 s) con lecitina (PACL) y un producto pasteurizado sin lecitina (PASL). La lecitina se agregó con el propósito de valorar su funcionalidad como emulgente para mejorar la estabilidad en la bebida de almendra, dado que el bajo contenido de proteína en el licuado (aproximadamente 1%) podría comprometer la estabilidad de la emulsión a medio y largo plazo. La lecitina actúa como emulsionante, mejorando la estabilidad al reducir la tensión interfacial de aceite-agua y al formar una capa protectora alrededor de las gotas de grasa (Guzey y McClements, 2006a).

Tabla 4.1. Valores medios (% p/p \pm desviación estándar) de la composición química de licuados de almendra.

	PBSL	PBCL	PASL	PACL
Materia seca	3.51 ± 0.22^a	3.88 ± 0.04^a	3.36 ± 0.15^c	3.54 ± 0.05^b
Lípidos	1.82 ± 0.11^b	2.19 ± 0.18^a	1.06 ± 0.13^d	1.49 ± 0.19^c
Proteína	0.90 ± 0.01^b	0.93 ± 0.01^a	0.80 ± 0.04^c	0.87 ± 0.02^b
Cenizas	0.11 ± 0.01^c	0.20 ± 0.01^a	0.09 ± 0.02^c	0.17 ± 0.01^b
Glúcidos	0.68 ± 0.03^c	0.56 ± 0.01^d	1.41 ± 0.02^a	1.01 ± 0.05^b

a-c Los valores con diferentes letra en la misma fila son significativamente diferentes, $p < 0.05$.

PBSL, PBCL, PASL y PACL (Producto base sin lecitina, producto base con lecitina, producto pasteurizado sin lecitina y producto pasteurizado con lecitina, respectivamente).

Como se puede observar en la tabla anterior, la adición de lecitina afectó en la composición química de la bebida de almendra, específicamente aumentó el contenido de grasa, proteína y cenizas y, en consecuencia, se produjo un incremento en los valores del contenido de materia seca. Estos resultados observados fueron similares a los obtenidos por Abbassy *et al.*, (2004). Los valores obtenidos se pueden explicar debido a que la lecitina contiene un grupo colina por molécula ($C_5H_{14}N$), por lo que los resultados son congruentes con el ligero incremento observado en el análisis de proteína, debido al método analítico de determinación basado en la cuantificación de nitrógeno. En relación al incremento del contenido lipídico en los licuados con lecitina, cabe mencionar que la lecitina es extraída por los disolventes orgánicos utilizados junto con el resto de componentes lipídicos en el análisis del contenido en materia grasa. Por otra parte, también se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de lípidos y proteínas en los licuados tratados térmicamente, presentando éstos siempre valores más bajos. Probablemente estos resultados se debieron a la manipulación del producto durante su procesado. El menor contenido en grasa puede ser debido a que previamente al proceso de pasteurización se produjo un cierto grado de cremado en el tanque de mezcla. Por otra parte, el menor contenido en proteína puede deberse a una insolubilización parcial de la proteína que quedaría retenida en el residuo filtrado durante la preparación previa del licuado pasteurizador.

4.1.2 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos, permitieron establecer la calidad higiénica, tanto del producto crudo como del producto pasteurizado para continuar con los posteriores objetivos de la tesis de estudio del efecto de la UHPH.

Los productos de almendra habitualmente están muy contaminados, especialmente por microorganismos de los géneros *Enterobacteriaceae*, *Micrococaceae* y *Bacillaceae* (La Rosa *et al.*, 2000), y así se refleja en los resultados del licuado de almendras sin pasteurizar (Table 4.2).

En la tabla 4.2, se muestra el efecto de la pasteurización en la reducción de la población microbiana, que fue en el caso de los microorganismos aerobios mesófilos de de 2.22 y 2.40 log ufc/mL en PASL y PACL, respectivamente, quedando constituida la microbiota de

los productos pasteurizados por bacterias esporuladas, incluyendo a *B.cereus*, cuyo recuento también disminuyó por efecto de la temperatura alrededor de 1.7-1.8 unidades logarítmicas. Su persistencia se explica por su elevada resistencia a la exposición de temperaturas altas (Prescott, 1993). Sin embargo, en el caso de las enterobacterias y de los hongos y levaduras el tratamiento de pasteurización en ambos licuados fue efectivo, con recuentos por debajo del límite de detección. En otras investigaciones realizadas con almendra, ya se determinó la efectividad de aplicar altas temperaturas tiempos cortos en la reducción de 5 unidades logarítmicas, en un microorganismo frecuentemente aislado en este alimento, *Salmonella* Enteritidis PT30 (La Rosa *et al.*, 2000), así como las esporas fúngicas de *Aspergillus flavus* (Faid *et al.*, 1995).

Tabla 4.2. Recuentos microbianos (log ufc/mL) de las bebidas de almendra

	Recuentos aerobios mesófilos	Esporas aerobias mesófilas	Hongos y levaduras	Enterobacterias	Micrococos	<i>Bacillus cereus</i>
PBSL	6.98±0.02	5.94±0.02	6.80±0.04	6.95±0.04	6.30±0.06	5.66±0.04
PASL	4.76±0.01	3.63±0.06	ND ^a	ND ^a	3.66±0.04	3.81±0.04
Reducción	2,22	2.31	6.80	6.85	3.64	1.85
PBCL	6.9±0.09	3.31±0.05	3.09±0.10	4.10±0.04	5.31±0.05	5.17±0.09
PACL	3.89±0.02	2.34±0.04	ND ^a	ND ^a	2.18±0.12	3.44±0.21
Reducción	2.40	0.97	3.09	4.10	3.13	1.73

ND: No detectada

PBSL, PASL, PBCL y PACL (Producto base sin lecitina, producto pasteurizado sin lecitina, Producto base con lecitina y Producto pasteurizado con lecitina).

4.1.3 Estabilidad física

La estabilidad física de las bebidas de almendra se determinó en porcentaje (p/p) del total de los sólidos sedimentados después de centrifugar las muestras, las cuales se almacenaron previamente a 37 y 4 °C, con un conservante, la azida sódica, para prevenir la coagulación del producto durante el almacenamiento. Las determinaciones fueron realizadas los días 2 y 7 después del tratamiento. Valores altos de éste parámetro indican una baja estabilidad

como resultado de la sedimentación de partículas, además la percepción sensorial granulosa afecta negativamente la calidad del producto.

Después de 7 días de almacenamiento de las muestras, aquellas sin lecitina (PBSL y PASL), tanto a 37 como a 4 °C, presentaron sedimentación espontánea (Tabla 4.3), mientras que los licuados con lecitina se mantuvieron en buen estado de dispersión. En general, los licuados de almendra no pasteurizados sin lecitina (PBSL) mostraron valores más elevados de sólidos sedimentados que el resto de licuados. Por un lado se apreció que el proceso de pasteurización en la que hay una homogeneización previa, mejoró la estabilidad del licuado, aumentando ésta cuando se adicionó lecitina, probablemente por el aumento de la dispersión de las partículas como consecuencia de una mejor humectabilidad de las partículas hidrofóbicas de la almendra. En relación al efecto de la temperatura de almacenamiento a 4 y 37 °C se observó que los licuados almacenados a 4 °C mostraron una mayor estabilidad que aquellos almacenados a 37 °C, tanto visualmente como en los valores obtenidos tras la centrifugación.

La lecitina facilitó la formación de emulsiones y mejoró su estabilidad al reducir la tensión interfacial entre aceite-agua y al formar una capa protectora alrededor de las gotas de grasa y de las partículas hidrofóbicas procedentes de la molienda de la almendra.

Tabla 4.3. Valores medios de los sólidos sedimentados (% p/p \pm DE) de las bebidas de almendra.

Temperatura	Tratamiento	PBSL	PBCL	PASL	PACL
37 °C	Día 2	54.16 \pm 0.18 ^a	39.94 \pm 0.05 ^b	35.45 \pm 0.20 ^a	33.79 \pm 0.09 ^a
	Día 7	51.19 \pm 0.21 ^a	37.57 \pm 0.06 ^b	33.89 \pm 0.19 ^c	31.84 \pm 0.14 ^b
4 °C	Día 2	48.32 \pm 0.55 ^a	30.75 \pm 0.07 ^c	33.23 \pm 0.11 ^b	27.78 \pm 0.10 ^c
	Día 7	46.78 \pm 0.18 ^a	30.20 \pm 0.32 ^c	32.12 \pm 0.12 ^b	25.54 \pm 0.22 ^c

a-c: Las letras diferentes en los superíndices de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

PBSL, PASL, PBCL y PACL (Producto base sin lecitina, producto pasteurizado sin lecitina, Producto base con lecitina y Producto pasteurizado con lecitina).

4.1.4 Evaluación de la oxidación lipídica

La bebida de almendra contiene ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico y linolénico, que son susceptibles a la oxidación (Davies y Dean, 1997). A través de la formación de radicales libres se forman productos intermedios, como los hidroperóxidos que son inestables y evolucionan a productos volátiles como aldehídos, ácidos, alcoholes y cetonas que deterioran el aroma de los alimentos.

El desarrollo de este proceso degradativo depende de la composición de ácidos grasos, pero también de factores externos tales como la exposición a la luz, temperatura, oxígeno, iones de metales de transición y la presencia de compuestos pro o antioxidantes que son necesarios para la iniciación de la reacción (Nielsen *et al.*, 2002). Asimismo, la oxidación se puede llevar a cabo por vía enzimática a través de la lipooxidasa (LOX). Ésta puede promover la peroxidación lipídica lenta (Ponqette y Zimmerman 1995), especialmente durante la molturación del grano en el proceso de elaboración (Wilkins *et al.*, 1967).

La aplicación del tratamiento de pasteurización fue suficiente para inactivar el enzima LOX, ya que no se detectó actividad alguna en los licuados (Tabla 4.4). Este resultado coincide con las observaciones de Wang *et al.*, (2008) quienes determinaron que si en el procesado de la bebida de soja, el grano se moltura tras su ebullición durante 10 min, se forman cantidades muy bajas de productos de la oxidación.

A pesar de la inactivación de LOX, se formaron hidroperóxidos (oxidación primaria) y productos secundarios (especies reactivas al TBA) en las bebidas de almendra pasteurizadas (Tabla 4.4). Esto se puede deber a otros catalizadores de la oxidación, especialmente la temperatura pero también el oxígeno, luz etc. que intervendrían como iniciadores durante el procesado de las bebidas de almendra. Sin embargo, los valores correspondientes a la concentración de productos de la oxidación fueron muy reducidos, probablemente porque la almendra contiene sustancias antioxidantes en su composición que ayudarían a minimizar la oxidación lipídica.

En la bibliografía no se han encontrado referencias relacionadas con la oxidación de productos obtenidos a base de almendra. En otros alimentos tales como embutidos curados, jamón seco salado, chorizo y queso el margen aceptable de oxidación lipídica es de 0,1-0,3 mg malonaldehído/Kg (Chizzoloni *et al.*, 1998); en carne de cerdo (chuletas de cerdo,

hígado, salchichas y bacon), se detecta rancidez a niveles de MDA de 0,50 mg/Kg (Sheard *et al.*, 2000), mientras que en alimentos con tendencia a la oxidación extrema, como el pescado azul, los valores no deben exceder los 4 mg MDA/Kg para poder ser aceptados (Bello-Rivas y Gill 1992). Los valores obtenidos de MDA, en la presente investigación, son muy reducidos en relación a los productos anteriormente. Ello se podría explicar, en primer lugar, por la diferencia en el contenido de materia grasa, y en segundo lugar porque la mayoría de los ácidos grasos que contiene la bebida de almendra son ácidos grasos monoinsaturados, pudiendo considerar que los niveles de oxidación de la bebida de almendra son aceptables.

Tabla 4.4. Valores promedio de los parámetros de oxidación de la bebida de almendra.

Parámetros de oxidación	PBSL	PBCL	PASL	PACL
LOX (U/L)*	0.02 ^a	0.02 ^a	ND ^c	ND ^c
TBA (mg MDA/Kg)	(0.05 x 10 ⁻³) ^a	(1.0 x 10 ⁻⁸) ^b	(2.0 x 10 ⁻⁸) ^b	(1.0 x 10 ⁻⁸) ^b
Hidroperóxidos	0.125 ^a	0.118 ^b	0.096 ^c	0.046 ^d

a-d. Las letras diferentes en los superíndices de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

PBSL, PASL, PBCL y PACL (Producto base sin lecitina, producto pasteurizado sin lecitina, Producto base con lecitina y Producto pasteurizado con lecitina).

*Indica la actividad del enzima lipooxigenasa.

4.2 Estudio de las condiciones de tratamiento UHPH en las características de licuados de almendra

4.2.1 Composición química de la almendra y del licuado

La composición (valores medios en % (p/p)) de la almendra de la variedad Marcona, utilizada en este estudio fue la siguiente: 94.95 ± 0.21 de extracto seco; 20.39 ± 0.23 de proteína; 56.76 ± 0.98 de grasa; 5.03 ± 0.08 de cenizas y 12.73 ± 0.05 de carbohidratos. Estos datos fueron similares a los obtenidos por Asalanta *et al.* (2005) y Monaghan (2008). Sin embargo, en la bibliografía se pueden encontrar valores de composición significativamente diferentes, tales como los publicados por Agumbiade *et al.* (2006). La gran variabilidad de composición de las almendras puede ser debida a la diferente variedad, así como al periodo y condiciones de cosecha y zona geográfica.

Por otra parte, se determinó la composición química de las bebidas de almendra (con y sin lecitina) obtenidas mediante los diferentes tratamientos aplicados en esta etapa (producto base crudo (PB), (PB), pasteurizado (PA), esterilizado (UHT) y diversos tratamientos UHPH (200 y 300 MPa, a 55, 65 y 75 °C). Los resultados, se expresaron en porcentaje (p/p) y el valor medio de composición fue el siguiente: 3.04 ± 0.01 de extracto seco; 1.85 ± 0.11 de grasa; 1.09 ± 0.06 de proteína; 0.10 ± 0.01 de cenizas y 0.02 ± 0.08 de carbohidratos. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras de bebida de almendra con y sin lecitina, ni tampoco en los diferentes tratamientos realizados. Sin embargo, se observó un ligero aumento en la cantidad, tanto de proteína como de lípidos en las muestras que contenían lecitina, tal como se mencionó en el capítulo anterior.

Por otra parte, se determinó el valor medio de pH que fue 7.2 ± 0.03 , correspondiente a las muestras PB las muestras tratadas térmicamente de manera convencional y las tratadas por UHPH. No se observaron diferencias significativas en los valores pH entre los tratamientos aplicados. Este pH encontrado en las bebidas vegetales, puede favorecer el crecimiento de una amplia gama de microorganismos si el tratamiento aplicado no produce una inactivación suficiente.

4.2.2 Efecto de los diferentes tratamientos sobre los microorganismos

A las muestras de bebida de almendra de todos los tratamientos que se aplicaron en esta investigación, se les realizaron análisis microbiológicos para determinar la concentración de la microbiota de esta bebida vegetal y analizar los diferentes tratamientos empleados. En específico se analizó el recuento total de bacterias, esporas, micrococcos, enterobacterias, hongos y levaduras y *Bacillus cereus*.

Los resultados microbiológicos que se obtuvieron en la bebida de almendra (una parte agregándole lecitina y otra sin lecitina) no fueron significativamente diferentes ($p \geq 0.05$) (datos no mostrados). Los microorganismos como *Enterobacteriaceae* y *Micrococcaceae* así como los hongos y levaduras se detectaron solo en la producción base, obteniendo los siguientes resultados 3.66 ± 0.40 ; 2.94 ± 0.28 . y 3.6 ± 1.11 log ufc/mL, respectivamente; los tratamientos térmicos convencionales y los tratamientos UHPH, fueron suficientes para eliminar los mencionados microorganismos, con un nivel de detección de -0.5 log ufc/mL. Durante el tratamiento de UHPH se observó un incremento de temperatura como consecuencia de un calentamiento adiabático generado en el equipo principalmente por la turbulencia, cizallamiento y fuerzas de cavitación que el fluido sufrió en la válvula de homogeneización (Tabla 4.5), así que probablemente la temperatura fue el factor más importante por lo cual se produjo la muerte de estos microorganismos. Previamente, en otros estudios (Cruz *et al.*, 2007; Pereda *et al.*, 2007; Velazquez-Estrada *et al.*, 2012) en leche de soja, leche y jugo de naranja, mostraron respectivamente, una alta susceptibilidad a microorganismos como *Enterobacteriaceae*, hongos y levaduras después de que se aplicaron tratamientos con presión igual o mayor a 200 MPa, en las diferentes muestras de alimentos con temperaturas iniciales entre 10 y 40 °C. Estas temperaturas se incrementaron en la válvula de presión, hasta alcanzar valores de 68 y 103 °C, respectivamente.

Tabla 4.5. Registros de las temperaturas de las bebidas de almendra durante el procesamiento UHPH.

Tratamiento	Ti	Tv	Tf
200 MPa/55 °C	55.8±1.0	103.5±0.9	28.6±2.1
200 MPa/65 °C	64.9±0.5	109.7±3.9	31.7±5.5
200 MPa/75 °C	75.9±0.1	114.3±7.2	31.3±3.2
300 MPa/55 °C	56.2±0.9	124.3±7.5	29.6±1.8
300 MPa/65 °C	65.7±0.8	127.7±9.7	28.7±2.9
300 MPa/75 °C	76.3±0.3	129.3±12.6	31.4±2.9

Ti = Temperatura de entrada; Tv = temperatura después de la válvula de alta presión; Tf = temperatura final.

En general, los tratamientos de UHPH a 200 y 300 MPa fueron más eficaces que la pasteurización frente a todos los microorganismos estudiados. En la Tabla 4.6, se puede observar que los tratamientos UHT, UHPH (200 MPa, 75 °C) y UHPH (300 MPa, 55, 65 y 75 °C), presentaron una completa inactivación, y, por tanto, mejor calidad microbiológica que el resto de los tratamientos. Las muestras pasteurizadas y las tratadas por UHPH (200 MPa, 55 °C), exhibieron resultados microbiológicos similares ($p \geq 0.05$). De acuerdo a algunos autores, Thiebaud *et al.* (2003) y Hayes *et al.* (2005) en leche, y Cruz *et al.* (2007) y Polisel-Scopel *et al.* (2012) en leche de soja, éstos obtuvieron una reducción en el recuento de microorganismos que fue dependiente de la presión y temperatura de entrada, mostrando una mejor inactivación cuando aumentó tanto la presión como la temperatura inicial, especialmente cuando las muestras se trataron a 200 MPa. Por otra parte, Pereda *et al.*, (2007), no observaron diferencias significativas entre las muestras de leche tratadas por UHPH a 200 y 300 MPa con temperaturas iniciales de 30 y 40 °C, cuando los análisis se realizaron inmediatamente después de aplicar los tratamientos. De cualquier modo, ellos concluyeron que la leche tratada a 300 MPa con temperatura de entrada de 30 °C (Tv 97 °C por <1 s) tuvieron similar o mejor calidad microbiológica durante el almacenamiento que la leche tratada por pasteurización (90 °C, 15 s).

Tabla 4.6. Población microbiana (log ufc/mL \pm desviación estándar) de producto base y bebidas de almendras después de aplicar los tratamientos.

Tratamiento	Bacterias aerobias mesófilas	Esporas mesófilas	<i>B. cereus</i>
Producto base	4.54 \pm 0.33 ^a	4.00 \pm 0.60 ^a	3.00 \pm 0.42 ^a
Pasteurizado	4.12 \pm 0.49 ^a	3.54 \pm 0.46 ^a	2.89 \pm 0.79 ^a
UHT	ND	ND	ND
200 MPa. 55 °C	3.56 \pm 0.61 ^{ab}	3.22 \pm 0.28 ^{ab}	2.55 \pm 0.96 ^a
200 MPa. 65 °C	2.85 \pm 0.66 ^b	1.54 \pm 0.54 ^b	0.88 \pm 0.27 ^b
200 MPa. 75 °C	ND	ND	ND
300 MPa. 55 °C	ND	ND	ND
300 MPa. 65 °C	ND	ND	ND
300 MPa. 75 °C	ND	ND	ND

a-b: diferentes letras en la misma columna indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$).

ND: No detectadas (detección límite -0.5 log ufc/mL).

El tratamiento térmico convencional (PA) de la bebida de almendra no presentó diferencia significativa, cuando se comparó con el tratamiento UHPH (200 MPa, 55 °C). Sin embargo, los tratamientos UHPH (200 MPa, 65 y 75 °C), exhibieron una disminución significativa ($p < 0.05$) comparado con PA. No obstante, se obtuvo una mayor reducción y en la mayoría de los casos la inactivación total de los microorganismos, cuando se incrementó la temperatura inicial y la presión en los tratamientos UHPH (300 MPa, 55, 65 y 75 °C).

Sin embargo, después de incubar la bebida de almendra por 20 d a 30 °C para la prueba de esterilidad, se observó que solamente las muestras de UHT y aquellas tratadas a 300 MPa con temperaturas de entrada de 65 y 75 °C se mantuvieron estériles. Los tratamientos UHPH en estas condiciones y usando el sistema descrito en este estudio provocó la generación de calentamiento adiabático alcanzando temperaturas alrededor de 129 °C (en la válvula de presión) por menos de 1 s (Tabla 4.5), la cual actuó en combinación con fuerzas físicas como cizallamiento, cavitación e impacto, dando como resultado la destrucción microbiana de las células vegetativas indígenas y esporas. Datos similares se obtuvieron por Polisel-Scopel *et al.*, (2012) en muestras de leche de soja que la trataron en las mismas

condiciones. En contraste, Cruz *et al.*, (2007) y Pereda *et al.*, (2007), a pesar de haber obtenido una reducción significativa de bacterias mesófilas totales en leche de soja y leche, respectivamente, detectaron que las esporas bacterianas no se eliminaron completamente por tratamientos UHPH con temperatura de entrada de 30 o 40 °C a 300 MPa. Los resultados observados en el recuento microbiano por los anteriores autores son diferentes a los encontrados en el presente estudio. Estas diferencias observadas pueden ser explicadas por los efectos causados por las temperaturas máximas alcanzadas en la válvula de presión, durante el tratamiento UHPH (Tabla 4.5), además de que son bebidas de composición química y característica físico-químicas diferentes.

4.2.3 Efecto de la UHPH en la estabilidad física de las bebidas de almendra

4.2.3.1 Tamaño de partícula

Las bebidas de almendra son dispersiones complejas con diferentes estructuras coloidales en la fase dispersa, cuyo tamaño de partícula puede corresponder a gotas de aceite emulsionadas y partículas sólidas en suspensión procedentes de la molienda de la almendra, así como por agregados de proteína y otros agregados complejos formados por glóbulos grasos y proteínas. Las curvas de distribución de tamaños de partícula de la bebida de almendra fueron determinadas por dispersión laser, con un equipo que permite detectar tamaños de partícula entre 400 nm y 2000 μ m. El análisis de tamaño de partículas, se realizó examinando las curvas de distribución y a través de los parámetros $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, los cuales son el diámetro promedio de partículas en base a la superficie y al volumen de partículas respectivamente.

Las curvas de distribución de tamaño de partícula de la bebida de almendra sin emulgente (AM), (Figura 4.1) mostraron en la mayoría de las muestras una distribución polidispersa, con diferentes picos correspondientes a diferentes grupos de partículas con un tamaño delimitado por los extremos de la curva correspondiente. La única excepción que se observó fue en PB, que mostró una distribución monomodal, aunque en un amplio intervalo de tamaños de partícula.

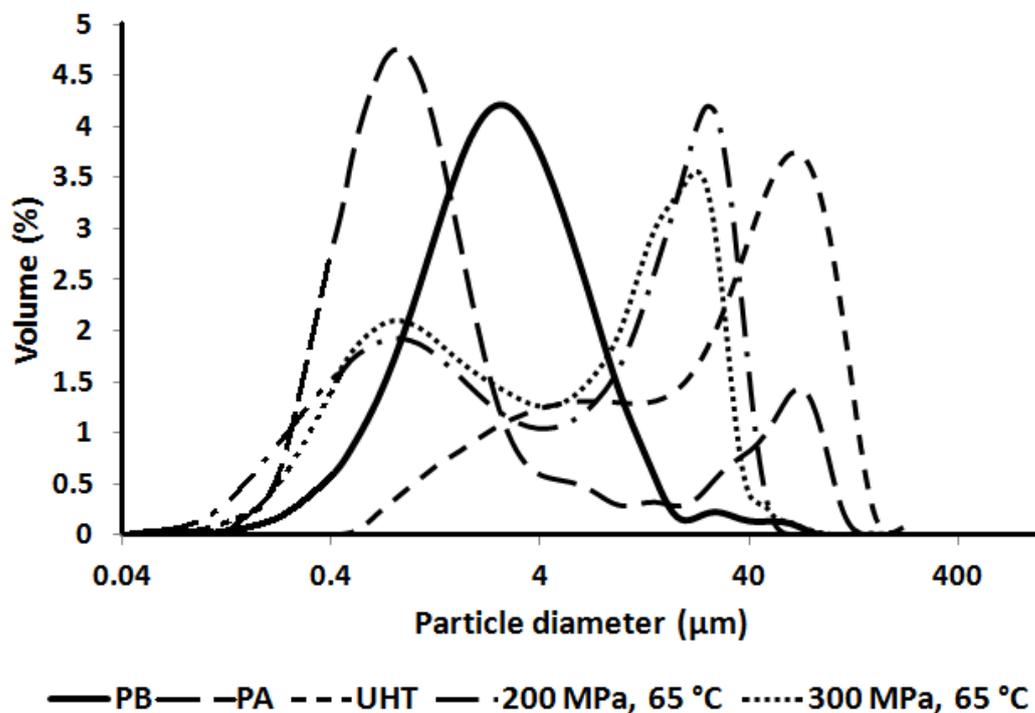


Figura 4.1. Curvas de distribución de tamaño de partículas en las bebidas de almendra sin lecitina (PB, producto base; PA, Pasteurización; UHT, ultra alta temperatura).

De los valores medios $D_{3,2}$ (Tabla 4.7) de las bebidas AM, se observó que las muestras tratadas por UHPH mostraron una disminución significativamente considerable en los valores de este parámetro comparados con los obtenidos por homogeneización convencional como PA y UHT, además de PB. Por otra parte, los elevados valores que se obtuvieron en $D_{4,3}$ son característicos de muestras que exhibieron un pico que corresponde a altos valores en las curvas de distribución de tamaño de partícula. Estos valores ($D_{4,3}$), generalmente están asociados a la presencia de agregados de partículas o gotas grandes de grasa como consecuencia de fenómenos de coalescencia (Thiebaud *et al.*, 2003). Sin embargo, los datos elevados de $D_{4,3}$ en la bebida AM, no muestran diferencia significativa en ninguno de los tratamientos aplicados, excepto en PB, que presentó un valor significativamente inferior comparado con los demás tratamientos. Estas observaciones, apuntaron la poca estabilidad potencial de la bebida de almendra, que puede ser asociada a un valor bajo en la relación de contenidos entre proteína y grasa y/o al gran aumento de superficie de las gotas de aceite generadas en el tratamiento UHPH.

Tabla 4.7. Valores medios \pm desviación estándar de tamaño de partículas (μm) y sedimentación de sólidos (% p/p) por centrifugación después de un día de tratamiento de las bebidas de almendra sin lecitina (AM).

Tratamiento AM	Distribución de tamaño de partícula		Sedimentación de sólidos
	D _{3,2}	D _{4,3}	
Producto base	1.40 \pm 0.30 ^a	3.60 \pm 0.80 ^c	3.90 \pm 0.90 ^b
Pasteurizado	0.81 \pm 0.05 ^b	7.90 \pm 0.60 ^b	5.10 \pm 0.60 ^a
UHT	0.84 \pm 0.04 ^b	8.80 \pm 0.90 ^{ab}	5.10 \pm 0.20 ^a
200MPa. 55°C	0.29 \pm 0.05 ^{de}	9.10 \pm 0.30 ^a	1.40 \pm 0.20 ^c
200MPa. 65°C	0.36 \pm 0.01 ^d	7.10 \pm 0.80 ^b	1.40 \pm 0.40 ^c
200MPa. 75°C	0.32 \pm 0.04 ^{de}	6.90 \pm 0.90 ^b	1.40 \pm 0.40 ^c
300MPa. 55°C	0.26 \pm 0.02 ^e	7.10 \pm 0.80 ^b	1.10 \pm 0.30 ^c
300MPa. 65°C	0.35 \pm 0.01 ^d	7.70 \pm 0.70 ^b	1.40 \pm 0.50 ^c
300MPa. 75°C	0.63 \pm 0.01 ^c	9.30 \pm 0.90 ^{ab}	1.40 \pm 0.40 ^c

a-d: diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos.

D_{3,2} Diámetro medio en base a la superficie. D_{4,3} Diámetro medio en base al volumen.

Las bebidas de almendra en este estudio presentaron una relación proteína-grasa de alrededor de 0.58 con lo cual la proteína existente probablemente no fue suficiente para cubrir las gotas de aceite generadas por los tratamientos UHPH. En estudios anteriores llevados a cabo en leche de soja tratada por UHPH (Cruz *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012) La relación de proteína/grasa fue de alrededor de 2, lo cual produjo una emulsión muy estable con valores D_{3,2} inferiores de 0.15 μm . De hecho, debido al perfil de composición química de la semilla de almendra, se intuyó que podrían encontrarse problemas de estabilidad, los cuales fueron confirmados, tal como se ha mencionado.

En la mayoría de los casos, y especialmente en los tratamientos UHPH, las curvas de distribución de tamaño de partícula de la bebida de almendra con lecitina (AML, Figura 4.2.) mostraron una distribución monomodal. Las muestras PB, UHT y en menor medida las PA, mostraron un pico con valores elevados de diámetro de partículas, los cuales estuvieron en concordancia, con los valores de D_{4,3}. Se puede observar en la tabla 4.8 que

PB mostro los valores más altos de $D_{3,2}$ sin exhibir diferencias significativas cuando se compararon con los resultados de los tratamientos térmicos convencionales. Cabe destacar, que los tratamientos UHT y PA tuvieron valores similares de este parámetro, los cuales están en concordancia a la homogeneización convencional que se aplicó.

Los tratamientos UHPH de AML (Figura 4.2) fueron caracterizados por un pico, con diámetro entre 0.04 y 2 μm , y representó el 91 % del volumen total de partículas. Las muestras AML tratadas por UHPH, presurizadas a 200 y 300 MPa, no presentaron grandes diferencias en la distribución del tamaño de partícula en ninguna de las temperaturas iniciales empleadas. En las muestras tratadas por PA, se observó un pico grande con diámetro entre 0.01 y 4 μm y volumen total de partículas del 58 %. Sin embargo, UHT mostró dos picos, uno de menor volumen total (33 %) y amplios márgenes de diámetro de partícula (0.04 a 3) y otro de mayor volumen total (66 %) y con diámetro de partícula entre 3 y 30 μm . Esto puede ser debido a que en las muestras tratadas por UHT al emplear altas temperaturas con tiempos de residencia relativamente largos (comparados con los tiempos de UHPH), se pudo haber favorecido la agregación parcial de proteínas y además en la homogeneización correspondiente a UHT, la presión aplicada no fue suficiente para dispersar agregados formados, por lo que se obtuvieron márgenes más amplios en los diámetros de partícula comparados con los observados por PA y UHPH.

Se puede observar en la Tabla 4.8, que PB mostró los valores más grandes de $D_{3,2}$, comparado con los obtenidos en las muestras tratadas por PA y UHPH, sin exhibir diferencias significativas cuando se compararon con los resultados de los tratamientos térmicos convencionales. Cabe destacar, que los tratamientos UHT y PA tuvieron valores similares de este parámetro, los cuales están en concordancia a la homogeneización convencional que se aplicó.

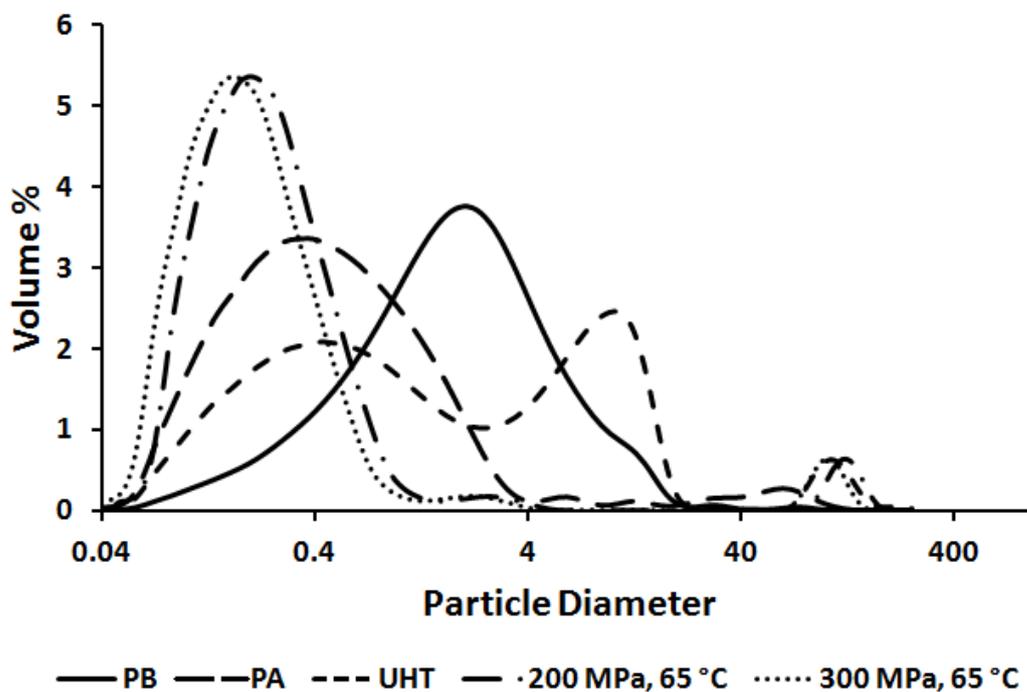


Figura 4.2. Curvas de distribución de tamaño de la bebida de almendra con lecitina (PB, producto base; PA, Pasteurización; UHT, ultra alta temperatura).

Los tratamientos UHPH tuvieron un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, causando una gran reducción en comparación con las muestras tratadas de manera convencional. No obstante, al incrementarse la presión de 200 a 300 MPa, no hubo una reducción adicional significativa en ninguna de las muestras AML. El efecto de la temperatura de entrada del producto en los tratamientos UHPH no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$). Pereda *et al.* (2007) y Hayes *et al.* (2005) en leche y Cruz *et al.* (2007) y Polisel-Scopel *et al.* (2012) en bebida de soja, obtuvieron valores mayores de $D_{4.3}$, cuando trataron las muestras por UHPH a 300 MPa que cuando aplicaron presiones de 200 MPa. Estos autores mencionaron que la UHPH promovió una agregación parcial de glóbulos grasos a presiones mayores que 250 MPa, probablemente debido a la desnaturalización parcial de las proteínas causada por las condiciones de alta presión. Sin embargo, este efecto no se observó en el presente estudio y es consistente con la diferente composición química de las bebidas de almendra comparada con la leche o la bebida de soja. El menor contenido proteico de las bebidas de almendra puede hacer limitado la formación de agregados de grasa a través de proteína desnaturalizada.

Tabla 4.8. Valores medios \pm desviación estándar del tamaño de partículas (μm) y sedimentación de sólidos (% p/p) de bebida de almendra con lecitina (AML) después de la centrifugación a un día del tratamiento.

Tratamiento AML	Distribución de tamaño de partícula		Estabilidad física
	D _{3.2}	D _{4.3}	
Producto base	0.90 \pm 0.10 ^a	3.10 \pm 0.60 ^a	3.3 \pm 0.9 ^a
Pasteurizado	0.31 \pm 0.04 ^b	2.90 \pm 0.20 ^a	3.0 \pm 1.0 ^a
UHT	0.34 \pm 0.01 ^b	2.00 \pm 0.10 ^b	5.0 \pm 1.0 ^a
200MPa, 55°C	0.10 \pm 0.10 ^c	0.58 \pm 0.05 ^c	1.2 \pm 0.2 ^b
200MPa, 65°C	0.17 \pm 0.02 ^c	0.50 \pm 0.30 ^c	1.0 \pm 0.1 ^b
200MPa, 75°C	0.20 \pm 0.06 ^c	0.60 \pm 0.10 ^c	1.2 \pm 0.1 ^b
300MPa, 55°C	0.17 \pm 0.01 ^c	0.27 \pm 0.07 ^d	1.0 \pm 0.3 ^b
300MPa, 65°C	0.16 \pm 0.05 ^c	0.21 \pm 0.01 ^d	1.1 \pm 0.4 ^b
300MPa, 75°C	0.14 \pm 0.02 ^c	0.40 \pm 0.20 ^{dc}	1.0 \pm 0.2 ^b

a-c: diferentes letras en la misma columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos. D_{3.2} Diámetro medio en base a la superficie. D_{4.3} Diámetro medio en base al volumen.

4.2.3.2 Sedimentación de sólidos

La estabilidad de las bebidas de almendra fue analizada midiendo el porcentaje (p/p) de sólidos sedimentados después de centrifugar las muestras almacenadas a 4 °C, realizando esta determinación el día 1 y 15 tras el tratamiento tecnológico. De manera paralela se observó visualmente la estabilidad de la dispersión atendiendo a la presencia de cremado espontáneo y la sedimentación de partículas. En las muestras PB y las tratadas térmicamente (PA y UHT), se observó la formación espontánea de una capa de cremado después de 15 días de almacenamiento en los licuados AM y AML. Además, en los licuados AM se formó espontáneamente un sedimento de partículas sólidas en el fondo del recipiente, lo que pone de manifiesto que la lecitina también favorece la dispersión de las partículas sólidas en suspensión.

En los licuados AM tratados por UHPH sólo se formó una capa fina de cremado en los días 1 y 15, aunque esta fue mucho más estrecha que en los licuados tratados térmicamente y homogeneizadas de forma convencional. En los licuados AM tratados por UHPH se

observaron elevados valores en $D_{3.2}$ y $D_{4.3}$ (Tabla 4.8), que confirman que el fenómeno que pudo haber ocurrido, fue la coalescencia, causando la presencia de grandes gotas de aceite. Como ya se comentó anteriormente, la frágil estabilidad observada en las muestras AM se pudo deber a que el contenido proteico fue insuficiente para cubrir las gotas de aceite y proporcionar una buena estabilización de la fracción grasa en la emulsión.

La sedimentación de sólidos forzada por centrifugación no es una medida directa de la estabilidad física, aunque da una idea de la estabilidad potencial del sistema coloidal. Así, un alto valor de este parámetro, indica una baja estabilidad como resultado de la sedimentación de las partículas. Además, este índice se puede relacionar con la percepción sensorial de granulosidad en la boca. La sedimentación de partículas medidas tras la centrifugación coincide con las observaciones de la sedimentación espontánea (Tabla 4.7 y 4.8). Así, en los licuados de almendra tratados térmicamente ya fueran AM o AML, los valores de sedimentación obtenidos fueron más elevados que en los UHPH y entre estos últimos, no se apreciaron diferencias significativas debidas a las diferentes condiciones aplicadas de los tratamientos.

En los licuados de almendra tratados por UHPH la considerable reducción de tamaño de partículas sólidas mejoraron su capacidad de dispersión en la fase acuosa y como era de esperar, en la mayoría de los casos, la adición de lecitina incrementó la capacidad de humectación de las partículas hidrofóbicas dispersas de la almendra. En las muestras tratadas por UHT, la adición de la lecitina no mejoró la estabilidad en términos de sedimentación de partículas (Tabla 4.9). McSweeney *et al.* (2008), describieron la capacidad de mejorar la estabilidad térmica de la lecitina en leche, a través de una combinación de complejos de proteína interfacial/surfactantes, pero se debe tener en consideración que si la concentración de surfactante es menor que 0.2% (p/p) se puede producir agregación por inducción térmica provocado por la desnaturalización de las proteínas (Euston *et al.* 2001). Por lo que la combinación de un bajo contenido de lecitina presente en el licuado UHT (0.03% p/p), junto al tratamiento térmico más intenso, podría favorecer la desnaturalización de las proteínas y su consiguiente agregación, lo que explicaría que no mejorara su estabilidad.

4.2.4 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la superficie de las partículas coloidales fue determinada por medida de la fluorescencia al interaccionar el ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS) con los grupos hidrofóbicos expuestos. Esta evaluación se realizó con la finalidad de determinar el potencial de modificación de las estructuras coloidales debido al tratamiento aplicado (tratamientos térmicos y UHPH) y entender mejor los cambios producidos en la estabilidad de las bebidas de almendra. Los registros de fluorescencia observados en curvas espectrales obtenidas por emisión de las bebidas de almendra AM y AML se incrementaron con los tratamientos aplicados en el siguiente orden: PB<PA<UHT<UHPH. Un valor mayor en la emisión de fluorescencia se corresponde con mayor grado de hidrofobicidad. En general, el grado de hidrofobicidad fue mayor en las muestras AML que en las de AM (Figura 4.3, a y b).

Las proteínas adoptan una conformación típica para minimizar la exposición de grupos hidrofóbicos al agua. Sin embargo, las limitaciones estructurales disminuyen la habilidad de las moléculas de proteína para plegarse y adoptar conformaciones ideales, y por tanto, las moléculas y partículas con proteínas contienen generalmente algunos sitios hidrofóbicos expuestos, susceptibles de unirse al ANS (McSweeney *et al.*, 2008).

Las proteínas en las bebidas de almendra están localizadas en la interfase de aceite-agua en las partículas sólidas suspendidas en la fase acuosa, así como dispersas como moléculas individuales o agregadas.

El grado de exposición de grupos hidrofóbicos en las bebidas vegetales puede deberse a causas diferentes. Por un lado, a la severidad del tratamiento aplicado (temperatura, presión, y tiempo de residencia) que afectaría al grado de desnaturalización de la proteína aumentando la hidrofobicidad cuando la desnaturalización es mayor. Por otra parte, debido al incremento de superficie de las partículas sólidas con contenido proteico (gotas de aceite y partículas en suspensión). Así, la UHPH puede incidir en el incremento de la hidrofobicidad, ya que provoca la reducción del tamaño de partículas y puede producir desintegración de agregados. Tanto la intensidad del tratamiento como el aumento de superficie expuesta, pueden explicar los resultados observados en las bebidas de almendra. Por una parte, las muestras AM, con deficiencia de proteína para proteger las gotas de

aceite, darían lugar a agregados por entrelazado entre proteínas de unas gotas con zonas desprotegidas de otras. Asimismo, el fenómeno de coalescencia con formación grandes gotas de aceite se puso de manifiesto en estas muestras. Ambos fenómenos fueron evidenciados a través de los valores de $D_{4.3}$ (Tabla 4.8) y se traducen en la exposición de menor superficie susceptible de interaccionar con el ANS.

El incremento de hidrofobicidad observada en las muestras AM tratadas por UHPH en comparación con las tratadas térmicamente fue probablemente debido al incremento de la superficie de las partículas sólidas causado por la reducción de tamaño de partícula como se comentó en el apartado anterior. Además, tal como se muestra en la tabla 4.9 al añadir lecitina los valores del parámetro $D_{4.3}$, muestran una considerable reducción con respecto a las bebidas AM. Por ello, cabe deducirse que los agregados de partículas (que contenían proteínas) fueron destruidos, contribuyendo al incremento de la exposición de proteínas para reaccionar con el ANS. Bouaouina *et al.*, (2006) también observaron un incremento de hidrofobicidad en la dispersión de proteínas de suero de leche tratada por alta presión dinámica como consecuencia de la exposición de los grupos hidrofóbicos debido al fraccionamiento de los agregados de proteína.

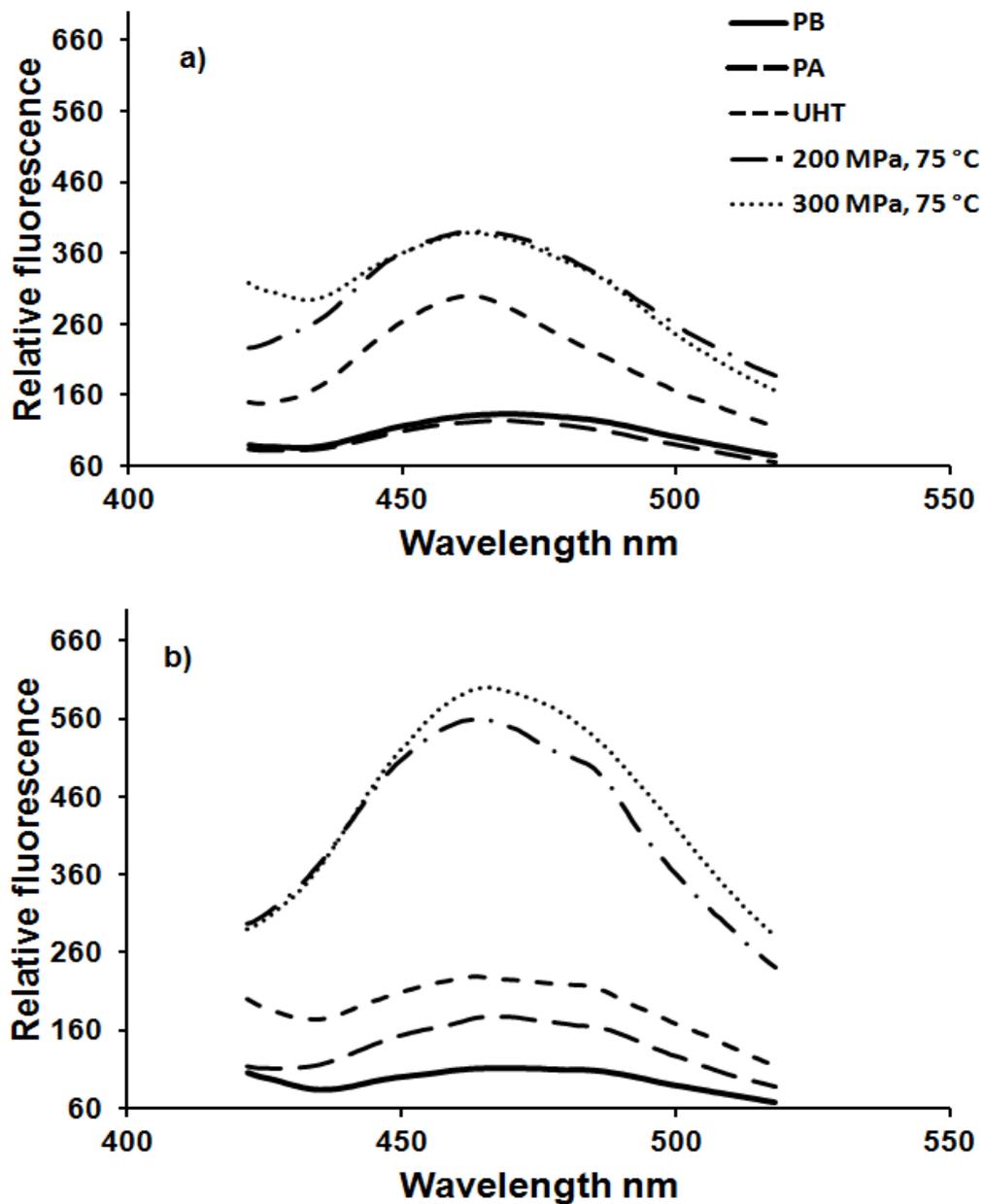


Figura 4.3. Hidrofobicidad de las proteínas de las bebidas de almendra. a) Bebida de almendra sin lecitina (AM) y b) Bebida de almendra con lecitina (AML). (PB, producto base; PA, Pasteurización; UHT, ultra alta temperatura).

4.2.5 Oxidación lipídica

Las bebidas de almendra contienen ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido oleico, susceptibles a la oxidación (Kodad y Socias, 2008; Shate y Sze, 1997), siendo muchos factores que la favorecen: presencia de oxígeno, luz, enzimas como las lipooxigenasas y temperaturas elevadas.

En este estudio, el proceso de oxidación se evaluó tras la aplicación de los diferentes tratamientos a las bebidas de almendra a través de diferentes parámetros: determinación de la actividad de la lipooxigenasa, determinación de la concentración de hidroperóxidos como evaluación de la oxidación primaria, y determinación de las especies reactivas al TBA (TBARS), como evaluación de la oxidación secundaria.

La lipooxigenasa, enzima con amplia distribución en el reino vegetal, oxida al ácido linoleico y otros lípidos poliinsaturados y produce los correspondientes hidroperóxidos, (Axelrod *et al.*, 1981). La interacción enzima sustrato se facilita cuando se altera la estructura del tejido vegetal, como en el caso de la molienda. Por ello es importante conocer la actividad LOX como factor responsable de la oxidación de los alimentos. En este estudio, sin embargo, se comprobó que el PB no presentó actividad LOX, por lo que se descarta su contribución en la oxidación de las bebidas de almendra.

En relación al índice de peróxidos, los licuados de almendra tratados por UHPH presentaron valores más altos que PB y que los tratados térmicamente (Tabla 4.9). Sin embargo, la concentración de hidroperóxidos en las bebidas de almendra podrían considerarse despreciables, ya que presentaron valores de este índice tres órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos en licuado de soja por Polisel-Scopel *et al.* (2012). Estos autores observaron que detrás la producción de bebidas de soja, los valores de hidroperóxidos oscilaron entre 0.2 y 0.4 meq/L, en donde no se observaron diferencias entre los tratados térmicamente y los UHPH. En otro estudio realizado en leche por Pereda *et al.* (2008), encontraron que las diferencias en la formación de hidroperóxidos estuvo en función de la presión aplicada en el tratamiento UHPH, siendo los valores fueron superiores cuando se trató la leche a 200 MPa en comparación con los valores obtenidos a 300 MPa.

Las diferencias observadas, especialmente en comparación con los licuados de soja, se deben probablemente a que los perfiles de ácidos grasos de la almendra y la soja son

distintos. La soja tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente en ácido linoleico, mientras que en la almendra predomina el ácido oleico (ácido graso monoinsaturado). Además, es posible que la presencia de antioxidantes naturales en la almendra pudiera también contribuir al bajo desarrollo de la oxidación.

Tabla 4.9. Valores medios ($\times 10^{-4}$) \pm desviación estándar de índice de peróxidos (meq/mL) de bebida de almendra sin lecitina (AM) y con lecitina (AML), un día después del tratamiento.

Tratamiento	AM	AML
PB	0.29 \pm 0.08 ^{dC}	0.22 \pm 0.03 ^{cC}
PA	0.46 \pm 0.01 ^{bB}	0.44 \pm 0.05 ^{bB}
UHT	0.42 \pm 0.09 ^{bB}	0.42 \pm 0.02 ^{bB}
200MPa, 55°C	0.64 \pm 0.09 ^{aA}	0.58 \pm 0.10 ^{aA}
200MPa, 65°C	0.60 \pm 0.07 ^{aA}	0.60 \pm 0.08 ^{aA}
200MPa, 75°C	0.63 \pm 0.05 ^{aA}	0.63 \pm 0.08 ^{aA}
300MPa, 55°C	0.64 \pm 0.05 ^{aA}	0.62 \pm 0.06 ^{aA}
300MPa, 65°C	0.65 \pm 0.02 ^{aA}	0.66 \pm 0.02 ^{aA}
300MPa, 75°C	0.66 \pm 0.01 ^{aA}	0.67 \pm 0.01 ^{aA}

a-c, diferentes supeíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

A-C, diferentes supeíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la bebida de almendra con lecitina y la de sin lecitina.

Los niveles máximos en el índice de peróxidos en relación con la calidad son muy variables y dependen del tipo de alimento. Así por ejemplo, en el aceite de nueces los valores máximos son de 3.0 meq/kg y en el aceite de la semilla de almendra de 2.0 meq/kg, indicando una calidad aceptable de las semillas (Buransompob *et al.*, 2003). Sin embargo, no se encontraron referencias en la literatura relacionadas con el nivel máximo permisible de valor de peróxidos en bebidas o licuados de almendra.

Por otra parte, como indicador de la oxidación secundario se realizó la determinación de TBARS, siendo los resultados obtenidos no concluyentes y algo sesgados, aunque siempre muy reducidos. Por ello se creyó necesario tener en consideración como índice de la

oxidación secundaria, las concentraciones de algunos compuestos analizados en el perfil volátil de las bebidas de almendra, tal como el hexanal.

4.2.6 Efecto de los tratamientos aplicados sobre los compuestos volátiles

Las sustancias responsables del perfil volátil característico de las bebidas de almendra se deben a los compuestos naturales contenidos en la semilla así como a otros compuestos generados durante el procesado y almacenamiento de las bebidas. Una parte importante de estos compuestos se generan como consecuencia de la autooxidación lipídica, de forma que los productos derivados de ésta dependerán cuantitativamente de las condiciones de procesado, tales como su exposición a la luz, metales y presión parcial de oxígeno, la temperatura de procesado, el grado de protección de las gotas de aceite, etc. La oxidación también se puede producir por vía enzimática a través de la acción de la lipoxigenasa. En ambas reacciones (enzimática y no enzimática), la formación de hidroperóxidos a partir de los ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido linoleico y linolénico, y de los monoinsaturados, como el ácido oleico, a través del oxígeno molecular constituye la reacción de oxidación primaria (Boatright y Lei, 1999; Kakumyan, *et al.*, 2009). Los hidroperóxidos formados son muy inestables y pueden ser fácilmente transformados en productos finales tales como aldehídos, cetonas, furanos, alcoholes, polímeros, etc. Las reacciones de pardeamiento no enzimáticas también contribuyen a la formación de compuestos volátiles a través de la reacción de glúcidos reductores y aminoácidos durante el tratamiento térmico de las bebidas de almendra (Lozano *et al.*, 2007; Plutowska y Wardencki, 2007).

El objetivo de éste estudio fue la caracterización del perfil volátil de las bebida de almendra, y tratar de estudiar el efecto de los diferentes tratamientos aplicados en este trabajo, es decir pasteurización, y las diferentes condiciones de UHPH.

Hay que mencionar que la gran variabilidad encontrada en los picos cromatográficos de algunos compuestos para el análisis a través de su área, hizo difícil establecer conclusiones con el rigor suficiente. Por este motivo el análisis estadístico, en algunas ocasiones ha dado lugar a interpretaciones que deben ser tomadas con cautela hasta la confirmación a través de una cuantificación más adecuada utilizando patrones internos. Por ello, el estudio de la fracción volátil en esta tesis es fundamentalmente indicativo del perfil general de

compuestos en los licuados de almendra. Aquellos compuestos más abundantes y en los que se ha observado una tendencia estadísticamente significativa son los que han permitido establecer la influencia de los tratamientos en el perfil volátil.

Los estudios realizados en bebidas de almendra son muy escasos (Toro-Funes *et al.*, 2014; Bernat *et al.* 2015), y que conozcamos, ninguno en relación a compuestos volátiles. Por ello, este proyecto ofreció la oportunidad de poner a punto un método de análisis de compuestos volátiles en licuados de almendra (Pérez-Gonzalez *et al.*, 2014), que posteriormente se utilizó para estudiar el efecto de los tratamientos aplicados en el perfil de componentes volátiles.

La mayor parte de información en relación a los compuestos volátiles se refieren al fruto seco, ya sea crudo o tostado como los de Beck *et al.* (2008, 2009 y 2011), Mexis, *et al.*, (2010) y Agila *et al.* (2012) y al aceite de almendra como los de Pićurić y Milavonovic (1993) y Beltran *et al.* (2011). En este último producto, el número de volátiles identificados fueron pocos y algunos casos diferentes a los encontrados en el presente estudio, dado que se determinaron únicamente en la fracción grasa y por ello la presencia de compuestos volátiles está limitada a aquellos de carácter lipídico.

Se identificaron 56 compuestos en el espacio de cabeza de las diferentes bebidas de almendra tratadas. La Tabla 4.10 muestra la abundancia total de los compuestos volátiles agrupados por familias químicas en las bebidas de almendra tratadas por PA, UHT y UHPH. Estas familias químicas incluyen aldehídos, alcoholes, cetonas, furanos, ácidos carboxílicos, compuestos aromáticos, ésteres, alcanos, alquenos, pirroles y otros compuestos.

Los aldehídos y alcoholes fueron los compuestos más representativos en todos los perfiles cromatográficos de las bebidas de almendra (Tabla 4.10). Solamente se observaron algunas diferencias en familias y tratamientos específicos (Tabla 4.10) los cuales se discutirán más adelante. A 300 MPa, la abundancia de compuestos de todas las familias químicas se incrementaron con el aumento de temperatura de entrada ($p < 0.05$), excepto para alquenos, pirroles y otros compuestos, en donde la mayor abundancia se obtuvo en los tratamientos UHT. Estos resultados indican que el incremento de la temperatura adiabática causado por

la alta presión pudo ser una importante causa para la formación de determinados compuestos volátiles.

Tabla 4.10. Abundancia de compuestos¹ volátiles por familias químicas en bebidas de almendra tratada.

Compuesto	PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
Aldehídos	47 ^c	101 ^b	74 ^{bc}	106 ^b	80 ^{bc}	188 ^a
Alcoholes	120 ^{bc}	75 ^c	182 ^a	190 ^a	130 ^b	207 ^a
Aromáticos	10 ^a	10 ^a	9 ^a	10 ^a	8 ^a	10 ^a
Cetonas	8.0 ^b	22 ^a	20 ^a	29 ^a	21 ^a	51 ^a
Pirroles	6.0 ^a	9.0 ^b	2.0 ^{ab}	1.7 ^{ab}	7.0 ^{ab}	3.0 ^{ab}
Ácidos	5.8 ^b	3.9 ^b	6.4 ^b	9.8 ^a	7.7 ^a	14 ^a
Furanos	2.1 ^b	4.8 ^a	4.9 ^a	4.9 ^a	3.9 ^a	7.4 ^a
Esteres	1.35 ^{ab}	0.9 ^b	1.5 ^{ab}	1.8 ^a	1.5 ^b	3.8 ^a
Alcanos	2.0 ^c	8.5 ^a	5.7 ^a	7.7 ^a	9.6 ^a	30 ^a
Otros	1.2 ^b	3.0 ^a	0.9 ^b	1.4 ^b	1.2 ^{ab}	2.0 ^{ab}
Alquenos	0.45 ^b	0.60 ^b	0.23 ^b	1.4 ^a	1.4 ^a	0.45 ^b

^{a-c} diferentes superíndices en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

¹ Cuenta del área integrada. Valores medio x 10⁵.

La temperatura alcanzada en la bebida de almendra después de la válvula de homogeneización en los tratamientos UHPH a 200 MPa, con temperaturas de entrada de 55 y 75 °C, correspondieron a 103.5 y 114.3 °C respectivamente; a 300 MPa, con temperaturas de entrada de 55 y 75 °C, se alcanzaron temperaturas en la válvula de homogeneización de 124.3 y 129.3 °C respectivamente. El tiempo de residencia en la válvula de homogeneización en los tratamientos UHPH fue solamente de 0.7 segundos, como se describió en la sección 4.1, mientras que la pasteurización se trabajó a 90 °C durante 90 segundos y el tratamiento UHT a 142 °C durante 6 segundos. La diferencia de temperaturas en de la válvula de homogeneización entre 200 y 300 MPa podría ser la principal causa de los cambios observados en el perfil volátil. Por otro lado, las diferencias observadas entre los tratamientos convencionales (PA y UHT) y 300 MPa, 75 °C, indicaron

que la alta presión y la temperatura pudieron tener un efecto importante en la formación del perfil volátil, especialmente en el proceso oxidativo durante la aplicación del tratamiento.

A continuación se comentan los resultados obtenidos en la fracción volátil de las bebidas de almendra por familias de compuestos.

De los **aldehídos** encontrados, el benzaldehído, fue el compuesto volátil cuantitativamente más importante de la bebida de almendra. Sin embargo, su abundancia no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los distintos tratamientos aplicados, dada la gran variabilidad de los resultados. Los valores se encontraron en el intervalo 89 - 100 según el cálculo de integración de área de los picos, El benzaldehído, al igual que los demás aldehídos, se genera naturalmente por acción de β -glucosidasa e hidroxilasa a partir de glucósidos cianogénicos (Badui, 2006), y es considerada como una “sustancia impacto” siendo un componente característico aroma de la almendra. Otros aldehídos que también contribuyen al perfil aromático de la almendra son el pentanal y trans-2-hexanal. Algunos autores cuantificaron compuestos volátiles en la almendra (Mexis *et al.*, 2009 y 2011) y en el aceite de almendra (Beltran *et al.*, 2008) en los que el benzaldehído fue el compuesto más abundante.

Las condiciones del tratamiento UHPH a 300 MPa, 75 °C causaron, en general, un incremento significativo en los compuestos de la familia de los aldehídos. La abundancia de ésta familia química fue influenciada por los tratamientos como se muestra en la Tabla 4.12. Del grupo de compuestos asociados con la oxidación lipídica, el hexanal fue el volátil con mayor abundancia, seguido del pentanal. También se detectaron otros compuestos a bajos niveles como 2-heptanal, nonanal, octanal, cinamaldehído, trans-2-hexenal y trans, trans-2,4-decadienal. De manera general, todos los de este grupo, experimentaron un incremento, conforme el tratamiento fue más severo, alcanzando los valores más altos en el tratamiento 300 MPa, 75 °C y UHT.

El hexanal, es el compuesto más estudiado; este volátil, está directamente relacionado con el aroma a oxidado y es considerado como un indicador de la calidad del aceite de almendra (Mexis *et al.*, 2009) entre otros alimentos, Además, contribuye al olor desagradable, siendo su umbral de detección muy bajo (25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de producto según Hashim y Chavero, 1995),

por lo que se puede decir que a menor contenido de hexanal, mayor grado de aceptación por parte de los consumidores.

En la Tabla 4.12, se puede observar un incremento del hexanal en todos los licuados tratados en comparación con PA. Los tratamientos UHPH así como los tratados por UHT influyeron de igual manera en el incremento del hexanal de manera significativa con respecto de PA. Los tratamientos que alcanzaron temperaturas más elevadas fueron en los que se produjo una mayor cantidad de hexanal, con lo cual podemos suponer que la temperatura juega un papel importante en la producción de hexanal.

El hexanal puede producirse por oxidación del ácido oleico o a partir de la autooxidación del ácido linoleico y linoleatos (Beck *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha demostrado que el hexanal está relacionado con sabores a legumbre y a hierba en la leche de soja (Polisely-Scopel *et al.*, 2013). En la misma línea, Beck *et al.*, (2011), corroboraron que la almendra escaldada (90-100 °C, 2 min), sufrió un incremento significativo de hexanal, al compararlo con la almendra sin procesar.

El pentanal, presentó valores considerables y mostró un incremento significativo en los licuados UHT y los tratados por UHPH (300 MPa, 75 °C) comparados con el resto de los tratamientos. Estos resultados van en la misma línea que lo mencionado con respecto al hexanal. Así, su abundancia tiene que ver con la intensidad de los tratamientos aplicados. El pentanal, se forma por la oxidación del ácido linoleico y por acción catalítica de la lipooxigenasa, principalmente en el proceso de molienda cuando la enzima aún está activa (Poliseli-Scopel *et al.*, 2013). El pentanal se asocia con aroma a grasa oxidada en licuado de soja (Poliseli-Scopel *et al.*, 2013). También se asoció a aromas a leñoso, amargo y aceitoso en aceite de oliva con umbrales de detección de 240 µg/kg de aceite (Morales *et al.*, 2005). Sin embargo, también se asocia a notas características de la almendra (Pherobase y Base de datos).

Otro de los compuestos importantes en abundancia fue el 2-heptanal, que deriva de la oxidación del ácido linoleico (Badui, 2006). Este volátil aumentó significativamente en todos los licuados tratados con respecto a PA. Sin embargo, el aumento experimentado no fue significativo en general. Únicamente el tratamiento 300 MPa, 75 °C presentó los valores mayores y significativos ($p < 0.05$) respecto al resto de tratamientos. Este

compuesto se ha asociado a olores oxidado, seboso y pungente en el aceite de olivo, con un límite de detección de 5 µg/kg de aceite Kalua *et al.*, (2005), así como a sabor a tomate macerado o cortado generando sabor ácido pudiendo proporcionar sabores astringentes a este producto (Dávila-Aviña *et al.*, 2010).

El nonanal mostro una tendencia similar al 2-heptanal. Poliseli-Scopel *et al.* 2013, encontró un comportamiento similar del pentanal y el nonanal en muestras de bebida de soja tratadas en las mismas condiciones que la utilizadas en el presente estudio. El nonanal se ha determinado con cierta abundancia en almendras dañadas y en aceite de almendras oxidado, y se considera que tanto el octanal como el nonanal son productos de la oxidación lipídica secundaria derivada del ácido oleico (Beltran *et al.* 2011), En otros casos el nonanal se determinó, como indicador primario de la rancidez del aceite de oliva (Kalua *et al.*, 2005). De forma similar, Poliseli-Scopel *et al.* (2013) indicaron que el heptanal y nonanal, confieren aroma graso y oxidado a los productos que los contienen. El 2,4-decadienal se deriva de la oxidación del ácido linoleico y lo relacionan con el aroma de almendras oxidadas (Beltran *et al.*, 2011).

El cinamaldehído y el octanal, trans-2-hexenal y el trans,trans-2,4-decadienal presentaron una tendencia similar que los compuestos anteriores, aunque siendo presentes en menor abundancia .

Inicialmente, Beck *et al.* (2008 y 2009) únicamente encontraron dos aldehídos, nonanal y bourboneno (mezcla de benzaldehído) en el fruto seco de almendra. Posteriormente en otros estudios, Mexis *et al.* (2009) y Beck *et al.* (2011), identificaron mayor cantidad de aldehídos (hexenal, heptanal, octanal, nonanal y decanal) en la almendra, y Agila y Barringer (2012) definieron en el perfil aromático de las almendras en donde encontraron aldehídos como benzaldehído, heptanal, (E)-2-heptenal, (E)-2-hexenal, metional, nonanal, (E)-2-nonenal y (E)-2-octenal Los aldehídos identificados fueron inferiores a los determinados en el presente estudio en bebida de almendra (Tabla 4.11). Esto puede ser debido a que en los trabajos anteriormente mencionados los volátiles fueron determinados en almendra sin tratar, y sólo Beck *et al.*, (2011) los evaluaron en almendra molida y blanqueada. Además, la almendra contiene antioxidantes naturales que evitan la oxidación de los ácidos grasos presentes en la semilla y por tanto la formación de algunos aldehídos.

En el presente trabajo, la almendra fue molida, mezclada con agua y tratada, de forma que las condiciones aplicadas durante el proceso de elaboración de la bebida de almendra y los tratamientos aplicados, favorecen los procesos bioquímicos para la formación de volátiles.

Tabla 4.11. Abundancia² de aldehídos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
Hexanal	MS. RI 1093	32.02 ^b	60 ^a	50 ^a	67 ^a	49 ^{ab}	87 ^a	
Pentanal	MS. RI 989	6.3 ^b	22 ^a	7 ^b	12 ^b	11 ^b	35 ^a	
2-heptanal	MS. RI 1345	6.1 ^c	13 ^b	12 ^b	16 ^b	13 ^b	45 ^a	
Nonanal	MS. RI 1409	2.1 ^b	2.7 ^{ab}	2.0 ^b	2.9 ^{ab}	2.1 ^b	5.0 ^a	
Octanal	MS. RI 1302	0.53 ^b	1.8 ^{ba}	0.7 ^b	1.0 ^b	0.9 ^b	4.0 ^a	
Cinamaldehído	MS. RI 2091	0.36 ^a	0.05 ^b	0.28 ^a	3.30 ^a	0.31 ^a	0.42 ^a	
Trans-2-hexanal	MS. RI 1236	0.01 ^c	0.81 ^{bc}	0.82 ^{bc}	2.03 ^b	1.96 ^b	8.36 ^a	
Trans.trans-2.4-decadial	MS. RI 1845	0.174 ^b	0.27 ^b	0.32 ^b	0.34 ^b	0.29 ^b	1.51 ^a	

^{a-c} Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

² Valor del área integrada (valor medio $\times 10^5$).

³ Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

⁴ Calculado según el Índice de Retención de Kovats

⁵ PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

La familia de los **alcoholes** fue la segunda en abundancia en la bebida de almendra. En esta familia, el bencenometanol fue el compuesto presente en mayor cantidad, seguido del 1-pentanol, 1-heptanol, fenol, 1-nonanol, 6-metil-5-hepten-2-ol; el resto de los alcoholes identificados fueron minoritarios (Tabla 4.12). De manera general los alcoholes aumentaron, conforme las condiciones de tratamiento fueron más drásticas.

El benceno-metanol, compuesto mayoritario en ésta familia, presentó un notorio descenso en los licuados tratados por UHPH y UHT comparadas con PA ($p < 0,05$). La aplicación de

los tratamientos severos pudo propiciar la generación de otros compuestos, de tal manera que su abundancia se vio disminuida. El benceno-metanol, es un derivado de la oxidación secundaria de lípidos.

El segundo componente en abundancia fue el 1-pentanol, el cual presentó un incremento en las bebidas de almendra tratadas por UHPH comparadas con las tratadas convencionalmente (PA y UHT). Sin embargo, entre los licuados tratados por UHPH no se observaron estas diferencias. Teniendo en consideración que el tratamiento UHT presentó una considerable menor abundancia, probablemente debido a su degradación, cabe pensar que los tratamientos UHPH no fueron tan severos para producirla, y por tanto, acumulando este compuesto. El 1-heptanol (tercero en abundancia), 6-metil-5-hepten-2-ol, 2(2-butoxi,oxi)-etanol y el 3-metil-2-buten-1-ol, presentaron la misma tendencia que el 1-pentanol.

El fenol ha sido identificado como compuesto volátil relevante en la almendra sin procesar (Beck *et al.*, 2011). Éste y el resto de alcoholes se encontraron en la fracción volátil en menor abundancia que los anteriormente mencionados, excepto en el caso del 6-metil-5-hepten-2-ol, el cual tuvo un valor de área del pico significativamente mayor en todos los tratamientos UHPH, quizás por falta de condiciones para su degradación, como se ha comentado en el párrafo anterior para otros alcoholes.

Tabla 4.12. Abundancia² de alcoholes detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos ⁵					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
Benceno-metanol	MS, RI 1905	17 ^a	10 ^c	14 ^a	14 ^b	13 ^{bc}	14 ^{ab}	
1-pentanol	MS, RI 1257	8.3 ^b	6 ^b	17 ^{ba}	23 ^a	17 ^{ab}	18 ^a	
1-heptanol	MS, RI 1461	6.6 ^b	5 ^b	10 ^{ab}	14 ^a	11 ^{ba}	12 ^{ab}	
Fenol	MS, RI 2029	3.5 ^a	1.3 ^b	1.1 ^b	1.4 ^b	1.4 ^b	1.5 ^b	
1-nonanol	MS, RI 1665	0.3 ^b	0.7 ^b	0.5 ^b	0.6 ^b	0.5 ^b	2.1 ^a	
6-metil-5-hepten-2-ol	MS, RI 1359	0.22 ^b	0.35 ^b	56 ^a	52 ^a	13 ^b	47 ^a	
2(2-butoxi, toxi)-etanol	MS, RI 1493	0.17 ^{ab}	0.10 ^b	0.15 ^{ab}	0.25 ^{ba}	0.20 ^{ab}	0.25 ^a	
3-metil-2-buten-1-ol	MS, RI 1623	0.06 ^b	0.06 ^b	1.2 ^{ab}	1.7 ^a	1.0 ^{ab}	1.0 ^{ab}	
1-etil-hexanol	MS, RI 1494	0.04 ^b	12 ^b	13 ^b	18 ^{ab}	14 ^b	47 ^a	

a-c Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

2 Valor del área integrada (valor medio x 105).

3 Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

4 Calculado según el Índice de Retención de Kovats

5 PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

De la familia de los **compuestos aromáticos** detectados en la bebida de almendra (Tabla 4.13), el que presentó mayor abundancia, fue el 1, 2, 4-trimrtil-benceno, seguido del p-etil-anisol y el p-cimeno. Además, se identificaron otros volátiles minoritarios (m-xileno, 1, 3, 5-trimetil-benceno, propil-benceno, 4-etil-tolueno y xileno), que se han relacionaos con almendras dañadas (Beck *et al.*, 2011). Los compuestos aromáticos, en general, presentaron mayor sensibilidad ante los tratamientos térmicos convencionales, en los que se generaron mayor cantidad. Las muestras tratadas por UHPH sufrieron un descenso significativo ($p < 0.05$) comparadas con las muestras tratadas por PA y UHT.

Tabla 4.13. Abundancia² de compuestos aromáticos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos ⁵					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
1,2,4-trimetil-benceno	MS, RI	1298	1.7 ^{ab}	3.0 ^a	2 ^{ab}	1.1 ^{ab}	0.7 ^b	0.8 ^b
p-etil-anisol	MS, RI	2184	0.69 ^a	0.60 ^a	0.38 ^b	0.37 ^b	0.36 ^b	0.24 ^b
p-cimeno	MS, RI	1286	0.5 ^a	0.53 ^a	0.3 ^{ab}	0.3 ^{ab}	0.1 ^b	1.7 ^{ab}
m-xileno	MS, RI	1051	0.44 ^{ab}	0.03 ^b	1.3 ^{ab}	1.6 ^a	1.2 ^{ab}	1.2 ^{ab}
1,3,5-trimetil-benceno	MS, RI	1260	0.42 ^b	0.87 ^a	0.28 ^b	0.17 ^b	0.12 ^b	0.12 ^b
Propil-benceno	MS, RI	1222	0.18 ^b	0.49 ^a	0.32 ^{ab}	0.23 ^b	0.15 ^b	0.22 ^b
4-etil-tolueno	MS, RI	1279	0.02 ^b	0.69 ^a	0.43 ^{ab}	0.30 ^b	0.21 ^b	0.20 ^b
Xileno	MS, RI	1362	0.02 ^b	0.17 ^a	0.09 ^{ba}	0.06 ^b	0.04 ^b	0.05 ^b

^{a-c} Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

² Valor del área integrada (valor medio x 10^5).

³ Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

⁴ Calculado según el Índice de Retención de Kovats

⁵ PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

Otra de las familias químicas identificadas en la bebida de almendra fueron las **cetonas** (Tabla 4.14), las cuales proceden fundamentalmente de la oxidación del ácido oleico. La 2-propanona, conocida comúnmente como acetona, se produce por reacciones de oscurecimiento no enzimático a través de la caramelización de la glucosa (Badui, 2006). A este compuesto, se le atribuyen aromas dulces y frutales. En otros trabajos, se han identificado algunas cetonas, que también fueron encontrados en el presente estudio, tales como la 2-decanona (Agila y Barringer, 2012 y Beck *et al.*, 2011) y 2-heptanona y 2-octanona (Beck *et al.*, 2011). La cetona más abundante en la bebida de almendra fue el 6-metil-5-hepten-ona. Este compuesto volátil se asocia a olores pungentes y a pasto en aceite de oliva, siendo detectables a 1000 µg/kg de aceite (Morales *et al.*, 2005). A pesar de que fue el compuesto más destacable en abundancia de la familia de las cetonas en el presente estudio, la variabilidad observada en los picos no permitió realizar un análisis concluyente. Se podría decir que, el tratamiento UHT, en que el área del pico fue menor favoreció su degradación a otros compuestos.

El resto de componentes, en menor abundancia que el anterior, no permitió establecer diferencias entre tratamientos.

Tabla 4.14. Abundancia² de cetonas detectadas en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos ⁵					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
3-octen-2-ona	MS, RI	1429	2.9 ^b	5.2 ^b	7.9 ^{ab}	11 ^{ba}	9.1 ^{ab}	18 ^a
2-ciclohexen-1-ona	MS, RI	2035	0.6 ^b	1.4 ^b	1.3 ^b	1.7 ^b	1.4 ^b	5.3 ^a
2-butanona	MS, RI	910	0.14 ^b	1.9 ^a	0.6 ^b	0.5 ^b	0.4 ^b	0.7 ^b
3-octanonerealona	MS, RI	1270	0.14 ^b	0.14 ^b	0.24 ^b	0.31 ^b	0.17 ^b	0.8 ^a
2,3-octanediona	MS, RI	1335	0.14 ^b	6.8 ^{ab}	6.1 ^{ab}	8.3 ^{ab}	6.4 ^{ab}	13 ^a
2-decanona	MS, RI	1510	0.1 ^b	0.1 ^b	0.06 ^b	0.07 ^b	0.06 ^b	1.3 ^a

^{a-c} Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

² Valor del área integrada (valor medio $\times 10^5$).

³ Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

⁴ Calculado según el Índice de Retención de Kovats

⁵ PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

Tabla 4.15. Abundancia² de piridinas, pirrolidinas y piperidinas detectadas en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos ⁵					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
2,4,6-trimetilpiridina	MS, RI	1387	5.4 ^{ab}	9.3 ^a	1.9 ^{ab}	0.9 ^{ab}	7 ^{ab}	1.1 ^b
Acetilpirrolidina	MS, RI	1766	0. ^a	0.05 ^b	0.3 ^a	0.23 ^b	0.3 ^{ab}	0.3 ^{ab}
2-metilpiperidina	MS, RI	2122	0. 3 ^b	0.36 ^b	0.3 ^b	0.51 ^b	0.5 ^b	1.4 ^a
3-fenil-5-butilpiridina	MS, RI	2207	0.1 ^b	0.27 ^a	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b

^{a-c} Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

² Valor del área integrada (valor medio x 10⁵).

³ Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

⁴ Calculado según el Índice de Retención de Kovats

⁵ PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

De la familia de los **hidrocarburos** se identificaron tres compuestos, dos alcanos y un alqueno. El tetradecano (más abundante) y 3-etil-2-metil-1,3-hexadieno no mostraron cambios ante los tratamientos aplicados (Tabla 4.16). De manera contraria, el heptadecano se incrementó notablemente con los tratamientos UHPH en relación a los licuados PB y PA, en los que no se observaron diferencias estadísticas, al igual que entre los licuados tratados por UHPH ($p \geq 0,05$). El tetradecano, Se identificó también en aceite de almendra, pero aparentemente no contribuye al aroma de este producto (Picuric y Milavonovic, 1993).

La familia química en la que se identificaron menos volátiles fue la de los **terpenos** (limoneno y alfa-pineno), a los que no les afectaron los diferentes tratamientos utilizados en este estudio ($p \geq 0,05$). (Tabla 4.18).

Otro volátil fue el 2-acetilpirrol, (Tabla 4.15) tampoco afectado por ninguno de los tratamientos aplicados. Sin embargo, el 2, 4, 6-trimetilpiridina aumentó significativamente en los licuados tratados por UHPH, y especialmente en el tratamiento de 200 MPa, 75 °C ($p < 0,05$) comparados con PA. También aumentó el compuesto 3-fenil-5-t-butilpiridazina en los licuados UHPH en relación PB y PA, siendo más marcado este aumento en el tratamiento 200 MPa, 55 °C

Tabla 4.16. Abundancia² de alcanos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos ⁵					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
2-metil-pentano	MS, RI	580	1.4 ^b	4.2 ^a	4.2 ^a	3.9 ^a	3.7 ^a	5.6 ^a
4-metil-heptano	MS, RI	695	0.9 ^a	0.3 ^b	0.12 ^b	0.3 ^b	0.1 ^b	0.45 ^b
Tetradecano	MS, RI	1404	0.3 ^{ab}	0.2 ^{ab}	1.5 ^b	0.17 ^b	0.2 ^{ab}	0.24 ^{ab}
Decano	MS, RI	1014	0.3 ^b	1.9 ^b	0.3 ^b	1.9 ^b	4 ^{ab}	13 ^a
Hexadecano	MS, RI	1555	0.15 ^b	0.06 ^b	0.06 ^b	0.14 ^b	0.15 ^b	3.1 ^a
3-metil-heptano	MS, RI	749	0.06 ^b	0.3 ^a	0.06 ^b	0.07 ^b	0.04 ^b	0.08 ^b
Ciclododecano	MS, RI	1968	0.06 ^b	0.04 ^b	0.06 ^b	1.2 ^b	0.1 ^b	0.2 ^a
Alquenos								
3-etil-2-metil-1,3-hexadieno	MS, RI	1448	0.6 ^b	1.5 ^b	0.8 ^b	1.4 ^b	1.2 ^b	8.6 ^a

^{a-c} Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

² Valor del área integrada (valor medio $\times 10^5$).

³ Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

⁴ Calculado según el Índice de Retención de Kovats

⁵ PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

Los **ácidos carboxílicos** son otra familia detectada en el perfil volátil de las bebidas de almendra (Tabla 4.17). Los más destacables fueron el ácido octanoico y el nonanoico, a los que no les afectaron los tratamientos UHPH comparados con los tratados por PA. Sin embargo, las bebidas de almendra tratada por UHT presentaron un descenso cuando se compararon con las muestras tratadas por los demás tratamientos ($p \geq 0,05$). Cabe suponer que las condiciones del tratamiento UHT, propiciaron la formación de otros compuestos a partir de éstos ácidos, por lo cual disminuyó su abundancia. Los ácidos octanoico y nonanoico se forman por oxidación del octanal y nonanal respectivamente en presencia de oxígeno y se ha identificado en aceite de almendra oxidado (Beck et al., 2011), aunque también se ha relacionado con el olor dulce en leche de soja (Poliseli-Scopel et al., 2013). El ácido octanoico ha sido asociado con olores grasos y aceitosos (Morales et al., 2005).

Los **terpenos** se derivan de la condensación del pirofosfato isopentenílico, el cual es transformado a pirofosfato de geranilo el cual da lugar a muchos terpenos por acción de diversas enzimas como las oxidorreductasas. En ésta bebida se identificaron el α -pineno y el junipeno. El α -pineno sufrió un incremento cuando se trataron las muestras por UHT comparadas con las muestras tratadas por PA y UHPH. Por otra parte, el junipeno, se comportó de manera contraria al α -pineno. El junipeno mostró un decremento en las muestras tratadas por UHT comparadas con las tratadas por PA y UHPH. La alta temperatura (142 °C) y el tiempo de retención (6 s) empleados en el tratamiento de UHT pudieron favorecer el incremento del α -pineno, el cual no fue afectado por los parámetros utilizados en los tratamientos UHPH y PA. De manera contraria, las condiciones de las muestras tratadas por UHT pudieron causar la degradación del junipeno, disminuyendo la abundancia de éste compuesto en dichas muestras.

Tabla 4.17. Abundancia² de ácidos carboxílicos, terpenos, esterés, furanos y otros compuestos detectados en la fracción de volátiles de la bebida de almendra

Compuesto	ID ³	KI ⁴	Tratamientos ⁵					
			PA	UHT	200, 55	200, 75	300, 55	300, 75
Ácidos carboxílicos								
Ácido octanoico	MS, RI	2064	1.2 ^a	0.3 ^b	0.8 ^{ab}	1.0 ^a	7 ^{ab}	1.3 ^a
Ácido nonanoico	MS, RI	2171	0.8 ^a	0.3 ^b	0.6 ^{ab}	0.7 ^a	0.5 ^{ab}	0.8 ^a
Terpenos								
α-pineno	MS, RI	1030	0.05 ^b	0.6 ^a	0.2 ^b	0.3 ^{ab}	0.2 ^b	0.2 ^b
Junipeno	MS, RI	1616	0.7 ^{ab}	2.0 ^b	0.7 ^{ba}	0.9 ^a	0.8 ^a	1.0 ^a
Lactona								
γ-caprolactona	MS, RI	1752	0.6 ^a	0.06 ^b	0.5 ^a	0.6 ^a	0.5 ^a	0.8 ^a
Furanos								
2-metil-tetrahydrofurano	MS, RI	875	0.0 ^b	0.3 ^{ab}	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b	0.8 ^a
Otros								
Cloroformo	MS, RI	1032	0.7 ^b	2.4 ^a	0.7 ^b	1.0 ^b	0.9 ^b	1.5 ^{ab}
Bromodichlorometano	MS, RI	1168	0.4 ^{ba}	0.7 ^a	0.3 ^b	0.4 ^{ab}	0.3 ^b	0.5 ^{ab}

^{a-c} Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos.

² Valor del área integrada (valor medio $\times 10^5$).

³ Identificación: MS espectro de la masa, RI = Índice de retención comparado con la base de datos (Wiley RegistryTM of Mass Spectral Data, 6th edition).

⁴ Calculado según el Índice de Retención de Kovats

⁵ PB=Producción Base, PA= Producto pasteurizado, 200, 55 = UHPH (200 MPa, 55 °C) y 200, 75 = UHPH (200MPa, 75 °C) y 300, 55 = UHPH (300 MPa, 55 °C) y 300, 75 = UHPH (300MPa, 75 °C).

Generalmente los **esterés** se pueden generar a partir de aminoácidos libres con la participación de varias enzimas como la alcohol acetiltransferasa (cataliza la transferencia de grupos acilo), la α-aminotransferasa, la α-ceto descarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa, entre otras. La γ-caprolactona (Tabla 4.17) es un componente aromático de las flores y una feromona de insecto (Nuñez y Martin, 1990). Este compuesto mostró una

tendencia similar en la muestras de bebida de almendra tratadas por UHPH comparada con las tratadas por PA. Sin embargo, las muestras tratadas por UHT, presentaron una disminución significativa ($p < 0.05$) comparada con el resto de los tratamientos empleados. Las condiciones del tratamiento UHT pudieron provocar la degradación de éste compuesto generando otros volátiles diferentes.

Furanos

De la familia de los furanos se identificó un solo componente, el 2-metil-tetrahidrofurano (Tabla 4.17), el cual se considera indicadore de la intensidad de los tratamientos térmicos, ya que se pueden formar como productos de la reacción de Maillard (Achouri *et al.*, 2007 y Yuang y Chang, 2007^a). La conversión de azúcares tales como fructuosa y en menor grado la glucosa actúan como precursores en la formación de furanonas.

2-metil-tetrahidrofurano, aumentó progresivamente en los licuados tratados térmicamente y UHPH, pero este aumento sólo fue significativo en los tratados por UHPH a 200 MPa 75 °C, comparado con el resto de los tratamientos aplicados. Los parámetros empleados durante el tratamiento UHPH (300 MPa, 75 °C) pudieron provocar el incremento del volátil mencionado. Este compuesto no fue afectado por las condiciones utilizadas en las muestras tratadas térmicamente y las tratadas y las restantes tratadas por UHPH.

4.3 Eficacia de los tratamientos UHPH en la letalidad de microbiota potencialmente alterante de la bebida de almendra

Las esporas bacterianas (= endosporas) son contaminantes comunes en los alimentos y las fuentes de contaminación en la cadena alimentaria son el suelo, las heces, los propios alimentos y los ingredientes o aditivos utilizados en su elaboración. Debido a la ubicuidad y a su resistencia y la persistencia durante períodos largo de tiempo, es casi imposible de evitar su presencia como contaminante de los alimentos y de las instalaciones alimentarias (Carlin, 2011). La concentración de esporas en algunos alimentos e ingredientes como especias, alimentos vegetales deshidratados o harinas puede ser muy alta (superior a 10^2 a 10^3 esporas /g) y debido a su implicación en tox infecciones alimentarias y en el deterioro de los alimentos, la inactivación de las esporas de *Bacillus* spp. es un objetivo importante en la elaboración de alimentos, aunque para ello se requieren tratamientos tecnológicos intensos que pueden tener efectos negativos sobre su perfil sensorial y nutricional (Postollec *et al.*, 2012). Las endosporas bacterianas inactivas (en fase durmiente) son extremadamente resistentes al calor y otros tratamientos de conservación, tales como la irradiación, los productos químicos o la presión, en comparación con las células vegetativas (Chaves-López *et al.*, 2009) y dicha resistencia, especialmente al tratamiento térmico, puede atribuirse a tres factores principales: la deshidratación de los protoplastos, la mineralización de la célula y la adaptación térmica (Oomes *et al.*, 2007)

Recientemente se han realizado diversas investigaciones en relación a los efectos de la homogeneización a alta presión sobre la inactivación de esporas de diferentes especies de bacterias esporuladas obtenidas en colecciones de cultivos tipo, en licuado de leche y zumo de naranja (Amador-Espejo *et al.*, 2014b, Roig-Sagues *et al.*, en prensa). En estas investigaciones se observó que hay cierta resistencia de las esporas a este tratamiento UHPH, siendo aconsejable para conseguir los mejores resultados la combinación del efecto de la presión y sobre todo de la temperatura de entrada del producto. En nuestro estudio, se realizó la evaluación del efecto de la UHPH en la letalidad de esporas propias del licuado de almendra, siendo el objetivo de este estudio por una parte aislar e identificar las formas esporuladas características y propias del licuado y que mostraron resistencia al tratamiento

de UHPH a 300 MPa, para posteriormente determinar su letalidad a esta presión con temperaturas de entrada de 55, 65 75 y 85°C.

Entre las esporas mesófilas aisladas de los licuados tratados a 300 MPa a 55 y 65°C se identificaron varios géneros y especies de *Bacillus*, siendo los más frecuentemente aislados *B. cereus*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus* spp., lo que coincide parcialmente con los determinados por Postollec *et al.* (2012) quienes investigaron la incidencia de bacterias formadoras de esporas en 90 productos alimenticios (materias primas, ingredientes deshidratados y alimentos procesados), siendo las especies más frecuentemente *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*, especialmente en productos vegetales deshidratados. *Bacillus cereus*, se encuentra de forma habitual en los alimentos frescos y procesados debido a la elevada resistencia de sus esporas tanto a los agentes físicos como químicos. Este organismo se asocia a dos tipos de síndromes gastrointestinales, denominados de tipo emético y tipo diarreico (Ju *et al.*, 2008; De Jonghe *et al.*, 2010). *B. subtilis* se considera una causa común de deterioro de los alimentos. Sus esporas son resistentes al calor, por lo que a suele frecuentemente se utiliza como microorganismo de referencia para evaluar la eficacia de los procesos tecnológicos cuya finalidad es prolongar la vida útil de los alimentos procesados (Jagannath *et al.*, 2005).

En la Tabla 4.18 se muestran las temperaturas de entrada utilizadas en este estudio (T_i), la temperatura máxima alcanzada por la muestra después de pasar a través de la válvula (T_v) y la temperatura final tras el intercambiador de calor (T_f), así como el incremento de la temperatura observado para cada 100 MPa de presión aplicada ($\Delta T/100$ MPa), el cual aunque de forma no lineal disminuyó a medida que aumentaba la temperatura de entrada. Ello coincide con los resultados obtenidos por otros autores que aplicaron tratamientos UHPH con el mismo diseño de la válvula de homogeneización (Stansted Fluid Power Ltd) y temperaturas de entrada similares en leche y zumo de naranja (Amador-Espejo *et al.* 2014b, Roig-Sagues *et al.* En prensa). El aumento de temperatura que se produce durante los tratamientos de UHPH se ha estudiado extensamente y es una consecuencia de diferentes fenómenos que ocurren simultáneamente en el válvula de homogeneización, tales como cavitación, tensión de cizallamiento, y cambios en energía cinética (Diels *et al.*, 2003;. Dumay *et al.*, 2013).

Tabla 4.18 Control de la temperatura y de la presión durante el procesado UHPH de la bebida de almendras.

Presión (MPa)	Ti (° C)	Tv (° C)	Tf (° C)	$\Delta T/100$ Mpa
312.61 ± 6.59	55.31 ± 0.69	110.39 ± 1.69	10.25 ± 1.50	18.36
308.83 ± 2.61	65.60 ± 0.32	120.50 ± 0.47	11.88 ± 0.71	18.30
311.06 ± 7.87	75.81 ± 1.77	130.05 ± 1.82	13.78 ± 1.57	18.08
310.78 ± 8.91	83.84 ± 2.61	136.22 ± 2.18	15.78 ± 1.65	17.46

Ti: Temperatura de entrada; Tv: temperatura tras la válvula de homogeneización; Tf: temperatura tras el intercambiador de calor

Las esporas de *B. cereus*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus spp*, se inocularon en la bebida de almendra esterilizada, con un recuento inicial entre 5-6 log ufc/mL. Con el fin de determinar la eliminación total de las cepas inoculadas y la posible recuperación de células subletalmente dañadas, las muestras tratadas por UHPH se incubaron durante 10 días a 30 °C. Todos los tratamientos aplicados causaron una reducción significativa en todas las cepas inoculadas ($p < 0.05$), observándose que el incremento en la Ti produjo un incremento significativo ($p < 0.05$) en la letalidad de las esporas, hasta conseguir su completa la inactivación (Figura 4.4). Como se comentó anteriormente, el incremento de temperatura producido en el licuado de almendra tras pasar por la válvula de homogeneización, aunque con un período de tiempo corto, pudo tener un efecto notable en el grado de inactivación de las esporas. Este efecto también ha sido observado en otros trabajos realizados con esporas, concretamente de *Bacillus licheniformis* (Feijoo *et al.*, 1997), de *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. sporothermodurans*, *B. subtilis* y *Geobacillus stearothermophilus* (Amador Espejo *et al.*, 2014), en *B. subtilis* y *G. stearothermophilus* (Georget *et al.*, 2014) y *Alysiclobacillus spp* (Roig-Sagués *et al.*, en prensa).

También se apreciaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el grado de letalidad entre las cepas evaluadas bajo las mismas condiciones de UHPH, que puede ser atribuido a las diferencias entre las cepas en su resistencia a este tipo de tratamiento. El microorganismo más sensible fue *Lysinibacillus spp*, el cual presentó su letalidad máxima a partir de los 300 MPa 65 °C, consiguiendo la esterilidad del producto (Figura 4.4). Entre *B. subtilis* y *B.*

cereus no se observaron diferencias en la letalidad a 65, 75 y 85°C, consiguiendo la letalidad completa a partir de los 75 °C.

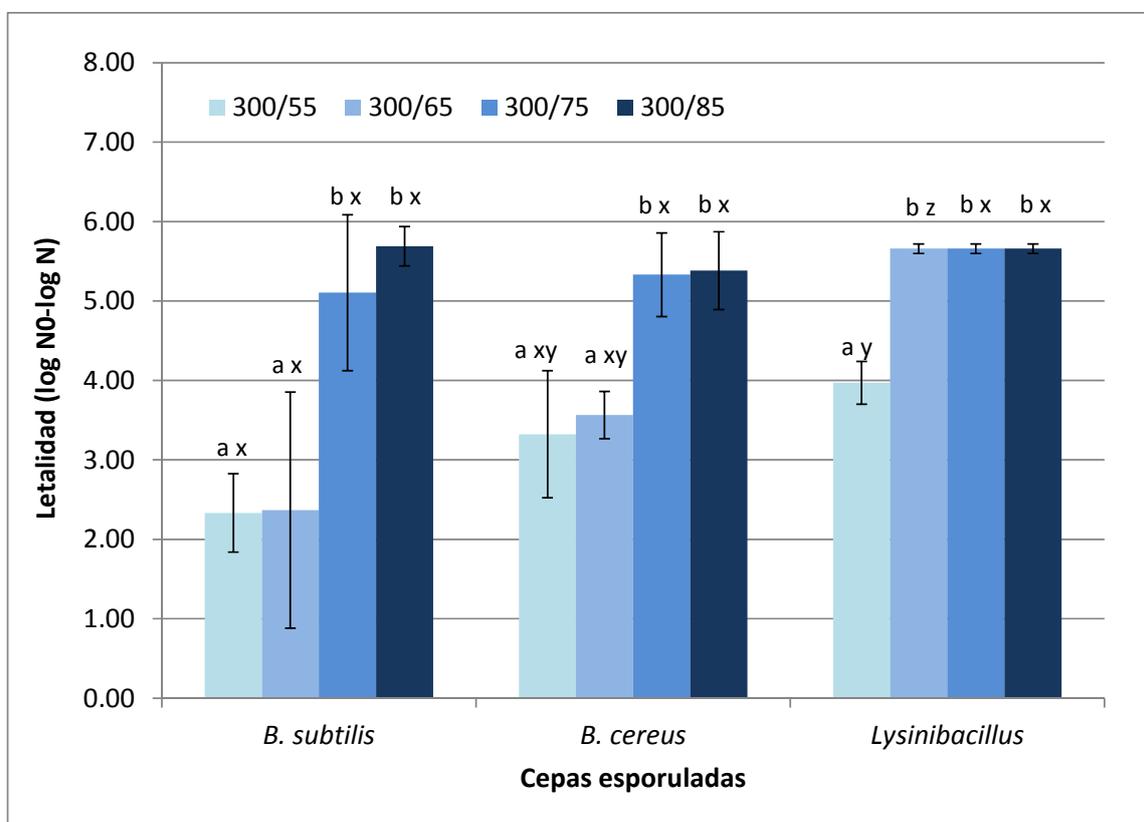


Figura 4.4. Letalidad de los tratamientos UHPH a 30 MPa, 55, 65, 75 y 85 °C sobre esporas de *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus spp.* (Se representan los valores medios \pm desviación estándar). a y b: Para cada cepa de *Bacillus* con diferentes tratamientos, la media de las barras con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$). x-z: para cada temperatura de entrada entre diferentes cepas, la media de las barras con diferente letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Amador-Espejo et al. (2014a) evaluaron el efecto de diferentes temperaturas de entrada desde 55° C a 85° C sobre la eficacia de un tratamiento de 300 MPa UHPH frente a diferentes microorganismos esporulados inoculados en leche (*B. cereus*, *Bacillus licheniformis*, *sporotheodurans Bacillus*, *B. subtilis* y *Geobacillus stearothermophilus*, determinando, de forma similar a nuestro estudio, que el efecto letal de los tratamientos incrementaron notablemente cuando las temperaturas de entrada aumentaron por encima de 65°C, consiguiendo una reducción superior a 5 unidades logartímicas y esterilidad en la

mayoría de cepas a 75°C, a excepción de *B. subtilis* y *Geobaacillus stearothermophilus* en los que sólo se consiguió su inactivación a 85°C. Al comparar la letalidad de *B. subtilis* CECT 4002, por lo tanto de colección, inoculado en leche en relación al *B. subtilis* aislado de licuado de almendra e inoculado en esta matriz, se observó que este último es más susceptible a los tratamientos UHPH aplicados en las mismas condiciones, aunque la susceptibilidad de las esporas a los tratamientos tecnológicos pueden diferir en función de la matriz en la que están inoculados (Sharma et al. 2009).

Hay divergencia de opiniones acerca del mecanismo de acción de los tratamientos UHPH en la letalidad de las esporas, y de si la elevada letalidad obtenida a altas temperaturas de entrada es debida al efecto del incremento de la temperatura tras el paso por la válvula de homogeneización. Chaves-López *et al.*, (2009) postularon que cuando las esporas pasan a través de la válvula de homogeneización se puede estimular la germinación de las esporas como resultado de la liberación del ácido picolínico presente en el núcleo de las esporas y la absorción de agua, lo que hace que sean más sensibles a las fuerzas mecánicas y de calor. Sin embargo, Georget et al. (2014) demostraron que al menos en *B. subtilis* y *G. stearothermophilus* no se produce de forma significativa la inducción de la germinación independientemente de la presión (entre 200 y 350 MPa) y de la temperatura de entrada (entre 37 y 85 °C).

Chaves-López *et al.*, (2009), evaluaron la influencia del tratamiento de UHPH a 150 MPa aplicada uno, dos o tres ciclos, en la inactivación de esporas de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* inoculadas en agua destilada esterilizada, obteniendo una reducción de sólo 0,5 log ufc/mL para *B. subtilis* y 0,3 ufc/mL para *B. cereus*, mientras que al aplicar tres ciclos la reducción aumentó a 5 unidades logarítmicas. Según estos autores la ultra-rápida depresión producida en las esporas durante los tratamientos de alta presión homogeneización (HPH), podría causar una ruptura mecánica de la capa y la corteza, lo que permite que se libere ácido picolínico (DPA), componente característico de las esporas. Así al comparar, las muestras tratadas y no tratadas observaron que el tratamiento con HPH a 150 MPa se produce una liberación de un 16% al 28% de DPA, lo cual no se relaciona con la inactivación de esporas. Sin embargo, tras tres ciclos de tratamiento, no asociado a un incremento de temperatura se observó un aumento de la DPA liberado hasta un 52%, ello

junto con letalidad obtenida sugieren un posible daño irreversible de la espora en las condiciones más severas de presurización.

Sharma *et al.* (2009), en un estudio realizado con *Clostridium sporogenes* inoculado en licuado de soja tratado mediante UHPH con un equipo con un diseño muy diferente al de UHPH-Stansted, determinó que la presión tuvo un papel significativo en la inactivación de las esporas, siendo el valor D a 121 ° C determinado por el método de tubo capilar mucho mayor que el calculado al aplicar presiones de 207 MPa y 276 MPa. Según estos autores el menor valor D observado en las muestras tratadas por UHPH, se puede asociar a los múltiples efectos de las fuerzas mecánicas de cizalla que favorecieron el aumento de la inactivación de las esporas de *C. sporogenes*, aunque consideraron igualmente, que la temperatura era un factor especialmente significativo en el aumento de la inactivación de las esporas.

Entre los estudios en los que se aplicaron equipos UHPH Stansted hay una cierta incertidumbre del efecto sinérgico de la presión y la temperatura. Amador-Espejo *et al.* (2014b) consideraron que era difícil evaluar por separado el efecto del calor y el efecto mecánico sobre la espora en los procesos de inactivación en los tratamientos UHPH a temperaturas tan elevadas y con un tiempo de retención tan corto y poco preciso (<0.5 s después la válvula de homogeneización). Igualmente, Roig-Sagués *et al.* (en prensa) tras la revisión bibliográfica del valor D y Z de los tratamientos térmicos de esporas de *Alysiclobacillus* concluyeron que ante la variabilidad de los valores D y Z determinados por los diferentes autores, no podía afirmarse que hubiera un efecto sinérgico entre la presión y la temperatura, aunque matizan que si se tiene en cuenta el hecho de que el tiempo de retención del producto a la temperatura máxima no puede ser determinada con precisión, y que los valores D también dependen de las cepas, no puede desestimarse la posibilidad de que la presión juegue un cierto papel en el efecto letalidad de las esporas. Sin embargo, Georget *et al.* (2014) determinaron que no existía correlación alguna entre la presión (entre 200 y 350 MPa) y sí con la temperatura alcanzada tras la válvula en la inactivación de las esporas de *B. subtilis* y *Geobacillus stearothermophilus*, considerando que el tiempo de retención calculado en su equipo fue de 0,24 s. Paralelamente esos autores realizaron la determinación del valor D y Z de ambas cepas de esporas en una solución tampón tratadas térmicamente, lo que les permitió calcular la reducción que se podría producir por el

incremento de la temperatura tras el tratamiento UHPH con un tiempo de retención de 0,24 s, concluyendo que la temperatura fue el factor determinante en la letalidad de las esporas en los tratamientos UHPH. A pesar de todo, según estos autores parece que hay una presión umbral mínima que debe ser alcanzada (300 MPa) para que comience a producirse dicha inactivación de las esporas, siempre y cuando vaya asociada a temperaturas de entrada superiores a 55°C, que coincide con los resultados observados en este estudio.

Si se tiene en cuenta los valores de referencia de la literatura, especialmente de los estudios más recientes, para las dos cepas más resistentes en nuestro estudio, *B. subtilis* y *B. cereus*, se puede calcular la letalidad asociada a la temperatura alcanzada tras la válvula (T_v), considerando que la incerteza del tiempo de retención calculado es de entre 0,3 y 0,5 s (Tabla 4.19). Los valores D y Z de *B. subtilis* se han calculado para dos grupos (sensibles y más termoresistentes) según la evaluación realizada en 15 cepas diferentes por Berendsen *et al.* (2014) y según los valores propuestos por Georget *et al.* (2014), que utilizaron la cepas de *B. subtilis* tanto para evaluar su valor D y Z asociado al tratamiento térmico como para realizar la evaluación de su letalidad mediante tratamiento UHPH. En el caso de *B. cereus* los valores D y Z se han calculado según la evaluación realizada por Luu-Thi *et al.* (2014) en 36 cepas de *B. cereus*, seleccionando los valores D y Z de los grupos filogenéticos de carácter mesofílico y considerando el valor mínimo y máximo determinado en su letalidad, así como de los valores propuestos por Van Asselt y Zwietering (2006) los cuales realizaron una revisión exhaustiva de los valores D y Z en diversos artículos publicados.

Al calcular los valores de letalidad asociada a los tratamientos UHPH, se aprecia que al menos a las temperaturas de entrada de 55° y 65°, cuya T_v es de aproximadamente 110 °C y 120 °C, se observó que la letalidad fue muy superior a la que se produciría sólo por el efecto de la temperatura en ambas cepas (Tabla 4.19). A temperaturas de entrada de 75 o superiores ($T_v > 130$ °C) se observa una cierta disparidad en función de los cálculos estimados en los diferentes estudios, de forma que según los valores D y Z considerados, en algunos casos la temperatura sería el único factor que podría explicar la eliminación de las esporas en los tratamientos UHPH, y en otros se explicarían por la acción sinérgica de la temperatura y la presión de homogeneización, por lo que coincidiendo con Roig-Sagués *et al.* (en prensa) no puede desestimarse que la presión juegue un cierto papel en el efecto de la letalidad de las esporas en los tratamientos UHPH.

Tabla 4.19. Letalidad calculada (log ufc/mL) en *B. subtilis* y *B. cereus* en función de la temperatura alcanzada tras la válvula de homogeneización (Tv) en los tratamientos UHPH a 300 MPa, a 55, 65, 75 y 85 °C.

Cepa	Tv (°C)	Letalidad UHPH	D calculada (s)	Letalidad (0.3 S)	Letalidad (0.5 s)	Referencia
<i>B. subtilis</i>	110.4	2.33	2.24	0.13	0.22	A
			309.91	0.00	0.00	B
			11.05	0.03	0.05	c
	120.5	2.37	0.30	1.00	1.67	a
			41.37	0.01	0.01	b
			1.23	0.24	0.41	c
	130.1	5.11	0.04	6.73	11.22	a
			6.17	0.05	0.08	b
			0.15	1.94	3.24	c
	136.2	5.70	0.01	23.00	38.33	a
			1.81	0.17	0.28	b
			0.04	7.42	12.37	c
<i>B. cereus</i>	110.4	3.32	5.36	0.06	0.09	d
			52.38	0.01	0.01	e
			14.90	0.02	0.03	f
	120.5	3.56	0.52	0.57	0.96	d
			5.11	0.06	0.10	e
			2.28	0.13	0.22	f
	130.1	5.33	0.06	5.18	8.63	d
			0.57	0.53	0.88	e
			0.39	0.78	1.29	f
	136.2	5.38	0.01	21.43	35.71	d
			0.14	2.19	3.65	e
			0.12	2.44	4.06	f

B. subtilis: a) T:120°C; D: 0.33 s; z=11.56 °C (Berendsen et al., 2014); b) T:120°C; D: 45.70 s; z=11.56 °C; c) T:120°C; D: 1.37 s; z=10.60 °C Georget et al (2014)

B. cereus: d) T:120°C; D: 0,59. s; z=10 °C (Luu-Thi et al. (2014)); e) T:120°C; D: 5,73. s; z=10 °C (Luu-Thi et al. (2014)); f) T:120°C; D: 2,50 s; z=12.4 °C

4.4 Estudio de la calidad de licuados de almendra durante el almacenamiento

Después de analizar los resultados de los estudios anteriores, se seleccionaron las condiciones de tratamientos UHPH que podrían considerarse como alternativas a la pasteurización. Los tratamientos UHPH 200 MPa, 55 °C y 200 MPa, 75 °C corresponderían a una pasteurización baja y alta respectivamente. Como ya se ha descrito en materiales y métodos, se partió de un licuado PB que se utilizó para realizar los tratamientos UHPH correspondientes, un tratamiento térmico de pasteurización convencional (90 °C, 90 s) dejando una porción de PB para un mejor análisis de los resultados. Estas muestras se almacenaron a 4 °C en suficientes recipientes individuales para su seguimiento posterior los días 1, 7, 14, 21 y 28 d. Los análisis realizados fueron destinados a determinar la calidad global de los licuados así como su vida útil.

4.4.1 Calidad microbiológica y evaluación del pH

En la Tabla 4.20 se muestra la evolución del recuento de las mesófilas aerobias totales, de las esporas aerobias, y de *Bacillus cereus* durante 21 días de almacenamiento a 4 °C de bebidas de almendra tratadas por UHPH en comparación con el producto base (BP) y con las muestras pasteurizadas. Las muestras de los diferentes tratamientos, presentaron desestabilización física, por lo que se decidió no tomar en cuenta los valores obtenidos en el día 28.

Para todos los grupos microbianos se observó una disminución significativa en el día 1 para las bebidas de almendra que se pasteurizaron y se trataron a 200 MPa, 55 y 200, 75 °C, en comparación con el producto base. En el caso de las enterobacterias, el efecto de los tratamientos tecnológicos produjeron su completa reducción (datos no mostrados), en consonancia con los resultados obtenidos por Poliseli-Scopel *et al.* (2012) en leche de soja en la que se aplicó tratamientos similares. También Pereda *et al.* (2007) obtuvieron la completa inactivación de coliformes al aplicar tratamientos de UHPH de 200 y 300 MPa a temperaturas de entrada de 30 y 40°C, sin embargo Smiddy *et al.* (2007) no consiguieron reducirlos significativamente tras tratar leche de vaca cruda a 200 MPa y 55 °C.

El recuento inicial de bacterias mesófilas en el BP fue de 5.25 log ufc/mL. Entre ellos, los grupos predominantes probablemente eran las esporas y entre ellas *B. cereus* (3.31 log y 2.92 log ufc/mL, respectivamente). Resultados que han sido muy similares a los obtenidos por otros autores en leche de soja (Ferragut *et al.*, 2011, Poliseli-Scopel *et al.*, 2012). Si bien los recuentos

de los diferentes microorganismos en las muestras tratadas por UHPH a 200 MPa 55 °C fueron significativamente diferentes de aquellas muestras pasteurizadas, el tratamiento UHPH a 200 MPa 75° C fue el más eficaz frente a todos los grupos de bacterias, especialmente en relación a la reducción de *B. cereus* en el que se obtuvo su reducción total, observando diferencias significativas ($p < 0.05$) con las muestras tratadas por UHPH 200 MPa, 55 °C y las pasteurizadas.

Durante la conservación a 4°C, las muestras de BP mostraron un aumento en el recuento total de bacterias mesófilas (de 5.25 a 6.72 ufc/mL en el día 14), así como en las esporas (3.31 a 4.8 log ufc/mL) y en *B. cereus* (2.92-6.92 log ufc/mL), que coincidió con una disminución de pH especialmente en el día 21 (Tabla 4.20). El recuento total de bacterias, esporas y *B. cereus*, aumentaron progresivamente en las muestras pasteurizadas y UHPH 200 MPa, 55 °C durante el almacenamiento a 4 °C, aunque en general, no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los recuentos en función del tratamiento aplicado, salvo una excepción, en el día 21, en el que se observó que el recuento de bacterias mesófilas totales fueron significativamente mayores en las muestras tratadas por UHPH a 200 MPa 55 °C respecto a las pasteurizadas. En ambos tratamientos se produjo durante el almacenamiento la recuperación de células vegetativas sanas, subletalmente lesionadas o la germinación de esporas, al contrario de los resultados obtenidos por Polisel-Escopel et al. (2013) el leche de soja quienes consiguieron la inactivación completa. Ello puede ser debido a la diferente composición química y de la microbiota nativa entre la leche de soja y la bebida de almendra.

Se podría concluir que el aumento de la temperatura de entrada a 75 ° C en los tratamientos de UHPH a 200 MPa es más eficaz en la prevención de la proliferación de la microbiota de alteración de la bebida de almendra, prolongándose así la vida comercial del producto.

Table 4.20. Evolución del recuento de bacterias aerobias mesófilas, esporas aerobias mesófilas y and *B. cereus* (log cfu/mL) en el product base (BP), pasteurizado (PA) and UHPH (200 MPa, 55 y 75 °C) en bebidas de almendras conservadas a 4 °C durante 21 d.

		Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
Bacterias aerobias mesófilas totales	BP	5.25±0.65 ^{aB}	5.00±0.14 ^{aB}	6.72±0.23 ^{aA}	NE
	PA	3.16±0.10 ^{bD}	4.07±0.17 ^{bC}	4.47±0.08 ^{bB}	4.80±0.14 ^{bA}
	200 MPa/55 °C	2.92±0.06 ^{cC}	3.06±0.16 ^{cC}	4.90±0.18 ^{bB}	5.80±0.10 ^{aA}
	200 MPa/75 °C	2.50±0.20 ^{dC}	2.22±0.08 ^{dC}	2.90±0.50 ^{cC}	3.40±0.20 ^{cA}
Esporas aerobias mesófilas	BP	3.31±0.10 ^{aB}	3.23±0.14 ^{aB}	4.58±0.12 ^{aA}	4.80±0.14 ^{aA}
	PA	2.65±0.07 ^{bB}	2.47±0.24 ^{bB}	2.45±0.47 ^{bA}	3.23±0.38 ^{bA}
	200 MPa/55 °C	2.28±0.17 ^{cB}	3.10±0.27 ^{aA}	2.80±0.04 ^{bA}	2.93±0.21 ^{bA}
	200 MPa/75 °C	1.60±0.26 ^{dA}	2.17±0.16 ^{bA}	2.41±0.23 ^{abA}	2.01±0.56 ^{bA}
<i>B. cereus</i>	BP	2.92±0.64 ^{aC}	4.89±0.51 ^{aB}	6.55±0.52 ^{aA}	6.92±0.27 ^{aA}
	PA	1.81±0.04 ^{bA}	1.91±0.34 ^{bA}	2.91±0.09 ^{bA}	2.16±0.04 ^{bA}
	200 MPa/55 °C	0.99±0.08 ^{cB}	1.56±0.70 ^{bA}	2.20±0.70 ^{bA}	2.10±0.05 ^{bA}
	200 MPa/75 °C	ND ^d	ND ^c	ND ^c	ND ^c

NE: No evaluada

ND: No Detectado (< 0.5 ufc/mL)

a-d: Diferentes superíndices en la misma fila, indica diferencia significativa en cada grupo microbiano durante su almacenamiento ($p < 0.05$).

A-C: Diferentes superíndices en la misma columna, indica diferencia significativa entre los tratamientos aplicados de cada grupo microbiano ($p < 0.05$).

En relación al pH mostró estabilidad en su valor (alrededor de 7.3), durante los primeros 14 días de almacenamiento en las muestras de bebida de almendra (Tabla 4.21). Sin embargo, tanto el producto base como las muestras pasteurizadas disminuyeron significativamente a partir del día 21. Sin embargo, en las bebidas de almendra tratadas por UHPH, la disminución significativa de pH se observó en el día 28. La reducción en el pH, parcialmente puede estar relacionada con la producción de ácido durante el crecimiento de los microorganismos, aunque no justificaría las diferencias entre las muestras pasteurizadas y tratadas por UHPH a 200 MPa y 55C. Además, se puede asociar a la desestabilización observada en las bebidas de almendra en el día 28. La tendencia en el crecimiento de los microorganismos asociada a la disminución en el pH fue similar a la observada por Poliselis-Scopel *et al.* (2013) en leche de soja tratada en condiciones UHPH similares.

Tabla 4.21. pH de bebidas de almendra almacenadas a 4 °C, por un periodo de 28 días.

Tratamiento	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
PB	7.23 ± 0.02 ^{bb}	7.33 ± 0.03 ^{aA}	7.30 ± 0.04 ^{aA}	7.03 ± 0.01 ^{bc}	6.25 ± 0.01 ^{cd}
PA	7.28 ± 0.02 ^{aA}	7.28 ± 0.04 ^{aA}	7.22 ± 0.04 ^{aA}	7.01 ± 0.01 ^{cb}	6.10 ± 0.01 ^{dc}
200 MPa/55 °C	7.28 ± 0.04 ^{aA}	7.30 ± 0.00 ^{aA}	7.31 ± 0.05 ^{aA}	7.30 ± 0.01 ^{aA}	7.09 ± 0.01 ^{ab}
200 MPa/75 °C	7.27 ± 0.00 ^{ab}	7.28 ± 0.02 ^{aA}	7.28 ± 0.06 ^{aA}	7.29 ± 0.01 ^{aA}	7.06 ± 0.01 ^{bb}

a-d:superíndices de letras minúscula diferentes en la misma columna indica diferencia significativa de pH entre los tratamientos ($p < 0.05$).

A-D: superíndices de letras mayúsculas diferentes en la misma fila indica diferencia significativa de pH durante el almacenamientos ($p < 0.05$).

4.4.2 Estabilidad física durante el almacenamiento de las bebidas de almendra

La bebida de almendra es un extracto de las semillas de almendra en forma de una emulsión compleja de aceite en agua. En el presente estudio se adicionó lecitina como emulgente, para asegurar la estabilidad del producto por el déficit de proteína presente en el fruto. Aunque en las emulsiones el principal modo de desestabilización es el cremado, con los medios disponibles no se pudo realizar una adecuada cuantificación de este fenómeno, dado que el contenido de grasa de las bebidas de almendra fue de alrededor del 1%, y por tanto, la medida de la capa de cremado no resultó viable. A esta limitación, hay que sumar el hecho de que la centrifugación de las bebidas tratadas por UHPH no es capaz de provocar un cremado suficiente (incluso en emulsiones con mayor contenido en grasa), ya que la reducción del tamaño de las gotas de aceite impide la migración de gran parte de la fracción grasa a la superficie, incluso en condiciones de ultracentrifugación (datos no mostrados). Sin embargo, en licuados vegetales, además del cremado, otro fenómeno de desestabilización evidente, y que afecta a la calidad de los mismos, es la sedimentación de partículas sólidas procedentes de la molienda, parte de las cuales, a pesar de la etapa de filtrado, constituyen una fracción de alta densidad susceptible de provocar sedimentación. Por ello, en presente estudio, se decidió estimar la estabilidad física de las bebidas de almendra mediante la determinación de sólidos sedimentados después de la centrifugación (% p/p). Este parámetro está relacionado con la desestabilización potencial del sistema coloidal a través de los valores máximos de sedimentación que se puede producir en las

condiciones de centrifugación aplicadas. Al mismo tiempo, se realizaron observaciones visuales paralelas de la desestabilización espontánea de las bebidas de almendra durante el almacenamiento.

La bebida de almendra es un extracto de las semillas de almendra en forma de una emulsión compleja de aceite en agua. En el presente estudio se adicionó lecitina como emulgente, para asegurar la estabilidad del producto por el déficit de proteína presente en el fruto. Aunque en las emulsiones el principal modo de desestabilización es el cremado, con los medios disponibles no se pudo realizar una adecuada cuantificación de este fenómeno, dado que el contenido de grasa de las bebidas de almendra fue de alrededor del 1%, y por tanto, la medida de la capa de cremado no resultó viable. A esta limitación, hay que sumar el hecho de que la centrifugación de las bebidas tratadas por UHPH no es capaz de provocar un cremado suficiente (incluso en emulsiones con mayor contenido en grasa), ya que la reducción del tamaño de las gotas de aceite impide la migración de gran parte de la fracción grasa a la superficie, incluso en condiciones de ultracentrifugación (datos no mostrados). Sin embargo, en licuados vegetales, además del cremado, otro fenómeno de desestabilización evidente, y que afecta a la calidad de los mismos, es la sedimentación de partículas sólidas procedentes de la molienda, parte de las cuales, a pesar de la etapa de filtrado, constituyen una fracción de alta densidad susceptible de provocar sedimentación. Por ello, en presente estudio, se decidió estimar la estabilidad física de las bebidas de almendra mediante la determinación de sólidos sedimentados después de la centrifugación (% p/p). Este parámetro está relacionado con la desestabilización potencial del sistema coloidal a través de los valores máximos de sedimentación que se puede producir en las condiciones de centrifugación aplicadas. Al mismo tiempo, se realizaron observaciones visuales paralelas de la desestabilización espontánea de las bebidas de almendra durante el almacenamiento.

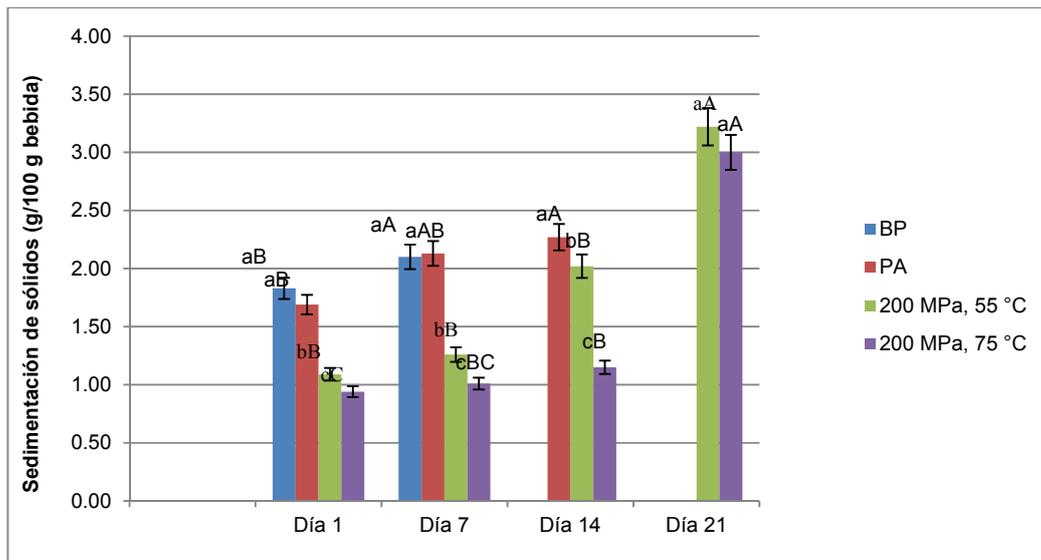


Figura 4.5. Peso de sólidos sedimentados (% p/p) de las bebidas de almendra.

a-c Letras diferentes en las barras, indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0.05$.

A-C, Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) durante el almacenamiento para un mismo tratamiento.

4.4.3. Color

La calidad de los alimentos viene condicionada por numerosos factores, algunos de los cuales afectan directamente a las características sensoriales. El color y la apariencia es la primera apreciación que el consumidor tiene de un alimento, condicionando sus preferencias e influyendo en su elección. Esta característica, a su vez está relacionada con cambios físicos y químicos experimentados en el procesado de alimentos, por lo que el color, en ocasiones puede determinar la validez de los tratamientos aplicados. Desde el punto de vista de las propiedades físicas de los sistemas coloidales, el tamaño de partícula, y en particular el de las gotas de la emulsión, está relacionado con la luminosidad del producto. Este atributo del color en las emulsiones está correlacionado con la eficiencia de la dispersión de la luz sobre las gotas, y a su vez, con el tamaño y concentración de las mismas (Chantrapornchai *et al.*, 1998).

Se evaluó el color para determinar el efecto de los tratamientos y su evolución durante el almacenamiento, a través de los parámetros CIEL*a*b*. A partir de las coordenadas L* a* b*, se

calcularon la pureza de color o saturación (C^*), el tono (h^*), y la diferencia de color entre los tratamientos UHPH y PA en los diferentes periodos de almacenamiento (Tabla 4.11).

La luminosidad (L^*) o claridad es el atributo de color asociado a la capacidad de reflejar o transmitir la luz de un objeto (Kwok *et al.*, 1999), en donde un valor cero de L^* se corresponde al negro y 100 al blanco. Los valores de las muestras tratadas por UHPH fueron mayores que los obtenidos en las muestras PA y PB ($p < 0.05$), por lo tanto, las bebidas UHPH fueron más claras. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de UHPH ($p \geq 0.05$). El incremento de luminosidad en las muestras UHPH está relacionado con la considerable reducción de tamaño de partícula experimentado por la intensa homogeneización (Poliseli *et al.*, 2013). Esta reducción causa una gran dispersión de la luz, que en suma provoca un incremento de la reflexión difusa y por tanto de la luminosidad del producto. McClements *et al.* (1998), desarrollaron un modelo teórico para predecir la luminosidad y color (rojo, en este caso) de emulsiones alimenticias y su influencia con las gotas (radio y concentración) sobre el color y encontraron que, a mayor tamaño de gotas, la eficiencia de la dispersión era menor, provocando una reducción de la luminosidad. Por tanto, el aumento de la fracción de superficie de gotas en la UHPH (por disminución del tamaño), explica el comportamiento de L^* en las bebidas de almendra.

Durante el almacenamiento (Tabla 4.22), se mantuvo la tendencia inicial de los diferentes tratamientos, así como la estabilidad en este atributo a lo largo de los 21 días de almacenamiento, especialmente en las bebidas UHPH.

Las coordenadas a^* y b^* en todas las bebidas, tuvieron valores negativos y positivos respectivamente, indicando que el verde y amarillo fueron los primarios que contribuyeron al color de las bebidas, con predominancia del amarillo. Los valores de a^* fueron significativamente ($p < 0.05$) menores en PA comparados con los tratamientos UHPH y, a su vez, la bebida 200, 75 °C presentó un valor mayor que la 200, 75 °C. Durante el almacenamiento, en general, esta coordenada experimentó un incremento en los valores en todos los tratamientos. La contribución de b^* fue menor en las bebidas UHPH que en las PA y PB y su evolución durante el almacenamiento fluctuó en los valores, aunque manteniendo la tendencia inicial de los diferentes tratamientos.

Para disponer de una idea más intuitiva, las coordenadas a^* y b^* se transformaron en tono (h^*) y pureza de color (C^*) (Tabla 4.21). Los valores de estos atributos indican que PB y PA tuvieron un tono más marcado de amarillo con una mayor pureza de color que las UHPH. Por otra parte, comparando los tratamientos UHPH, las condiciones 200 MPa, 75 °C produjeron una reducción en ambos atributos del color, debido a la mayor severidad del efecto térmico

Tabla 4.22. Efecto del tratamiento sobre los parámetros CIE-L* a* b*, en la bebida de almendra (promedio \pm desviación estándar).

Tratamiento	Día	L*	a*	b*	h*ab	C* _{ab}	ΔE_{PA}
PB	1	81.4 \pm 0.2 ^{cB}	-0.9 \pm 0.0 ^{cA}	7.6 \pm 0.0 ^{aB}	-1.5 \pm 0.0 ^{bC}	7.7 \pm 0.0 ^{aB}	6.9 \pm 0.1 ^{aC}
PB	7	76.4 \pm 0.0 ^{cD}	-1.1 \pm 0.0 ^{cB}	6.3 \pm 0.0 ^{aC}	-1.4 \pm 0.0 ^{aA}	6.45 \pm 0.0 ^{aD}	8.4 \pm 0.1 ^{aA}
PB	14	79.9 \pm 0.4 ^{cC}	-1.0 \pm 0.2 ^{abAB}	7.0 \pm 0.7 ^{aBC}	-1.4 \pm 0.0 ^{aB}	7.1 \pm 0.7 ^{aC}	8.4 \pm 0.3 ^{aA}
PB	21	82.0 \pm 0.2 ^{dA}	-0.9 \pm 0.0 ^{cA}	8.6 \pm 0.1 ^{aA}	-1.5 \pm 0.0 ^{aD}	8.7 \pm 0.1 ^{aA}	7.1 \pm 0.0 ^{aB}
PA	1	87.6 \pm 0.1 ^{bB}	-0.5 \pm 0.0 ^{aA}	5.1 \pm 0.1 ^{bA}	-1.5 \pm 0.0 ^{aD}	5.1 \pm 0.1 ^{bA}	
PA	7	84.4 \pm 0.0 ^{bC}	-0.7 \pm 0.0 ^{aC}	3.9 \pm 0.0 ^{bD}	-1.4 \pm 0.0 ^{aA}	6.4 \pm 0.0 ^{aD}	
PA	14	87.95 \pm 0.0 ^{bA}	-0.8 \pm 0.0 ^{aD}	4.5 \pm 0.0 ^{bC}	-1.4 \pm 0.0 ^{bB}	4.6 \pm 0.0 ^{bC}	
PA	21	87.9 \pm 0.0 ^{cA}	-0.7 \pm 0.0 ^{aB}	4.8 \pm 0.0 ^{bB}	-1.4 \pm 0.0 ^{bC}	4.8 \pm 0.0 ^{bB}	
200,55	1	89.3 \pm 0.0 ^{aB}	-0.8 \pm 0.0 ^{bA}	3.8 \pm 0.0 ^{cA}	-1.4 \pm 0.0 ^{cC}	3.9 \pm 0.0 ^{cA}	2.2 \pm 0.1 ^{bB}
200,55	7	85.8 \pm 0.2 ^{aC}	-1.0 \pm 0.1 ^{bAB}	2.7 \pm 0.0 ^{cD}	-1.4 \pm 0.0 ^{aD}	2.8 \pm 0.0 ^{cD}	1.9 \pm 0.0 ^{cC}
200,55	14	89.3 \pm 0.0 ^{aB}	-1.1 \pm 0.0 ^{bcBC}	3.0 \pm 0.0 ^{cC}	-1.2 \pm 0.0 ^{cA}	3.2 \pm 0.0 ^{cC}	2.2 \pm 0.1 ^{bB}
200,55	21	89.8 \pm 0.0 ^{aA}	-0.8 \pm 0.0 ^{bA}	3.2 \pm 0.0 ^{cB}	1.32 \pm 0.00 ^{cB}	3.4 \pm 0.0 ^{cB}	2.4 \pm 0.1 ^{bA}
200,75	1	89.1 \pm 0.0 ^{aA}	-1.0 \pm 0.0 ^{dA}	3.5 \pm 0.0 ^{dA}	-1.3 \pm 0.0 ^{dC}	3.6 \pm 0.0 ^{dA}	2.3 \pm 0.10 ^{bC}
200,75	7	85.7 \pm 0.1 ^{aC}	-1.3 \pm 0.0 ^{dC}	2.3 \pm 0.0 ^{dD}	-1.4 \pm 0.0 ^{aD}	2.6 \pm 0.0 ^{dD}	2.2 \pm 0.0 ^{bC}
200,75	14	88.9 \pm 0.0 ^{aB}	-1.2 \pm 0.0 ^{abAB}	2.6 \pm 0.0 ^{aBC}	-1.1 \pm 0.0 ^{dA}	2.8 \pm 0.0 ^{dC}	2.3 \pm 0.1 ^{bB}
200,75	21	89.3 \pm 0.0 ^{bA}	-0.9 \pm 0.0 ^{dA}	2.7 \pm 0.0 ^{dB}	-1.2 \pm 0.0 ^{dB}	2.9 \pm 0.0 ^{cB}	2.5 \pm 0.03 ^{bA}

¹ Valores medios \pm d.e. de los parámetros de color. ΔE fue calculado tomando como estándar a la muestra tratada por PA. Superíndice^{a-d} diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Superíndice^{A-D} diferentes indican diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$).

La diferencia de color (ΔE_{PA}) fueron calculadas tomando como referencia la muestra PA. Este parámetro muestra las diferencias que existen de los valores L*, a* y b* de la muestra estándar con las tratadas, en este caso las UHPH y PB. La diferencia de color, fue mayor significativamente para PB, mientras que las UHPH mostraron diferencias muy pequeñas con

PA. Aunque a simple vista, con observación en paralelo se podía percibir esta diferencia, probablemente es irrelevante a efectos de calidad global. La evolución de la diferencia de color se mantuvo muy estable a lo largo del almacenamiento en las bebidas tratadas por UHPH.

Poliseli *et al.* (2013), trabajaron con leche de soja tratada por UHPH (200 MPa, 55 y 75°C), PA y PB y analizaron el comportamiento de color durante el almacenamiento de 28 días, encontrando que los valores correspondiente a las coordenadas L*a*b* permanecieron estables durante el periodo de almacenamiento en todos los tratamientos aplicados y, presentando una diferencia de color ΔE más importante para las muestras de leche de soja tratadas por UHPH; la tendencia del color fue hacia el amarillo de manera general. Resultados que concuerda con estudios realizados por Cruz *et al.* (2007), donde mostraron que la mayor diferencia de color ΔE fue para la leche de soja tratada por UHPH comparada con la leche tratada por UHT.

4.4.4. Evolución del perfil de compuestos volátiles en las bebidas de almendra durante el almacenamiento.

Como se comentó en el capítulo 4.2, el perfil volátil, y en particular, algunos compuestos de esta fracción está asociado a las características de un alimento. Sin embargo, el tratamiento aplicado puede modificar en mayor o menor medida la abundancia relativa de algunos compuestos volátiles y su transformación en otros a lo largo de la vida comercial del alimento. En este estudio, se ha tenido en consideración los volátiles de mayor abundancia en las bebida de almendra (Tabla 4.23), siendo algunos (hexanal y nonanal) de los cuales de interés para analizar comparativamente el grado de oxidación. Aunque en este estudio también se cuantificó la oxidación primaria y secundaria a través, respectivamente del índice de peróxidos y del TBARS, los valores obtenidos en ambos análisis fueron muy bajos (del orden de 10^{-4}) y poco concluyentes (resultados no mostrados), por lo que tomó mayor relevancia la identificación de compuestos volátiles relacionados con los procesos oxidativos.

El análisis de los compuestos volátiles de las muestras tratadas por PA y UHPH (200 MPa, 55 y 75 °C) durante el tiempo de almacenamiento se realizó a través del cálculo de las áreas de los picos, los días 1, 7, 14 y 21 de almacenamiento para estudiar la evolución de los perfiles con criterios comparativos entre los tratamientos aplicados (tabla 4.25).

Tabla 4.23. Compuestos volátiles de mayor abundancia en la bebida de almendra.

Aldehídos	Alcoholes	Aromáticos	Ácidos
Benzaldehído	1-pentanol	Benceno	
Hexanal	1-hexanol	p-etil-anisol	Ácido benzoico
Nonanal	1-heptanol	Tolueno	
	1-octen-3-ol	Estireno	
	1-nonanol		
	2-etil-1-hexanol		
	benzeneethanol		
	benzylalcohol		

Como se mencionó en el tema 4.2, el benzaldehído fue el principal compuesto, siendo característico del perfil aromático de las almendras. Aunque se puede apreciar una disminución en la abundancia de benzaldehído a lo largo del almacenamiento, no se observaron cambios significativos entre los tratamientos aplicados, excepto en PA el día 14, (Tabla 4.24) con menor abundancia que los tratamientos UHPH. El benzaldehído se degrada a ácido benzoico por vía oxidativa y en benzil alcohol mediante hidrogenación, lo cual es coherente con los resultados obtenidos. Mexis *et al.* (2011), observaron resultados parecidos. El benzaldehído presentó una disminución durante el almacenamiento de 6 y 12 meses, en almendras irradiadas y empacadas, comparadas con almendras enteras sin tratar, por lo que el tratamiento térmico puede ser responsable de la degradación de este compuesto durante el almacenamiento.

El segundo compuesto en importancia fue el hexanal, que debido al gran impacto sobre el flavor y su bajo umbral de detección es comúnmente usado como indicador de la formación de productos secundarios de la oxidación (Plutowska y Wardencki, 2007; Yuan y Chang, 2007). Éste compuesto sufrió un decremento durante el almacenamiento de las bebidas de almendra. Sin embargo éste descenso sólo fue significativamente diferente en las bebidas PA a partir del día 7 en comparación con el día 1. En la Figura 4.6, se muestra la evolución de este compuesto químico a través del tiempo. El hexanal sufrió un incremento en los tratamientos UHPH con ambas temperaturas de entrada, aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni en los días analizados a pesar de la ligera disminución de los valores observados

en el día 21. Aunque la diferencia en hexanal no fue significativamente diferente entre PA y los tratamientos UHPH, debido a que la variabilidad observada fue elevada probablemente debido al efecto de las producciones, parece evidente que el tratamiento UHPH produjo una mayor oxidación. Así, a pesar de la degradación posterior del hexanal, el contenido de éste siempre fue mayor en las bebidas tratadas por UHPH. Teniendo en consideración el proceso general de elaboración de las bebidas de almendra, los factores que probablemente afectaron más a la degradación lipídica fueron las altas temperaturas y la exposición lipídica de la fase dispersa a los catalizadores. En los tratamientos UHPH, y en especial en los tratamientos utilizados en este estudio, la temperatura máxima alcanzada por el fue de 115 °C durante menos de 1 s en el tratamiento a 200 MPa, 75 °C. Por ello cabe suponer que la creación de una gran superficie de gotas de aceite expuestas debido a la UHPH es la causa de la mayor oxidación de estas bebidas. La disminución del hexanal se explica a través de diferentes vías degradativas tales como la oxidativa, para formar ácido carboxílico (Wilkens & Lin, 1970) y también puede ser reducido para formar n-hexanol (Kakumyan *et al.*, 2009). Mexis *et al.*, (2011), encontraron un aumento de hexanal durante el periodo de almacenamiento de 6 y 12 meses, en almendras irradiadas y empacadas comparadas con almendras sin tratar a tiempo cero. Una tendencia similar encontraron Beltran *et al.*, (2011), en aceite de almendra, donde el hexanal aumentó su valor durante los primeros siete días, seguida de un decremento en el día 10, incrementando nuevamente en el periodo final de almacenamiento (20 días).

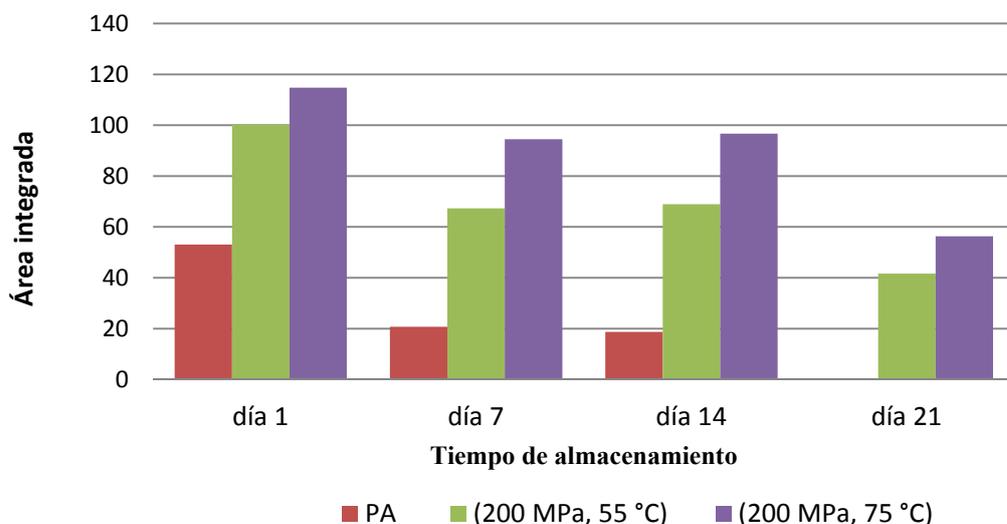


Figura 4.6. Evolución del hexanal, durante el periodo de almacenamiento, en diferentes tratamientos aplicados. Valor del área integrada (valor medio x 10⁵).

Tabla 4.24. Evolución de compuestos volátiles detectados en la bebida de almendra PA y tratada durante el almacenamiento

Compuesto	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
<i>Benzaldehído</i>				
PA	283 ^{Aa}	194 ^{Ab}	181 ^{Bb}	
200 MPa, 55 °C)	304 ^{Aa}	289 ^{Aa}	206 ^{Aa}	177 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	283 ^{Aa}	197 ^{Aa}	202 ^{Aa}	175 ^{Aa}
<i>Hexanal</i>				
PA	53 ^{Aa}	20.7 ^{Bb}	18.6 ^{Bb}	
200 MPa, 55 °C)	283.5 ^{Aa}	67.3 ^{Aa}	68.9 ^{Aa}	41.7 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	114.8 ^{Aa}	94.5 ^{Aa}	96.7 ^{Aa}	52.3 ^{Aa}
<i>Nonanal</i>				
PA	3.3 ^{Aa}	2.8 ^{Ab}	2.2 ^{Bb}	
200 MPa, 55 °C)	4.1 ^{Aa}	3.5 ^{Aa}	4.7 ^{Aa}	4.1 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	5.5 ^{Aa}	4.99 ^{Aa}	6.1 ^{Aa}	8.8 ^{Aa}
<i>1-pentanol</i>				
PA	23.0 ^{Ba}	22.8 ^{Aa}	19.8 ^{Ba}	
200 MPa, 55 °C)	29.3 ^{Aa}	24.2 ^{Aa}	28.0 ^{Aa}	20.2 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	31.4 ^{Aa}	31.5 ^{Aa}	28.8 ^{Aa}	24.3 ^{Aa}
<i>1-hexanol</i>				
PA	60 ^{Ab}	99.3 ^{Aa}	96.2 ^{Aa}	
200 MPa, 55 °C)	42.9 ^{Bb}	39.5 ^{Bb}	114.5 ^{Aa}	93.5 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	36.8 ^{Ba}	69.5 ^{ABa}	67.6 ^{Aa}	65.3 ^{Aa}
<i>1-heptanol</i>				

PA	11.7 ^{Ab}	11.2 ^{Aab}	8.7 ^{Ab}	
200 MPa, 55 °C)	18.9 ^{Aa}	15.4 ^{Aa}	20.1 ^{Aa}	16.6 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	26.7 ^{Aa}	20.8 ^{Aa}	18.6 ^{Aa}	26.7 ^{Aa}
<i>1-nonanol</i>				
PA	3.3 ^{Aa}	3 ^{Aa}	2.2 ^{Ab}	
200 MPa, 55 °C)	1.7 ^{Ba}	1.7 ^{Ba}	2.6 ^{Aa}	1.9 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	1.8 ^{Ba}	1.7 ^{Ba}	1.4 ^{Ba}	1.7 ^{Aa}
<i>1-octen-3-ol</i>				
PA	19.5 ^{Bab}	19.6 ^{Ba}	14.4 ^{Ab}	
200 MPa, 55 °C)	22.7 ^{Aa}	21.1 ^{Ba}	27.0 ^{Aa}	21.4 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	39 ^{ABa}	34.5 ^{Aa}	40.5 ^{Ba}	39 ^{Aa}
<i>2-etil-1-hexanol</i>				
PA	5.2 ^{Ab}	9.2 ^{Aa}	5.6 ^{Ab}	
200 MPa, 55 °C)	5.6 ^{Aa}	4.1 ^{Ba}	5.4 ^{Aa}	4.0 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	3.9 ^{Ba}	5.3 ^{ABa}	5.1 ^{Aa}	4.5 ^{Aa}
<i>Benceno-etanol</i>				
PA	40.3 ^{Ab}	30.5 ^{Ac}	65.2 ^{Aa}	
200 MPa, 55 °C)	35.1 ^{ABa}	33.5 ^{Aa}	62.6 ^{Aa}	60.3 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	30.3 ^{Ba}	29.9 ^{Aa}	26.9 ^{Ba}	28.6 ^{Aa}
<i>Isoamil-alcohol</i>				
PA	3.3 ^{Aab}	3.9 ^{Aa}	2.5 ^{Ab}	
200 MPa, 55 °C)	2.2 ^{Bb}	1.88±0.57 ^{Bb}	3.2 ^{Aa}	2.8 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	1.7 ^{Ba}	1.96±0.83 ^{Ba}	1.8 ^{Aa}	1.7 ^{Aa}
<i>Bencil-alcohol</i>				
PA	4.5 ^{Ab}	28.6	28.9 ^{Aa}	
200 MPa, 55 °C)	8.6 ^{Ab}	12.7 ^{Ab}	66.4 ^{Aa}	55.6 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	8.0 ^{Aa}	49.7 ^{Aa}	49.4 ^{Aa}	49.7 ^{Aa}
<i>Tolueno</i>				
PA	6.9 ^{Aab}	8.9 ^{Ab}	6 ^{Aa}	
200 MPa, 55 °C)	3.9 ^{Ba}	4.1 ^{Aa}	4.5 ^{Aa}	3.8 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	4.04 ^{Aa}	6.3 ^{Aa}	3.9 ^{Aa}	3.8 ^{Aa}
<i>Estireno</i>				
PA	0.7 ^{Aa}	0.7 ^{Aa}	0.6 ^{Ab}	
200 MPa, 55 °C)	1.6 ^{Ba}	1. ^{Aa}	1.4 ^{Aa}	1.5 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	1.5 ^{ABa}	1.2 ^{Aa}	1.1 ^{Aa}	1.5 ^{Aa}
<i>Ácido benzoico</i>				
PA	3.6 ^{Ab}	1.8 ^{Bb}	1.7 ^{Aa}	
200 MPa, 55 °C)	3.4 ^{ABa}	3.2 ^{Aa}	1.7 ^{Aa}	1.6 ^{Aa}
200 MPa, 75 °C)	2.7 ^{Ba}	1.9	1.8 ^{Aa}	1.6 ^{Aa}

Superíndice ^{a, b, c}, diferente en cada fila o línea, presentan diferencia significativa durante el almacenamiento. Superíndice ^{A, B, C}, diferente en la columna de cada compuesto, muestran diferencia significativa entre tratamientos. Cuenta del área integrada. Valor medio x 10⁵, p < 0.05.

El benceno etanol, el 2-etil alcohol y benzil alcohol experimentaron un incremento significativo durante el almacenamiento ($p < 0.05$). Estos compuestos se generaron fundamentalmente como productos secundarios de la oxidación (Aguila *et al.*, 2012), como observaron estos autores en almendras tostadas. La fracción grasa en almendras es de alrededor del 40 % y ésta es rica en ácidos grasos mono y poliinsaturados. Para producir la bebida de almendra, la fracción grasa se libera en la molienda y viéndose favorecido por el incremento de la temperatura, por ello no es de extrañar que los productos de la degradación de lípidos constituyan una numerosa familia responsable del perfil volátil característico de los productos procesados a partir de almendras.

CAPÍTULO V: *Conclusiones*

El procedimiento de elaboración de las bebidas de almendra en planta piloto permitió la optimización de un producto base y otro pasteurizado de calidad adecuada, sin actividad lipoxigenasa ni antitripsínica que sirvió como punto de partida para el estudio de la influencia de la UHPH. Se estableció la necesidad de adicionar lecitina como emulgente para suplir la deficiencia de proteína de la almendra.

Con respecto a la estabilidad física de las bebidas de almendra, todos tratamientos UHPH dieron lugar a una importante reducción del tamaño de partícula en comparación con los tratamientos térmicos convencionales. En este sentido, la aplicación de las condiciones más suaves de 200 MPa, 55°C son suficientes para alcanzar una buena estabilidad coloidal

A efectos de calidad microbiológica, las condiciones aplicadas más leves de UHPH (200 MPa con temperatura de entrada de 55 °C) fueron suficientes para conseguir similares características que la pasteurización, aunque el tratamiento de UHPH a 200 MPa a 75°C fue es el más eficaz en la prevención de la proliferación de la microbiota de alteración de la bebida de almendra durante su conservación en refrigeración. A 300 MPa y temperaturas de entrada superiores a 65°C fueron suficientes para conseguir la esterilidad comercial de las bebidas de almendra de forma similar a las tratadas UHT.

La microbiota potencialmente alterante de las bebidas de almendra tratadas a 300 MPa y temperaturas de entrada superiores a 55°C perteneció al género *Bacillus*, en particular, *B. cereus*, *B. subtilis* y *Lysinibacillus*, spp. En la validación de los tratamientos UHPH se consiguió su completa inactivación a 300 MPa y temperaturas de entrada iguales o superiores a 75°C.

Con respecto a la estabilidad física de las bebidas de almendra, todos tratamientos UHPH dieron lugar a una importante reducción del tamaño de partícula en comparación con los tratamientos térmicos convencionales. En este sentido, la aplicación de las condiciones más suaves de 200 MPa, 55°C son suficientes para alcanzar una buena estabilidad coloidal.

A efectos de oxidación lipídica, los tratamientos UHPH revelaron un incremento en los índices de oxidación primaria y secundaria de las bebidas de almendra comparadas con las obtenidas por tratamientos térmicos convencionales. Sin embargo, cabe mencionar que, en la medida que

podieron ser cuantificados, los valores obtenidos fueron muy bajos en comparación con otros estudios similares realizados en bebidas de soja.

El estudio de la fracción volátil de las bebidas de almendra permitió identificar 56 compuestos diferentes. El perfil aromático se caracterizó fundamentalmente por la predominancia de aldehídos, en especial el benzaldehído), seguida de la familia de alcoholes. Las cetonas, ácidos, pirroles, furanos esterés y otros compuestos se encontraron en menor abundancia, aunque no menos relevante. Los tratamientos que produjeron mayor abundancia de compuestos volátiles, fueron los UHPH en combinación con temperaturas de entrada de 75 °C.

La evolución de las bebidas de almendra durante el almacenamiento mostró una mayor estabilidad física de las bebidas tratadas por UHPH en comparación a las pasteurizadas, siendo equivalentes los dos tratamientos UHPH seleccionados para este estudio (200 MPa a 55 o 75 °C). En cuanto a los parámetros de color, las bebidas tratadas por UHPH resultaron más luminosas, con un matiz ligeramente menos amarillo y menos puro que las pasteurizadas, pero en todos los estos atributos fueron estables a lo largo del almacenamiento

La tecnología UHPH puede considerarse una alternativa a la pasteurización resultando en bebidas de almendra más estables física y microbiológicamente, con un tiempo de almacenamiento superior, de un mínimo de 21 días en refrigeración.

CAPÍTULO VI: Referencias

- Abbassy, M.Z., Aly, M.E., Taha, S.N. 2004. Effect of lecithin addition on the yield and quality of soft cheeses. *Food Research International*. 6:633–640.
- Achouri, A., Boye, J.I. and Zamani, Y. 2007. Changes in soymilk quality as a function of composition and storage. *Journal of Food Quality*. 30: 731-744.
- Agila, A., and Barringer, S. 2012. Effect of roasting conditions on color and volatile profile including HMF level in sweet almonds (*Prunus Dulcis*). *Journal Food Science*. 77(4): C461-C468.
- Agumbiade, S.O., Sharwie, M.H, Olanlokun, J.O. 2006. Evaluation of Some Nutritional Characteristics of Indian Almond (*Prunus amygdalus*) Nut. *Journal of Nutrition*. 4:316-318.
- Ahrabi, S., Myhren, F., Eriksen, O. H. 2012. Parenteral formulations of elacytarabine derivatives. World patent, January. WO 2012/008845 A1.
- Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A.M., Lapsley, K. and Sathe, S.K. 2005. Almond (*Prunus dulcis* L.) protein quality. *Plant Foods Human Nutrition*. 60:123–128.
- Amador-Espejo, G.G., Suárez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M.E. and Trujillo, A.J. 2014a. Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of Dairy Science*. 97(2): 659-671.
- Amador-Espejo; G.G.; Hernández-Herrero, M.M.; Juan, B.; Trujillo, A.J. 2014b. Inactivation of *Bacillus* spores inoculated in milk by Ultra High Pressure Homogenization. *Food Microbiology*, 44: 204-210.
- Amarowicz, R., Troszynska, A. and Shahidi, F. 2005. Antioxidant activities of almond seed extract and its fractions. *Journal of Food Lipids*. 12: 344-358.
- Ananta, E., Heinz, V., Schlüter, O. and Knorr, D. 2001. Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2: 261-272.
- Anonymous. (2002). UNE-EN-13704. Chemical disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test methods and requirements (phase 2, step 1).
- AOAC, (2000). Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aslanta, R., Gülerüyüz, M. and Turan, M. 2001. Some chemical contents of selected almond (*Prunus amygdalus* batsch) types. *Cahiers options Méditerranéennes (CIHEAM)*. France.
- Athisaya N., Tang J., Runsheng M., Swanson B.G. 2003. Rancidity of Walnuts and Almonds affected by short heat treatment for insect control. *Journal of Food Processing Preservation*. 27:445-464.
- Axelrod, O.A., Taiwo, L.B., Fasoyiro, S.B., Akinngbe, C.A. 2001. Lipoxygenase from soybean. In: *Methods in enzymology*. Ed.Lowstein, J.M. Waltham, Massachusetts. pp. 441-451.
- Badui D.S. 2006. *Química de los Alimentos*. Edición 4. Pearson Educación. ISBN 9702606705, 9789702606703. Pp. 480-482.
- Barbera, G., Di Marco, L. and Schirra, M. 1994. Effects of rootstock on productive and qualitative response of two almond varieties. *Acta Horticulturae*. 373: 129-134.

- Beck, J.J., Hibee, S.B., Merrill, B.G. and Roitman, N. James. 2008. Comparison of volatile emissions from undamaged and mechanically damaged almonds. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 88: 1363- 1368.
- Beck, J.J., Higbee, B.S., Gee, W.S., and Dragull, K. 2011b. Ambient orchard volátiles from California almonds. *Phytochem. Lett.*, 4: 199-202.
- Beck, J.J., Mahoney, N., Cook, D., and Gee, W.S. 2011a. Volatile analysis of ground almonds contaminated with naturally occurring fungi. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 59: 6180-6187.
- Beck, J.J., Merrill, B.G., Hibee, S.B., Light, M.D. and Gee, S.W. 2009. In situ seasonal Study of the Volatile Production of Almonds (*Pronus dulcis*) Var. 'Nonpareil' and Relationship to Navel Orangeworm. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 57: 3749-3753.
- Bello, R.A., and Gil-Rivas, W. 1992. Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada, como fuente de alimento. FAO. México. Available in: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB494S/AB494S00.HTM>.
- Beltrán, A., Ramos, M., Grané, N., Martín, M.L., and Garrigós, M.C. 2011. Monitoring the oxidation of almond oils by HS-SPME-GC-MS and ATR-FTIR: application of volatile compounds determination to cultivar authenticity. *Food Chemistry*. 126: 603-609.
- Bernat, N., Cháfer, M., Rodríguez-García, J., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2015). Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 488–496.
- Betoret, E., Betoret, N., Carbonell, J.V. and Fito, P. 2009. Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering*. 92: 18-23.
- Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M. R., and Sinigaglia, M. 2007. Effects of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory medium. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 382-386.
- Boatright, W.L. and Lei, Q. 1999. Compounds contributing to the "beany" odor of aqueous solutions of soy protein isolates. *Journal of Food Science*. 64: 667-670.
- Botsoglou, A.N., Fletouris, J.D., Papageorgiou, E.G., Vassilopoulos, N.V. and Trakatellis, G.A. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of agricultural and food chemistry*. 42(9): 1931-1937.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., and Legrand, J. 2006. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*. 16: 275-284.
- Boyer, P.D. (Ed.): *The Enzymes* 12. Oxidation-Reduction Part B. Electron Transfer, Oxygenases, Oxidases. Academic Press, New York-San Francisco-London, 1975 p. 150.
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., and Guamis-López, B. 2006a. Inactivation by ultra-high pressure homogenization of *Escherichia coli* strains inoculated into orange juice. *Journal of Food Protection*. 69: 984-989.

- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., and Guamis-López, B. 2006b. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Protection*. 69: 86-92.
- Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M. M., and Guamis-López, B. 2007. Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra-high pressure homogenization at inlet temperature of 6 and 20 °C. *Food Control*. 18: 1282-1288.
- Buranasompob, A., Tang, J., Powers, J.R., Reyes, J., Clark, S. and B.G. Swanson. 2007. Lipoxigenase activity in walnuts and almonds. *LWT. Elsevier*. 40: 893-899.
- Buransompob, A., Tang, J., Mao, R and Swanson, B. 2003. Rancidity of walnuts and almonds affected by short time heat treatments for insect control. *Journal of food processing preservation*. 27: 445-464.
- Burgaud, I., Dickinson, E. and Nelson, P.V. 1990. An improved high-pressure homogenizer for making fine emulsion on a small scale. *International Journal of Food Science and Tecnology*. 25: 39-46.
- Calixto, F. S., Bauza, M., Martinez de Toda. F. and Argamenteria, A. 1981. Amino Acids, Sugars, and Inorganic Elements in the Sweet Almond (*Prunus amygdalus*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 29: 509-511.
- Calligaris, S., Foschia, M., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., and Manzocco, L. 2012. Study on the applicability of high-pressure homogenisation for the production of banana juices. *LWT e Food Science and Technology*. 45: 117-121.
- Campos, F. P., and Cristianini, M. 2007. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenisation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8: 226-229.
- Capra, M. L., Patrignani, F., Quiberoni, A., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R., and Guerzoni, M. E. 2009. Effect of high-pressure homogenization on lactic acid bacteria phages and probiotic bacteria phages. *International Dairy Journal*. 19: 336-341.
- Carlin, F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*. 28: 177-182.
- Carter, M .V., and Talbot, H.B. 1974. *Eutypa armeniaca*. C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. pp.436
- Chantrapornchai, W., Clydesdale, F. and McClements, D.J. 1998. Influence of droplet size and concentration on the color of oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2914-2920.
- Chavez-López, C., Lanciotti, R., Serio, A., Paparella, A., Guerzoni, E., and Suzzi, G. 2009. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. *Food Control*. 20: 691-695.
- Cheftel, J. C., and Dumay, E. 1993. Microcoagulation of proteins for development of “creaminess”. *Food Reviews International*. 9: 473-502.
- Chevalier-Lucia, D., Blayo, C., Grácia-Juliá, A., Picart-Palmade, L., and Dumay, E. 2011. Processing of phosphocasein dispersions by dynamic high pressure: effects on the dispersion

physico-chemical characteristics and the binding of α -tocopherol acetate to casein micelles. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 416-425.

Chizzoli, R., Novelli, E., Zanardi, E. 1998. Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Meat Science*, 49:S87-S99.

Chizzoli, R., Novelli, E., Zanardi, E. 1998. Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Meat Science*, 49:S87-S99.

Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., and Dumay, E. 2009. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids*. 23: 640-654.

Cortes, B., Nunez, I., Cofan, M., Gilabert, R., Perez-Heras, A., Casals, E., Deulofeu, R., and Ros, E. 2006. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *Journal Am. Colloids Cardiology*. 48: 1666–1671.

Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I. and Oliviera, M.B.P.P. 2012. Almond allergen: Molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 60(6): 1337-1349.

Cruz N. 2008. Efecto de la alta presión de homogeneización en licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado [dissertation]. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Cruz, N, Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A. J., Guamis, B. and Ferragut, V. 2007. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Research Internacional*. 40: 725-732.

Cruz, N. S., Capellas, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., and Ferragut, V. 2009. Soymilk treated by ultra high-pressure homogenization: acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product. *Food Hydrocolloids*. 23: 490-496.

D'Souza, D. H., Su, X., and Harte, F. 2011. Comparison of reduction in foodborne viral surrogates by high pressure homogenization. *Journal of Food Protection*. 74: 1840-1846.

D'Souza, D. H., Su, X., Roach, A., and Harte, F. 2009. High-pressure homogenization for the inactivation of human enteric virus surrogates. *Journal of Food Protection*. 72: 2418-2422.

Datta, N. y Deeth, H. C. 2004a. Alternatives to heat treatment: High-Pressure processing. In H. Roginski, Encyclopedia of Dairy Science. *Elsevier Publisher Ltd*: New York, EEUU. pp. 1327-1333.

Datta, N. y Deeth, H. C. 2004b. Others nonthermal technologies. In H. Roginski, Encyclopedia of Dairy Science. *Elsevier Publisher Ltd*: New York, EEUU. pp. 1339-1346

Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., and Kelly, A. L. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*. 72: 393-399.

Davies, C.S., and Dean, N.C. 1997. Flavor improvement of soybean preparation by genetic removal of lipoxygenase-2. *Journal Am. Oil. Chemistry Soc*, 64: 1428-33.

Dávila-Aviña, J.E.J., González-aguilar, G.A., Ayala-Zavala J.F., Sepulveda, R.D. y Olivas I.G. 2011. Compuestos volátiles responsables del sabor del tomate. *Revista fitotécnica Mexicana*. ISSN 0187-7380.

- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P.; Heyndrickx, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 136, 318-325.
- De Cupere, V., Mancuso, V. 2011. Novel process. World patent, WO 2011/154443 A1.
- Desrumaux, A., and Marcand, J. 2002. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*. 37:263–269.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed system. *Food Hydrocolloids*. 17:25–39.
- Dictionary of Food Ingredients. Robert S. Igoe. 2011. Ed., *Springer Science and Business*. Pp 98.
- Diels, A. M. J., and Michiels, C. W. 2006. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 32: 201-216.
- Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., and Michiels, C. W. 2005a . Inactivation of *Escherichia coli* by highpressure homogenization is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*. 101: 281-291.
- Diels, A. M. J., De Taeye, J., and Michiels, C. W. 2005b. Sensitisation of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides and enzymes by highpressure homogenisation. *International Journal of Food Microbiology*. 105: 165-175.
- Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N.P. 2007. Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry*. 104:10–20.
- Donsì, F., Ferrari, G. and Maresca, P. 2006. High-pressure homogenisation for food sanitisation. 13th IUFOST World conference, France. pp. 1851-1862
- Donsì, F., Ferrari, G., and Maresca, P. 2009a. High-pressure homogenization for food sanitization. In *Global Issues in Food Science and Technology* (Edited by, Gustavo Barbosa-Cánovas, Alan Mortimer, David Lineback, Walter Spiess, Ken Buckle, and Paul Colonna), Academic Press, USA. pp. 309-352.
- Donsì, F., Ferrari, G., Lenza, E. and Maresca, P. 2009b. Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation. *Chemical Engineering Science*. 64: 520-532.
- Donsì, F., Wang, Y., and Huang, Q. 2011. Freeze-thaw stability of lecithin and modified starch-based nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*. 25: 1327-1336.
- Dumay, E., Cheftel, J. C., Desrumaux, A., Prévost, H., Lambert, D., Le Gall, Y., et al. (Avril 2005). Homogénéisation haute-pression de lait et de préparations protéiques laitières: inactivation microbienne et enzymatique ; effets sur la fonctionnalité protéique.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., and Lopez-Pedemonte, T. 2010. High pressure and food conservation. In P. Sebert (Ed.), *Comparative high pressure*. Enfield: Science Publishers. Biology. Pp. 83-116.

- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julia, A. and Blayo, C. 2013. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. 31: 13-26.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L.T., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A. and Blayo, C. 2012. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science and Technology*. 0: 1-14.
- Dumay, E., Picart, L., Regnault, S., and Thiebaud, M. 2006. High pressure-low temperature processing of food proteins. *Biochimica et Biophysica. Acta (BBA) e Proteins and Proteomics*. 1764: 599-618.
- Dumay, E., Thiebaud, M., Picart, L., and Cahyana Y. contribution. Projet AQS-T36. Paris (France): Compte Rendu de Fin de Recherche d'opération d'une recherche financ_ee par le Minist_ere de la Jeunesse, de l'_ Education et de la Recherche.
- Berendsen, E.M.; Zwietering, M.H.; Kuipers, O.P.; Wells-Bennik . M.H.J. 2014. . Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiology*, 45: 18-25
- Escobar, D., Clark, S., Ganesan, V., Repiso, L., Waller, J., and Harte, F. 2011 . High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition, and texture of queso fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 94: 1201-1210.
- Esteban, R.M., Lopez-Andreu, F.J. and Carpena, O. 1985. Protein extractability of almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) seed. *Journal Science Food Agricultural*. 36: 485-490.
- Esterbauer, H. 1993. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. 186:407–431.
- Euston, S.R., Finnigan, S.R. and Hirst, R.L. 2001. Aggregation kinetics of heated whey protein stabilized emulsions: Effects of low-molecular weight emulsifiers. *Food Hydrocolloids*. 15: 253-262.
- Faid M., Bakhy, K., Anchad, M. and Tantaoui Elaraki, A. 1995. Almond paste: physicochemical and microbiological characterization and preservation with sorbic acid and cinnamon. *Journal of Food Protection*. 58:547–550.
- Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., and Martin, J. H. 1997. Effects of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* spores in ice cream mix. *Journal of Dairy Science*. 80: 2184-2197.
- Fenaille, F., Mottier, P., Turesky, R., Ali, S., Guy, P. 2001. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of Chromatography A*. 921:237-245.
- Ferragut, V., Cruz, N.S. Trujillo, A., Guamis, B., Capellas, M. 2009. Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. *Journal of Food Engineering*. 92: 63–69.
- Ferrie, B.J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C.G. and Rothstein, S.J. 1994. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physioigycal*. 106. 109-118.

- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H. and Kuhn, H. 1995. Lipoxygenase-catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilisation during germination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 11849-11853.
- FIL - IDF. 1991. Peroxide index determination. Standard 74A. Brussels: International Dairy Federation.
- FIL - IDF. 2002. Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. Standard 185. Brussels: *International Dairy Federation*.
- Floury, J., A. Desrumaux and J. Lardières. 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovation Food Science Technological*. 1: 127-134.
- Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J. and Desrumaux, A. 2004. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*. 59: 843-853.
- Floury, J., Desrumaux, A., and Legrand, J. 2002. Effect of ultra-highpressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*. 67: 3388-3395.
- Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. A. V., and Legrand, J. 2003. Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of Food Engineering*. 58: 227-238.
- Gardner, H. W. 1991. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica, Biophysica Acta*, 1084: 221–239.
- Garrido, I., Monogas, M., Gómez-Cordovés, C. and Bartolomé, B. 2008. Polyphenols and antioxidant properties of almond skins: influence of industrial processing. *Journal of Food Science. Food Chemistry*. 73: C106-C115.
- Gebhardt, R., Doster, W., Friedrich, J., and Kulozik, U. 2006. Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 35: 503-509.
- Georget, E.; Miller, B.; Aganovic, K.; M. Callanan, Heinz, V.; Mathys, A. 2014. Bacterial spore inactivation by ultra-high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26: 116–123
- Giannella, R.A. 1996. "Salmonella". in Baron, S. et al., (eds.). *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch.
- Gogate, P. R., and Pandit, A. B. 2008. Application of cavitation reactors for cell disruption for recovery of intracellular enzymes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 1083-1093.
- Grácia-Julia, A., René, M., Cortés-Muñoz, M., Picart, L., López-Pedemonte, T., Chevalier, D., et al. 2008. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. *Food Hydrocolloids*. 22: 1014-1032.
- Guamis-Lopez, B., Trujillo-Mesa, A. J., Ferragut-Perez, V., Quevedo-Terre, J. M., Lopez-Pedemonte, T., Buffa-Dunat, M. N. 2012. Continuous system and procedure of sterilization and

physical stabilization of pumpable fluids by means of ultra-high pressure homogenization. European patent, January 2012, EP 2 409 583 A1.

Guzey, D., and McClements, D.J. 2006. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 128:227–248.

Hayes, M. G., and Kelly, A. L. 2003a. High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*. 70: 307-313.

Hayes, M. G., and Kelly, A. L. 2003b. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*. 70: 297-305.

Hayes, M.G., Fox, P.F., Kelly, A.L. 2005. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*. 72:25–33.

Hildebrand, D.F., Hamilton-Kemp, T.R., Legg, C.S., Bookjans, G. 1997. Plant lipoxygenase: occurrences, properties and possible functions. *Current Topics Plant Biochem. Physiol*. 7:201-19.

Hoie, L. H., Sjöholm, A., Guldstrand, M., Zunft, H.J.F., Lueder, W, Graubaum, H. J., Gruenwald, J. 2006. Ultra heat treatment destroys cholesterol- lowering effect of soy protein Int. *Journal Food Science And Nutrition*. 57: 512-519.

Holtman, W.L., Van Duijn, G., Sedee, N.J.A. and Douma, A.C. 1996. Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley. *Plant Physiol*. 111: 569-576.

Hornero-Méndez D, Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera M. 2001. A Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Peroxide Value in Food Lipids with High Carotenoid Content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78:1151-1155.

Huppertz, T., Fox, P. F., and Kelly, A. L. 2004. Dissociation of caseins in high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal*. 14: 675-680.

Hyung-Yong, C., Yousef, A.E. and Sastry, S.K. 1999. Kinetics of inactivation of *Bacillus subtilis* spores by continuous or intermittent ohmic and conventional heating. *Biotechnology and Bioengineering*. 62: 368-372.

IDF. 2002. Milk and products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to Dumas principle. Standard 185. *International Dairy Federation*. Brussels, Belgium.

Iordache, M., and Jelen, P. 2003. High pressure microfluidization treatment of heat denatured whey proteins for improved functionality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 4: 367-376.

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., and Bhandari, B. 2008. Recoalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*. 22: 1191-1202.

Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C., Marchie, A., Parker, T.L., Connelly, P.W., Qian, W. 2002. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors – blood lipids, oxidized LDL, Lp(a), homocysteine and pulmonary nitric oxide: A randomized controlled cross-over trial. *Circulation*. 106:1327–1332.

- Jagannath, A., Tsuchido, T., Membre, J.M. 2005. Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods using the modified Weibull and Bigelow equations. *Food Microbiology*. 22: 233-239.
- Ju, X.R., Gao, Y.L., Yao, M.L.; Qian, Y. 2008. Response of *Bacillus cereus* spores to high hydrostatic pressure and moderate heat. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 2104-2112.
- Kalua C. M., Allen M. S., Bedgood D. R. Jr, Bishop A. G., Prenzler P. D. y Robards K. 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: *A critical review.elsevier Food Chemistry*. 100: 273–286.
- Kalua, M.C., Allen, S.Ma., Bedgood, R.D. Jr., Bishop, G.A. and Prenzler, D.P. 2005. Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (20): 8054-8062.
- Kausch, K.D. and Handa, A.K. 1997. Molecular cloning of ripening-specific lipoxygenase and its expression during wildtype and mutant tomato fruit development. *Plant Physioligical*. 113: 1041-1050.
- Keck, C. M., and Muller, R. H. 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 62: 3-16.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., and Fliss, I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbial, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 12: 435-446.
- Kleinig, A. R., and Middelberg, A. P. J. 1998. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*. 53: 891-898.
- Knudsen, J. C., and Skibsted, L. H. 2010. High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry*. 119: 202-208.
- Kodad, O. And Socias, R. 2008. Variability of oil content os major fatty acid composiotis in Almond (*Prunus amygdalus Batsch*) and Its Relationship with Kernel Quality. *Journal of agricultural and food chemestry*. 56(11): 4096-4101.
- Kosáry, J., Korbász, M., KISS, I., and Balogh, T. 2004. June. Almond lipoxygenases. In Proceedings of the 16th International Plant Lipid Symposium, June (pp. 1-4).
- Kühn, J., Zhu, X. Q., Considine, T., and Singh, H. 2007. Binding of 2-nonanone and milk proteins in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 3599-3604.
- Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., Zivanovic, S., Davidson, P. M., and Harte, F. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice using combination of high-pressure homogenization and chitosan. *Journal of Food Science*. 74: 8-14.
- Kumar, V., Rani, A., Pandey, V., Chauhan, G.S. 2006. Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chemistry*. 3:563–568.
- Kwok, K.C. and Niranjana, K. 1995. Review: Effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science and Technology*. 30: 263-295.

- Kwok, K.C., Liang, H.H. and Niranjana, K. 2002. Mathematical modelling of the heat inactivation of trypsin inhibitors in soymilk at 121-154°C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 243-247.
- Kwok, K.C., MacDougall, D.B. and Niranjana, K. 1999. Reaction kinetics of heat-induced colour changes in soymilk. *Journal of Food Engineering*. 40: 15-20.
- Kwok, K.C., Qin, W.H. and Tsang, J.C. 1993. Heat inactivation of trypsin-inhibitors in soymilk at ultra-high temperatures. *Journal of Food Science*. 58: 859-862.
- La Rosa, R., Russo, A., Verdone, A. and Aloschi, S., 2000. Investigation on hygienic-sanitary quality of almond paste produced in Sicily. *Industria Alimentari*. 39: 137-141.
- Lacroix, N., Fliss, I., and Makhoul, J. 2005. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. *Food Research International*. 38: 569-576.
- Lee, S. H., Lefevre, T., Subirade, M., and Paquin, P. 2009. Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. *Food Chemistry*. 113: 191-195.
- Lodaite, K., Chevalier, F., Armaforte, E., and Kelly, A. L. 2009. Effect of high-pressure homogenisation on rheological properties of rennet-induced skim milk and standardised milk gels. *The Journal of Dairy Research*. 76: 294-300.
- Lozano, P.R., Drake, M., Benitez, D. and Cadwallader, K.R. 2007. Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 3018-3026.
- Malaki, A. N., Toshi, S., Poysa, V., Woodrow, L., and Corredig, M. 2008. Physicochemical characterization of soymilk after step-wise centrifugation. *Food Research International*. 41: 286-294.
- Mandalari, G., Nueno-Palop, C., Bisignano, G., Wickham, M.S.J. and Narbad, A. 2008. Investigation of the potential prebiotic properties of almond (*Amygdalus communis* L.) seeds. American Society for Microbiology. *Environment Microbiology*. Doi:10.1128/AEM.00739-08.
- Maresca, P., Dons_1, F., and Ferrari, G. 2011. Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. *Journal of Food Engineering*. 104; 364-372.
- McClements, D.J., Decker, E.A., and Popper, L. K. 2005. Biopolymer encapsulation and stabilization of lipid systems and methods for utilization thereof. *Food Technological*. 44:84-87.
- McCurdy, A.R., Nagel, C.W., and Swanson, B.G. 1983. Isolation and characterization of lipoxygenase in pinto dry beans. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 16(3): 179-184.
- McKay, A. M., Linton, M., Stirling, J., Mackle, A., and Patterson, M. F. 2011. A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenization (HPH). *Food Microbiology*. 28:1426-1431.
- McLafferty FW 2000. Wiley Registry of Mass Spectral Data.

- McSweeney, L., Healy, R., and Mulvihill, D. 2008. Effect of lecithin and monoglycerides on the heat stability of a model infant formula emulsion. *Food Hydrocolloids*. 22: 888–898.
- Mercanti, D. J., Guglielmotti, F., Patrignani, F., Reinheimer, J. A., and Quiberoni, A. 2012. Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. *Food Microbiology*. 29: 99-104.
- Mexis, S. F., and Kontominas, M. G. 2010. Effect of oxygen absorber, nitrogen flushing, packaging material oxygen transmission rate and storage conditions on quality retention of raw whole unpeeled almond kernels (*Prunus dulcis*). *LWT-Food Science and Technology*. 43(1): 1-11.
- Mexis, S.F., Badeka, A.V., Chouliara, E., Riganakos, K.A. and Kontominas, M.G. 2009. Effect of γ -irradiation on the physicochemical and sensory properties of raw unpeeled almond kernels (*Prunus dulcis*). 2009. *Innovation Food Science Emergent Technology*. 10: 87-92.
- Mexis, S.F., Riganakos, A.K. and Kontominas, M.G. 2011. Effect of irradiation, active and modified atmosphere packaging, container oxygen barrier and storage conditions on the physicochemical and sensory properties of raw unpeeled almond kernels (*Prunus dulcis*). *Journal Science, Food Agricultural*. 91: 634-649.
- Middelberg, A. 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*. 13: 491-551.
- Monaghan, E. K. 2008. Chemical Composition and protein antigenicity – Almond (*Prunus dulcis*) and macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) Seeds. *College of Human Sciences*. Florida State University. Tesis, pp. 51-54.
- Morales, M. T., and Aparicio, R. 1999. Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 76(3): 295–300.
- Morales, M. T., Luna, G., and Aparicio, R. 2005. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*. 91(2): 293–301.
- Morales, M. T., Rios, J. J., and Aparicio, R. 1997. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(7): 2666–2673.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J., and Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal*. 12: 907-913.
- Nath, D.S., Kislalioglu, R., and Friberg, S. 1983. Stability of emulsions stabilised by two physiological surfactants: α -phosphatidylcholine and sodium taurocholate. *Biophysical Chemistry*. 3:253-260.
- Nielsen, N.C., Nelson, M.J. Cowling, R.A. 1990. Observation of a peroxy radical in samples of purple lipoxygenase. *Journal Am. Chemistry Soc*, 112:2820-2826.
- Núñez M. T., and Martín S.V. 1990. Efficient oxidation of phenyl groups to carboxylic acids with ruthenium tetroxide. A simple synthesis of (R)- γ -caprolactone, the pheromone of *Trogoderma granarium*. *Journal of Organic Chemistry*. 55(6): 1928–1932. doi:10.1021/jo00293a044
- O’Conner, J.P., and O’Brien, N.M. 2002. Significance of lipoxygenases in fruits and vegetables. *Food enzymology* In P. F. Fox Edition. Elsevier. London, UK. Pp 37–372.

- Ostdal H, Andersen H, Nielsen J. 2000. Antioxidative activity of urate in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 48: 5588-5592.
- Paquin, P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal*. 9: 329-335.
- Paquin, P., Lacasse, J., Subirade, M., and Turgeon, S. 2003. Continuous process of dynamic high-pressure homogenization for the denaturation of proteins. US Patent 6,511,695 B1.
- Pathanibul, P., Taylor, T. M., Davidson, P. M., and Harte, F. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin. *International Journal of Food Microbiology*. 129: 316-320.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Lanciotti, R., and Guerzoni, M. E. 2009. Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology*. 136: 26-31.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Lanciotti, R., and Guerzoni, M. E. 2010. Potentialities of high-pressure homogenization to inactivate *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices. *Journal of Food Science*. 75: 116-120.
- Pearson, D., 1976. *The Chemical Analysis of Foods*. 7th Edition. Churchill Livingstone, London.
- Pedras, M. M., Pinho, C. R. G., Tribst, A. A. L., Franchi, M. A., and Cristianini, M. 2012. Mini review. The effect of high pressure homogenization on microorganisms in milk. *International Food Research Journal*. 19: 1-5.
- Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., and Trujillo, A. J. 2008. Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 111: 696-702.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., and Trujillo, A. J. 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science*. 90: 1081-1093.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., and Trujillo, A. J. 2009. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids*. 23: 1974-1979.
- Perrier-Cornet, J. M., Marie, P., and Gervais, P. 2005. Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering*. 66: 211-217.
- Picart, L., Thiebaud, M., Ren_e, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., and Dumay, E. 2006. Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*. 73: 454-463.
- Picuric-Jovanovic, K., and Milovanovic, M. 1993. Analysis of volatile compounds in almond and plum kernel oils. *Journal Am. Oil Chemistry. Soc.* 70: 1101-1104.
- Plutowska, B. and Wardencki, W. 2007. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*. 101: 845-872.
- Oomes, S.J.C.M., van Zuijlen, A.C.M., Hehenkamp, J.O., Witsenboer, H., van der Vossen, J.M.B.M., & Brul, S. 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the

manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 85-94.

Poliseli-Scopel, F., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., and Ferragut, V. 2012. Comparison of ultra-pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT e Food Science and Technology*. 46: 42-48.

Poliseli-Scopel, F.E., Hernández-Herrero, M., Guamis, B. and Ferragut, V. 2014. Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 22: 81-88.

Ponquett, R.T., Smith, M.T., and Ross, G. 1995. Lipid autoxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability. *Seed Science Research*. 2:51–54.

Popper, L., and Knorr, D. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*. 44: 84-89.

Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac'h, M.L., Pavan, S. and Sohier, D.L. 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology*. 158: 1-8.

Prasetyo, M., Chia, M., Hughey, C., Were, L.M. 2008. Utilization of electron beam irradiated almond skin powder as a natural antioxidant in ground top round beef. *Journal of Food Science*. 73:T1–T6.

Prescott, L. 1993. *Microbiology*, Wm. C. Brown Publishers, ISBN 0-697-01372-3.

Puig, A., Olmos, P., Quevedo, J. M., Guamis, B., and Minguez, S. 2008. Microbiological and sensory effects of musts treated by high-pressure homogenization. *Food Science and Technology International*. 14: 5-11.

Regnault, S., Dumay, E., and Cheftel, J. C. 2006. Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 °C or 20 °C: effects on the distribution of mineral and proteins between colloidal and soluble phases. *Journal of Dairy Research*. 73: 91-100.

Regnault, S., Thiebaud, M., Dumay, E., and Cheftel, J. C. 2004. Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 °C or 20 °C: effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal*. 14: 55-68.

Roach, A. and Harte, F. 2008. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9: 1-8.

Robinson, D.S., Zecai, W., Domoney, C. and Casey, R. 1995. Lipoxygenase and the quality of foods. *Food Chemistry*. 54: 33-43.

Rodríguez-Lozan, A., Campagnoli, M., Jewel, K., Monadjemi, F. and Gaze, J.E. 2010. *Bacillus* spp. thermal resistance and validation in soups In A.Mendez-Vilas, (Ed.), Current Research, Technology and Education. *Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*: 537-544. Formatex: Spain.

Roig-Sagués, A. X., Velazquez, R. M., Montealegre-Agramont, P., Lopez-Pedemonte, T. J., Brinez-Zambrano, W. J., Guamis- Lopez, B., et al. 2009. Fat content increases the lethality of ultrahigh- pressure homogenization on *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Science*. 92: 5396-5403.

- Roig-Sagués A. X., Asto, E.; Engers, I.; Hernández-Herrero. En prensa. Improving the efficiency of ultra-high pressure homogenization treatments to inactivate spores of *Alicyclobacillus* spp. in orange juice controlling the inlet temperature, *LWT-Food Science and Technology* [http:// dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.056](http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.056)
- Sahu, A., Kasoju, N., and Bora, U. 2008. Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. *Biomacromolecules*. 9: 2905-2912.
- Sandra, S. and Dalgleish, D.G. 2005. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*. 15: 1095-1104.
- Sathe, S. K. 1993. Solubilization, electrophoretic characterization and in Vitro digestibility of almond (*Prunus amygdalus*) proteins. *Journal.Food Biochemistry*. 16: 249-264.
- Sathe, S.K., Wolf, W.J., Roux, K.H., Teuber, S.S., Venkatachalam, M. and Sze-Tao, K.W.C. 2002. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Prunus dulcis* L.). *Journal Agric Food Chemistry*. 50:4333–4341.
- Sava, N., Rotaru, G., and Hendrickx, M. 2005. Heat-induced changes in solubility and surface hydrophobicity of β -lactoglobulin. *Scientifical researches. Agroalimentary processes and technologies*. 1:41-48.
- Schirra, M., Mulas, M., Nieddu, G. and Viridis, F. 1994. Mineral content in Texas almonds during fruit growth and ripening. *Acta Horticulturae*, 373: 207-214.
- Schubert, H., Ax, K., and Behrend, O. 2003. Product engineering of dispersed systems. *Trends in Food Science and Technology*. 14: 9-16.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., and Ulrich, J. 2004. High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering and Technology*. 27: 361-368.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., and Ferragut, V. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*. 23: 82-91.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Pereda, J., Guamis, B., and Ferragut, V. 2008. Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*. 89: 99-104.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., and Ferragut, V. 2007. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cow's milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*. 17: 782-790.
- Serra, M., Trujillo, A.J., Jaramillo, P.D., Guamis, B. and Ferragut, V. 2008a. Ultra-high pressure homogenization-induced changes in skim milk: Impact on acid coagulation properties. *Journal of Dairy Research*. 75: 69-75.
- Shapira, A., Assaraf, Y. G., and Livney, Y. D. 2010. Beta-casein nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 6. 119-126.
- Sharma, V., Singh, R.K. and Toledo, R.T. 2009. Microbial inactivation kinetics in soymilk during continuous flow high-pressure throttling. *Journal of Food Science*. 74, M268-M275.

- Shate, S. K. and Sze, K.W.C. 1997. Thermal aggregation of almond protein isolate. *Elsevier Science Ltd. Food Chemistry*. 59(1):95-99.
- Shate, S.K., Wolf, W.J., Roux, K.H., Teuber, S.S., Venkatacham, M. and Sze-Tao, K.W.C. 2002. Biochemical characterization of amandin, the major storage protein in almond (*Pronus dulcis* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 4333-4341.
- Sheard, P.R., Enser, M., Wood, J.D., Nute, G.R., Gill, B.P., Richardson, R.I. 2000. Shelf life and quality of pork and pork products with raised n.3 PUFA. *Meat Science*. 55:213-221.
- Shimoyamada M, Tsushima N, Tsuzuki K, Asao H, Yamauchi r. 2008. Effect of heat treatment on dispersion stability of soymilk and heat denaturation of soymilk protein. *Food Science Technology Res*. 14:32-38.
- Siedow, J.N. 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biological*. 42, 145-188.
- Singh, H., Ye, A., Zhu, X-Q. 2011. Emulsion. World patent, November 2011, WO 2011/136662 A1.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B. and Rothsein, S.J. 2000. Expression of allene oxide synthase determines defence gene activation in tomato. *Plant Physiolocal*. 122: 1335-1342.
- Smiddy, M. A., Martin, J. E., Huppertz, T., and Kelly, A. L. 2007. Microbial shelf-life of pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal*., 17: 29-32.
- Souty, M.; Andre', P.; Breuils, L.; Jacquemin, G. 1971. E' tude sur la qualite' des amandes: variabilite' de quelques caracte`res biochimiques. *Ann. Technological Agricultural*. 10: 121-130.
- Spiller, G.A., and Miller, A. 2003. Effects of plant-based diets high in raw or roasted almonds or roasted almond butter on serum lipoproteins in humans. *Journal of the American College of Nutrition*. 22:195-200.
- Stang, M., Schuchmann, H., and Schubert, H. 2001. Emulsification in high-pressure homogenizers. *Engineering in Life Sciences*. 1: 151-157.
- Suárez-Jacobo, _A., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X., and Saldo, J. 2010. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: a preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 261e267.
- Suárez-Jacobo, A., Saldo, J., R€ufer, C. E., Guamis, B., Roig-Sagu_es, A. X., and Gervilla, R. 2012. Aseptically packaged UHPHtreated apple juice: safety and quality parameters during storage. *Journal of Food Engineering*. 109: 291-300.
- Suárez, A., Gervilla, R., Guamis, B., Roig, A.X. and Saldo, J. 2010. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice a preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*. 136: 261-267.
- Subhashinee, S.K.W.S., and Shahidi, F. 2002. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. *JOACS*. 79(9): 903-908.
- Subirade, M., Loupil, F., Allain, A. F., and Paquin, P. 1998. Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of blactoglobulin and on its conformational properties as determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *International Dairy Journal*. 8: 135-140.

- Tadros, T. F., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 303e318.
- Tahari I, Makhouf J, Paquin P, Fliss I. 2006. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. *Food Research International*. 39:98-105.
- Tesch, S., and Schubert, H. 2002. Influence of increasing viscosity of the aqueous phase on the short-term stability of protein stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering*. 52: 305-312.
- Thiebaud M, Dummay E, Picart L, Guiraud J, Cheftel J. 2003. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*. 13:427-439.
- Tiwari, R.S., Venkatachalam, M., Sharma, G.M., Su, M., Roux, K.H. and Shate, S.K. 2010. Effect of matrix on amandin, almond (*Prunus dulcis* L.) major protein, immunorecognition and recovery. *LWT-Food Science and Technology*. 43(4): 675-683.
- Toro-Funes N., Bosch-Fusté J. Veciana-Nogués M. T., and Vidal-Carou M. T. 2014. Influence of Ultra-high-Pressure Homogenization Treatment on the Phytosterols, Tocopherols, and Polyamines of Almond Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 9539–9543.
- Tribst, A. A. L., Franchi, M. A., Cristianini, M., and De Massaguer, P. R. 2009. Inactivation of *Aspergillus niger* in mango nectar by highpressure homogenization combined with heat shock. *Journal of Food Science*. 74, 509-514.
- Vachon, J.F., Kheadr, E.E., Giasson, J., Paquin, P. Fliss, I. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*. 65:345-349.
- Valencia-Flores, D.C, Hernández-Herrero, M, Guamis, B. and Ferragut, V. 2013. Comparing the effects of ultra high pressure homogeization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of almond beverage. *Journal of Food Science*. 78(2):E199-E205.
- van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 73-82.
- Van der Ven, C., Matser, A.M. and Van den Berg, R. W. 2005. Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1087-1092.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D. and Guerzoni, M.E. 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 123-135.
- Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., Guamis-López, B., and Roig-Sagués, A. X. 2012. Impact of ultra-high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: a comparative study against conventional heat pasteurization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 13: 100-106.
- Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., López-Pedemonte, T. J., Briñez-Zambrano, W. J., Guamis-López, B., and Roig-Sagués, A. X. 2011. Inactivation of *Listeria*

monocytogenes and Salmonella enterica serovar Senftenberg 775W inoculated into fruit juice by means of ultra-high pressure homogenisation. *Food Control*. 22: 313-317.

Velázquez, R.M., Hernández, M., López, P. 2008. Guamis, B. and Roig, A.X. Inactivation of Salmonella enterica Serovar Senftenberg 775W in liquid whole egg by ultra high pressure homogenization. *Journal of Food Protection*. 71: 2283-2288.

Venkatachalam, M. and Sathe, S.K. 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 54: 4705–4714.

Vick, B.A. and Zimmerman, D.C. 1993. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. *The Biochemical Plants*. 9: 53-90.

Wang, B., Xiong, Y.L. and Wang, C. 2001. Physicochemical and sensory characteristics of flavored soymilk during refrigeration storage. *Journal of Food Quality*. 24: 513-526.

Wang, R., Zhou, X. and Chen, Z. 2008. High pressure inactivation of lipoxygenase in soy milk and crude soybean extract. *Food Chemistry*. 106: 603-611.

Watkins, C. 2005. The world of nuts. *Inform*. 4:200–201.

Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C. E., and Guerrero-Beltrán, J. A. 2009. High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 457-462.

Whitaker, J.R. 1991. Lipoxygenases. In D. S. Robinson, and N. A. M. Eskin (Eds.), *Oxidative enzymes in foods*. London, UK: Elsevier. (pp. 175–215)

Wilkens, W.F. and Lin, F.M. 1970. Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 18: 333-336.

Wilkens, W.F., Mattick, L.R., Hand, D.B. 1967. Effect of processing method on oxidation off-flavor of soybean milk. *Food Technology*. 21:86-89.

Wilkens, W.F., Mattick, L.R., Hand, D.B. 1967. Effect of processing method on oxidation off-flavor of soybean milk. *Food Technology*, 21:86-89.

Wolf, W.J. and Sathe, S.K. 1998. Ultracentrifugal and polyacrylamide gel electrophoretic studies of extractability and stability of almond meal proteins. *Journal Science Food Agricultural*. 78:511–521.

Wooster, T. J., Andrews, H. F., Sanguansri, P. 2009. Nanoemulsions. World patent, WO 2009/067734 A1.

Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., and Michiels, C. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 77: 205-212.

Zacheo, G. Cappello, A.R. Perrone L.M. Gnoni G.V. 1998. Analysis of Factors Influencing Lipid Oxidation of Almond Seeds during Accelerated Ageing. *Journal of Technological*. 31:6–9.

Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., and Trujillo, A. J. 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheesemaking properties of milk. *Journal of Dairy Science*. 90: 13-23.

Zamora, A., Ferragut, V., Juan, B., Guamis, B., and Trujillo, A. J. 2011. Effect of ultra-high pressure homogenisation of milk on the texture and water-typology of a starter-free fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 484-490.