

**Estudio del proceso de obtención de zumo de  
arándanos y su utilización como ingrediente  
para la obtención de un alimento funcional  
por impregnación a vacío**

**JUAN MANUEL CASTAGNINI**

**EDITORIAL  
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

*Colección Tesis Doctorales*

© Juan Manuel Castagnini

© 2014, de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València  
Telf.: 963 877 012 / [www.lalibreria.upv.es](http://www.lalibreria.upv.es)

ISBN: 978-84-9048-249-0 (version CD-Rom)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

**ESTUDIO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
ZUMO DE ARÁNDANOS Y SU UTILIZACIÓN  
COMO INGREDIENTE PARA LA OBTENCIÓN  
DE UN ALIMENTO FUNCIONAL POR  
IMPREGNACIÓN A VACÍO**

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**TESIS DOCTORAL**

Realizada por: Juan Manuel Castagnini

Dirigida por: Dra. Noelia Betoret Valls  
Dr. Pedro Fito Maupoey

Valencia, Junio de 2014



---

*Gracias a mis padres, hermano y familia por haberme apoyado desde tan lejos durante estos tres años de doctorado, por el esfuerzo que han hecho para estar siempre a mi lado. A mis abuelos, por su constancia y esfuerzo para hablar por Skype y darme sus fuerzas.*

*Gracias a mi novia, Gabi, por el apoyo, las risas y los llantos, las alegrías, la paz, por el aguante, el amor y el cariño.*

*Gracias a Jorge, Pedro, Noelia y Daniel por haberme facilitado los medios necesarios para ganar la beca Eurotango.*

*Gracias a Noelia y a Pedro, por su amistad, su excelente criterio, los consejos, el apoyo, por todas las oportunidades que me han dado, por haberme guiado durante estos tres años.*

*Gracias a mis compañeros de viaje, Nahuel y Javier, porque sin conocernos nos embarcamos en esta aventura juntos, por las cervezas, las risas, el apoyo, la música, gracias por el apodo de "Tyson". Gracias a Mica, Merce y Pau por todos los momentos compartidos, por las historias y los viajes.*

*Gracias a mis compañeros de laboratorio y del instituto, gracias a Ester y Marek por su amistad, por los consejos, por las charlas y las catarsis. Gracias a Nuria, por haberme acompañado en los últimos experimentos con levaduras, por las risas y la buena onda.*

*Gracias a Laura, por su amistad y compañía, por sus consejos y alegría, por los abrazos y su cariño.*

*Gracias a los juanes (Juan Facundo, Juan Cruz), por haberme dado una mano durante la última etapa del doctorado, por los mates compartidos y ese toque de argentinidad en el laboratorio.*

*Gracias al programa Eurotango - Erasmus Mundus Action II por haberme dado la oportunidad de realizar este doctorado y progresar tanto académicamente como culturalmente. Gracias al personal de la oficina de programas internacionales: Begoña, Ester y Geraldine.*



# Resumen

## **Resumen.**

La presente tesis doctoral se plantea sobre la necesidad de buscar alternativas de industrialización que permitan dar salida al excedente de producción de arándanos en la Región de Entre Ríos (Argentina). Se proponen mejoras para la etapa de despectinización y se evalúa la introducción de la operación de homogenización a altas presiones en el diagrama de flujo del proceso de elaboración de zumo de arándano. Además se establecen las bases para llevar a cabo el desarrollo tecnológico de aperitivos de fruta que incluyan el zumo de arándano como ingrediente, pudiendo aprovechar los beneficios de sus componentes activos. En primer lugar se analizó el mercado de bebidas comerciales con arándanos disponibles en Concordia (Argentina) y Valencia (España). Se encontraron doce bebidas con arándanos, ocho de las cuales estaban elaboradas con arándanos azules y cuatro con arándanos rojos. Las doce bebidas han sido caracterizadas desde el punto de vista comercial: tipo de bebida, fabricante, ingredientes, alegaciones nutricionales, envase, precio y punto de venta. Las bebidas con arándanos azules fueron analizadas fisicoquímica y funcionalmente. Los resultados revelaron que las bebidas comerciales con arándanos están poco estandarizadas, presentando una composición variable y en algunos casos no definida claramente. En cuanto a la calidad funcional de las bebidas, el análisis por HPLC ha permitido comprobar que las bebidas provenientes del mercado argentino no contenían antocianinas. Esto puso en evidencia procesos de elaboración deficientes que utilizan condiciones de altas temperaturas y favorecen los

---

procesos de oxidación que provocan pérdidas importantes de compuestos funcionales. Puesto que el contenido de antocianinas monoméricas y fenoles totales en el zumo de arándanos es el principal responsable de sus efectos beneficiosos para la salud, se realizó un estudio del proceso de elaboración de zumo de arándanos para obtener un producto con un elevado contenido en compuestos bioactivos. En este sentido, se determinó que la etapa crítica del proceso de obtención de zumo de arándanos es la despectinización enzimática del mismo. La despectinización del zumo de arándanos fue estudiada en términos de la fuente de enzimas, la temperatura y el tiempo de tratamiento necesarios para obtener un producto con adecuadas propiedades tecnológicas y funcionales. En primer lugar se realizó el estudio con dos packs enzimáticos comerciales, Viscozyme L<sup>®</sup> y Rapidase ex color<sup>®</sup>, a temperaturas de 50 y 60°C y a tiempos de tratamiento de 60 y 150 minutos. El zumo obtenido para cada combinación de condiciones fue analizado desde el punto de vista físicoquímico y funcional. Los resultados permitieron seleccionar las condiciones de tratamiento: 50°C, 150 min y pack Viscozyme L<sup>®</sup>, como las mejores para obtener un zumo de arándanos con un alto contenido en compuestos bioactivos. Adicionalmente, en esta etapa del proceso se estudió la posibilidad de introducir una mejora utilizando como fuente de enzimas pectinolíticas, levaduras con elevada actividad endopoligalacturonasa. Estas levaduras fueron obtenidas por una técnica novedosa de modificación genética denominada evolución genómica por diseño molecular. Una vez que se determinó cualitativamente y cuantitativamente la actividad enzimática de extractos de levadura provenientes de la cepa original y tres de sus transformantes, se seleccionó el de mayor actividad y se aplicó en la despectinización de zumo de arándanos. Si bien los resultados obtenidos indican que es necesario realizar un estudio de la dosificación del extracto de levadura para obtener un producto con adecuadas propiedades reológicas, desde el punto de vista funcional se observó una menor polimerización de antocianinas y un mayor contenido de fenoles totales en el producto final. Además, desde el punto de vista industrial, la utilización de estas enzimas supondría un importante ahorro energético ya que la despectinización se realiza a temperatura ambiente. Por otro lado, al proceso de elaboración de zumo de arándanos se le introdujo una operación de homogenización a altas presiones y se evaluó el efecto del tratamiento sobre las características físicas (tamaño de partícula, pulpa suspendida y turbidez) y sobre el contenido de



---

componentes funcionales. Se aplicaron cuatro niveles de presión (25, 50, 100 y 150MPa). Los resultados fueron comparados con zumo de arándano sin tratamiento de homogenización. En el amplio rango de presiones estudiadas si bien se detectó una ligera disminución en antocianinas monoméricas, se registró un aumento en el contenido de fenoles y en la capacidad antioxidante. El conjunto de los resultados obtenidos indica que la operación de homogenización puede aplicarse en el zumo de arándanos con distintos objetivos, ya sea mejorar la estabilidad de la nube del zumo, para modificar las propiedades funcionales del zumo o como pretratamiento para mejorar la impregnación a vacío de estructuras porosas. Por último, utilizando el zumo de arándanos como ingrediente funcional se desarrollaron por medio de la técnica de impregnación a vacío dos aperitivos saludables, uno de manzana y zumo de arándanos y otro de manzana, zumo de arándanos y *Lactobacillus salivarius spp. salivarius* como microorganismo probiótico. En el desarrollo del primer aperitivo se evaluó el efecto de la etapa de estabilización por secado con aire caliente a tres temperaturas 30, 40 y 50°C sobre las propiedades fisicoquímicas y la calidad funcional del producto final. Además la operación de secado se comparó con la de liofilización. El secado con aire caliente produjo importantes pérdidas de antocianinas, en tanto que la liofilización no afectó el contenido de las mismas. Entre las condiciones de secado, la temperatura de 40°C es la que permitió obtener un producto de mejor calidad tanto funcional como física. En cuanto al aperitivo con probiótico, se evaluó la mejor condición de pH del zumo de arándanos para el máximo desarrollo del microorganismo. Después de hacer crecer el lactobacilo en el zumo de arándanos lo introdujo en el interior de la matriz de manzana por impregnación a vacío, el aperitivo fue secado a 30°C y se realizó un recuento del mismo en el producto final. El aperitivo obtenido supone una alternativa a los productos lácteos con probióticos, pudiendo ser consumido por colectivos intolerantes a la lactosa. Además la inclusión del producto en la dieta de niños infectados con *H. pylori* podría disminuir el nivel de infección y aliviar los síntomas relacionados con la inflamación de la membrana gástrica.

---

## Resum.

Aquesta tesi doctoral sorgeix de la necessitat de buscar alternatives d'industrialització que donen eixida a l'excedent de producció de nabius a la regió d'Entre Ríos (Argentina). Es proposen millores a l'etapa de despectinització i s'avalua la incorporació de l'operació d'homogeneïtzació a altes pressions al procés d'elaboració de suc de nabiu. A més a més, s'estableixen les bases per dur a terme el desenvolupament tecnològic d'aperitius de fruita que incloguin el suc de nabiu com ingredient, aprofitant així els beneficis dels seus components actius. En primer lloc s'analitzà el mercat de begudes comercials amb nabius disponibles a Concordia (Argentina) i València (Espanya). Es trobaren dotze begudes amb nabius, huit d'elles amb nabius blaus i quatre amb nabius rojos. Les dotze begudes s'han caracteritzat comercialment incloent: tipus de beguda, fabricant, ingredients, al·legacions nutricionals, envàs, preu i punt de venda. Les begudes amb nabius blaus van ser analitzades físicocòmica i funcionalment. Els resultats posaren de manifest que les begudes comercials amb nabius són poc estandarditzades, tenen una composició variable i en alguns casos no està clarament definida. Pel que fa a la qualitat funcional de les begudes, l'anàlisi HPLC ha permès comprovar que les begudes del mercat argentí no contenen antocianines. Aquest fet posa en evidència deficiències en els processos d'elaboració, que empren altes temperatures i afavoreixen els processos d'oxidació que provoquen pèrdues importants de components funcionals. Donat que el contingut d'antocianines monomèriques i fenols totals en el suc de nabiu és el principal responsable dels seus efectes beneficiosos per a la salut, es realitzà un estudi del procés d'elaboració de suc de nabius per obtenir un producte amb un contingut elevat en compostos bioactius. En aquest sentit, es determinà que l'etapa crítica del procés d'obtenció de suc és la despectinització enzimàtica. Així, la despectinització del suc es va estudiar tenint en compte la font d'enzims, la temperatura i el temps de tractament necessaris per obtenir un producte amb propietats tecnològiques i funcionals adequades. En primer lloc, es realitzà l'estudi amb dos pacos enzimàtics comercials, Viscozyme L<sup>®</sup> y Rapidase ex color<sup>®</sup>, a les temperatures de 50 i 60°C amb temps de tractament de 60 i 150 minuts. El suc obtingut en cada cas va ser analitzat físicocòmica i funcionalment. Els resultats permeten establir les condicions de 50°C, 150 minuts i el paco Viscozyme L<sup>®</sup> com les millors per obtenir

---

un suc de nabiu amb un nombre elevat de compostos bioactius. A més, en aquesta etapa del procés s'estudià la possibilitat d'introduir una millora utilitzant com a font d'enzims pectolítics, llevats amb alta activitat endopoligalacturonasa. Aquests llevats van ser obtinguts amb una nova tècnica de modificació genètica denominada evolució genòmica per disseny molecular. Una vegada determinada qualitativa i quantitativament l'activitat enzimàtica dels extractes de llevat provinents del cep original i de tres dels seus transformats, es va seleccionar el de major activitat i es va utilitzar per a la despectinització del suc de nabius. Si bé els resultats obtinguts indiquen que es necessari realitzar un estudi amb més profunditat de la dosificació de l'extracte de llevats per obtenir un producte amb propietats reològiques adequades, en relació a les propietats funcionals s'observà una menor polimerització de antocianines i un major contingut de fenols totals en el producte final. A nivell industrial, la utilització d'aquests enzims suposaria un important estalvi energètic ja que la despectinització es realitza a temperatura ambient. Per altra banda, al procés d'elaboració de suc de nabius se li va introduir l'operació d'homogeneïtzació a altes pressions i es va avaluar l'efecte del tractament sobre les característiques físiques (tany de partícula, polpa en suspensió i turbidessa) i sobre el contingut en components funcionals. S'aplicaren quatre nivells de pressió (25, 50, 100 y 150MPa). Els resultats van ser comparats amb els del suc de nabius sense el tractament d'homogeneïtzació. A tots els nivells de pressió aplicats, si bé es detecta una lleugera disminució en el contingut d'antocianines monomèriques, es registrà un augment en el contingut de fenols i en la capacitat antioxidant. El conjunt dels resultats obtinguts indiquen que l'operació d'homogeneïtzació es pot aplicar al suc de nabius amb diferents objectius, bé per millorar l'estabilitat del núvol del suc, per modificar les propietats funcionals del mateix o com a pretractament per a millorar la impregnació a vuit d'estructures poroses. Per últim, s'utilitzà el suc de nabius com a ingredient funcional i es desenvoluparen, mitjançant la tècnica d'impregnació a vuit, dos aperitius saludables, un de poma i suc de nabius i altre de poma, suc de nabius i *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* com a microorganisme probiòtic. En el desenvolupament del primer aperitiu s'avaluà l'efecte de l'etapa d'estabilització, deshidratació amb aire calent, a tres temperatures (30, 40 i 50°C) sobre les propietats fisicoquímiques i la qualitat funcional del producte final. A més, l'operació de deshidratació es comparà amb la de li-

---

oflització. La deshidratació amb aire calent va produir importants pèrdues d'antocianines, mentre que la liofilització no afectà el contingut d'aquestes. A l'operació de deshidratació amb aire calent, la temperatura de 40°C és la que va permetre obtenir un producte de major qualitat tant funcional com física. En relació amb l'aperitiu amb microorganismes probiòtics, s'avaluà la millor condició de pH del suc de nabius per aconseguir el màxim creixement del microorganisme. Després de fer créixer el lactobacil al suc, es va introduir a l'interior de la matriu de poma mitjançant la impregnació a vuit, l'aperitiu fou assecat a 30°C i es realitzà un recompte en el producte final. L'aperitiu obtingut suposa una alternativa als productes lactis amb probiòtics, i pot ser consumit per col·lectius intolerants a la lactosa. A més a més, la incorporació del producte a la dieta dels xiquets infectats per *H. Pylori* podria disminuir el nivell d'infecció i alleugerar els símptomes relacionats amb la inflamació de la membrana gàstrica.

## **Abstract.**

The doctoral thesis presented is conceived by the need to find alternatives to industrializing the surplus production of blueberries in the region of Entre Ríos (Argentina). Improvements for the depectinization operation are proposed and it is evaluated with inclusion of a high pressure homogenization treatment in the flow chart of blueberry juice production. This also constitutes the framework to carry out technological development of fruit snacks that include blueberry juice an ingredient in order to benefit from its bioactive compounds. First, the blueberry beverage market in Concordia (Argentina) and in Valencia (Spain) was analyzed. Eight beverages including blueberry juice and four with cranberrie juice were found. The twelve samples were characterized from the market point of view taking into account the type of beverage, manufacturer, ingredients, nutrition claims, package, price and selling point. The beverages elaborated with blueberry juice were also physicochemically and functionally analyzed. The results revealed that commercial blueberry beverages are poorly standardized, of variable composition and in some cases not clearly defined. Regarding the beverage functional quality, HPLC analysis showed that drinks from the argentine market did not contain anthocyanins. This revealed poor manufacturing

---

processes that use high temperature conditions and promote oxidation phenomena causing significant losses of functional compounds. Considering the content of monomeric anthocyanins and total phenolics in blueberry juice are primarily responsible for its beneficial effects on health, a study of the process of blueberry juice manufacturing in order to obtain a product with a high content of bioactive compounds was carried out. In this sense, it was established that enzymatic depectinization is a critical operation. Depectinization was studied in terms of enzyme source, temperature and duration of the treatment required to obtain a product with high content of bioactive compounds. First, it was analyzed the depectinization with two commercial enzymatic packs, Viscozyme L<sup>®</sup> y Rapidase ex color<sup>®</sup>, at 50 and 60°C during 60 and 150 minutes. The juice obtained in each case was characterized in terms of physicochemical and functional properties. The results indicated that the best conditions of processing were: 50°C, 150 minutes with Viscozyme L<sup>®</sup> pack. Additionally, in this process step the possibility to introduce an improvement using as source of pectinolytic enzymes, yeasts with high endopolygalacturonase activity was evaluated. These yeasts were obtained by a novel technique of genetic modification called genomic evolution by molecular design. Firstly, the enzymatic activity of yeast extracts from the parental strain and three of his transformants was determined qualitatively and quantitatively. After that, the most active extract was selected and applied in depectinization of blueberry juice. While the results indicate the need to study the dosage of yeast extract to obtain a product with suitable rheological properties, from the functional point of view it was observed a lower polymerization of anthocyanins and a higher content of total phenolics. Furthermore, from an industrial point of view, the use of these enzymes represents significant energy savings because the depectinization is performed at room temperature. Moreover, it was determined the effect of the incorporation of a high pressure homogenization step in the process of manufacturing blueberry juice. Four levels of pressure (25, 50, 100 and 150MPa) were applied. The effect of the pressure treatment on physical characteristics (particle size of suspended pulp and turbidity) and the content of functional components was evaluated. In the range of pressures studied, while a slight decrease in monomeric anthocyanins was found, an increase in the content of phenol and antiradical capacity was detected. The set of results indicates that homogenization operation can

---

be applied with different objectives, either to improve the stability of the cloud juice, to modify the functional properties or as a pretreatment to improve vacuum impregnation of porous structures. Finally, using blueberry juice as a functional ingredient two healthy snacks, one made from apple and blueberry juice and another made from apple, blueberry juice and *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* as a probiotic microorganism, were developed by vacuum impregnation technique. In developing the first snack was evaluated the effect of stabilization by air-drying at three different temperatures 30, 40 and 50°C on the physicochemical properties and the functional quality of the final product. Furthermore the drying process was compared with lyophilization. The hot air drying resulted in significant losses of anthocyanins, whereas lyophilization did not affect in any extent the content of the bioactive compound. Among the conditions of drying, the process performed at 40°C allowed to obtain a snack with better functional and physical characteristics. For the probiotic snack, the best pH condition of blueberry juice for the maximum development of microorganism was evaluated. After growing the lactobacillus in blueberry juice was introduced inside the apple matrix by vacuum impregnation, the snack was air-dried at 30°C and a plate count was made of it in the final product. The snack obtained is an alternative to dairy products with probiotics, and may be consumed by lactose intolerant groups. Besides, the inclusion of the product in the diet of children infected with *H. pylori* may reduce the level of infection and relieve symptoms related to inflammation of the gastric membrane.

# Índice general

Resumen	V
Índice general	XIII
I Introducción	1
1 Introducción	3
1.1 Importancia económica del cultivo del arándano. . . . .	3
1.2 Aplicación de nuevas tecnologías en la elaboración de zumo de arándano. . . . .	11
1.3 Los alimentos funcionales naturales. Desarrollo tecnológico por impregnación a vacío. . . . .	24
II Objetivos y Plan de trabajo	33
2 Objetivos y Plan de trabajo	35
2.1 Justificación e interés de la tesis doctoral. . . . .	35

2.2	Objetivos. . . . .	37
2.2.1	Objetivos generales. . . . .	38
2.2.2	Objetivos específicos. . . . .	39
2.3	Plan de trabajo. . . . .	40
III	Métodos y equipos	45
3	Métodos analíticos	47
3.1	Análisis fisicoquímicos. . . . .	47
3.1.1	Sólidos solubles, pH y acidez. . . . .	47
3.1.2	Humedad y actividad de agua. . . . .	48
3.1.3	Pulpa suspendida y turbidez. . . . .	48
3.1.4	Tamaño de partícula por difracción láser. . . . .	48
3.1.5	Análisis reológico. . . . .	49
3.1.6	Color Instrumental. . . . .	49
3.1.7	Análisis de textura. . . . .	49
3.2	Análisis funcionales. . . . .	51
3.2.1	Antocianinas. . . . .	51
3.2.2	Fenoles totales. . . . .	53
3.2.3	Capacidad antirradical. . . . .	53
3.2.4	Análisis estadístico. . . . .	54
4	Equipos e instalaciones utilizadas	55
4.1	Homogeneización. . . . .	55
4.2	Impregnación a vacío. . . . .	55
4.3	Secado. . . . .	56



IV	Resultados y discusión	57
5	Mejora del proceso de obtención de zumo de arándanos	59
5.1	Análisis de mercado. . . . .	59
5.1.1	Características fisicoquímicas de las bebidas comerciales. . . . .	65
5.1.2	Propiedades funcionales de las bebidas comerciales. . . . .	69
5.1.3	Perfil de antocianinas analizadas por cromatografía líquida (HPLC). 71	
5.1.4	Conclusiones parciales. . . . .	73
5.2	Despectinización de zumo de arándanos. . . . .	74
5.2.1	Caracterización de la materia prima. . . . .	75
5.2.2	Despectinización enzimática con packs comerciales. . . . .	75
5.2.3	Pérdida de componentes activos como consecuencia de las opera- ciones de despectinización y separación de sólidos. . . . .	81
5.2.4	Despectinización enzimática con levaduras con alta actividad en- dopoligalacturonasa. . . . .	83
5.2.5	Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa. . .	87
5.2.6	Métodos para determinar la actividad enzimática. . . . .	87
5.2.7	Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de los ex- tractos de levadura. . . . .	93
5.2.8	Despectinización del zumo de arándanos con el extracto de leva- dura 1926-12T4PO. . . . .	95
5.2.9	Conclusiones parciales. . . . .	97
5.3	Homogeneización de zumo de arándano. . . . .	98
5.3.1	Conclusiones parciales. . . . .	105

6	Utilización del zumo de arándanos como ingrediente funcional	107
6.1	Desarrollo de un aperitivo funcional de manzana y zumo de arándanos.	107
6.1.1	Efecto de la impregnación a vacío sobre las propiedades funcionales del zumo de arándano.	108
6.1.2	Efecto de la liofilización y de la temperatura de secado por aire caliente sobre las propiedades funcionales de un aperitivo de manzana y zumo de arándano.	113
6.1.3	Características físicas del producto final.	117
6.1.4	Conclusiones parciales.	120
6.2	Desarrollo de un aperitivo antioxidante y probiótico.	120
6.2.1	Efecto del pH en el crecimiento del probiótico.	122
6.3	Conclusiones parciales.	124
V	Conclusiones	127
7	Conclusiones.	129
VI	Bibliografía	133
	Bibliografía	135
VII	Anexos	167

# Índice de figuras

1.1. Superficie cultivada y producción mundial. . . . .	4
1.2. Productos derivados del arándano en Estados Unidos (2011)	5
1.3. Localización geográfica del cultivo del arándano en España.	6
1.4. Localización geográfica del cultivo del arándano en Argentina.	7
1.5. Evolución de la superficie dedicada al cultivo del arándano en Argentina. . . . .	8
1.6. Destinos de las exportaciones argentinas de arándano. . . .	9
1.7. Estructuras generales de los flavanoles y las antocianinas (De Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera, 2010). . . . .	12
3.1. Curva típica del ensayo de punción de rodajas de manzana.	50
5.1. Distribución del tamaño de partícula en las bebidas comerciales. . . . .	67
5.2. Correlaciones entre el tamaño de partícula por difracción láser y el contenido de pulpa suspendida. . . . .	68
5.3. Comportamiento reológico de las bebidas comerciales. . . .	70

5.4. Correlaciones entre la capacidad antirradical y el contenido de fenoles totales en las bebidas comerciales. . . . .	71
5.5. Perfil de antocianinas específicas obtenido en las bebidas comerciales. . . . .	72
5.6. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del zumo de arándanos. . . . .	74
5.7. Gráficos de interacciones estadísticamente significativas para las antocianinas monoméricas totales. . . . .	78
5.8. Gráficos de interacciones estadísticamente significativas para el índice de color polimérico. . . . .	79
5.9. Diagrama de flujo del proceso de obtención de zumo de arándano. . . . .	82
5.10. Secuencias de los transformantes obtenidos a partir de la cepa CECT-1926 por Sani (2013). . . . .	85
5.11. Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa de las distintas cepas de levadura. . . . .	87
5.12. Ajuste del método del DNS. . . . .	89
5.13. Determinación de la actividad enzimática a 540nm. . . . .	91
5.14. Curva de calibrado para la cuantificación de azúcares reductores. . . . .	92
5.15. Curva de calibrado para la cuantificación de proteína. . . . .	93
5.16. Distribución del tamaño de partícula en los zumos tratados a las diferentes presiones de homogeneización. . . . .	100

5.17. Perfil de antocianinas específicas en los zumos tratados a distintas presiones de homogeneización. a. Zumo de arándano sin homogeneizar, b. Zumo de arándano homogeneizado a 25MPa, c. Zumo de arándano homogeneizado a 50MPa, d. Zumo de arándano homogeneizado a 100MPa, e. Zumo de arándano homogeneizado a 150MPa . . . . .	104
6.1. Diagrama de flujo del proceso experimental. . . . .	108
6.2. Distribución del tamaño de las partículas suspendidas en el zumo de arándano. . . . .	110
6.3. Capacidad antirradical de las diferentes muestras por 100g de producto (a) y 100g de materia seca (b). La concentración está expresada en miligramos de ácido ascórbico equivalente para el método del DPPH y en miligramos equivalentes de trolox para el método del ABTS. . . . .	116
6.4. Cromatogramas de las muestras analizadas por HPLC. a. Zumo de arándano, b. Manzana fresca, c. Manzana impregnada y liofilizada, d. Aperitivo secado a 30°C, e. Aperitivo secado a 40°C, f. Aperitivo secado a 50°C. Pico N° 1: delphinidina, 2: cianidina y 3: malvidina. . . . .	118
6.5. Diagrama del procedimiento experimental para obtener un aperitivo probiótico. . . . .	122



# Índice de tablas

5.1. Bebidas comercializadas con arándanos en el mercado argentino y español. . . . .	63
5.2. Propiedades fisicoquímicas de las bebidas comerciales. . . . .	66
5.3. Pulpa suspendida y turbidez de las bebidas comerciales. . . . .	66
5.4. Tamaño de partícula de las bebidas comerciales. . . . .	68
5.5. Propiedades ópticas de las bebidas comerciales. . . . .	69
5.6. Propiedades reológicas de las bebidas comerciales. . . . .	70
5.7. Propiedades funcionales de las bebidas comerciales. . . . .	71
5.8. Propiedades fisicoquímicas de los arándanos utilizados como materia prima. . . . .	75
5.9. Factores del diseño experimental propuesto para el análisis de la operación de despectinización . . . . .	76
5.10. Propiedades funcionales del zumo de arándano despectinizado con los diferentes packs enzimáticos comerciales en las diferentes condiciones estudiadas. . . . .	77
5.11. Propiedades reológicas del zumo de arándano despectinizado con los diferentes packs enzimáticos comerciales en las diferentes condiciones estudiadas. . . . .	80

5.12. Color del zumo de arándano despectinizado con los diferentes packs enzimáticos comerciales en las diferentes condiciones estudiadas. . . . .	81
5.13. Contenido de antocianinas totales, fenoles totales y color polimérico del arándano fresco, l zumo obtenido y los residuos sólidos resultantes después de la despectinización a 50°C con el pack Viscozyme L durante 150 minutos y posterior separación de sólidos. . . . .	82
5.14. Área del halo de inhibición resultante de la actividad endopoligalacturonasa para las distintas cepas de levadura. . . . .	88
5.15. Curvas de calibrado sin y con adición de ácido poligalacturónico. . . . .	89
5.16. Actividades enzimáticas de las distintas cepas de levadura. . . . .	94
5.17. Actividad enzimática de los extractos de levadura y packs comerciales. . . . .	95
5.18. Propiedades reológicas del zumo despectinizado mediante un extracto enzimático de levadura. . . . .	96
5.19. Color instrumental del zumo despectinizado mediante un extracto enzimático de levadura. . . . .	96
5.20. Propiedades funcionales del zumo despectinizado con extracto de levadura 1926-12T4PO. . . . .	97
5.21. Propiedades fisicoquímicas de los arándanos congelados y el zumo de arándano. . . . .	98
5.22. Pulpa suspendida y turbidez de los zumos homogeneizados a distintas presiones. . . . .	99
5.23. Tamaño de partícula de los zumos de arándanos tratados a las diferentes presiones de homogeneización. . . . .	101



---

5.24. Color instrumental de los zumos tratados a distintas presiones de homogeneización. . . . .	102
5.25. Propiedades funcionales de los zumos tratados a diferentes presiones de homogeneización. . . . .	103
5.26. Contenido de antocianinas específicas para los zumos homogeneizados a las diferentes presiones. . . . .	104
5.27. Parámetros del modelo hidrodinámico de impregnación a vacío.	105
6.1. Tamaño de partículas, pulpa suspendida, turbidez y propiedades reológicas del zumo de arándano. . . . .	109
6.2. Fenoles totales, antocianinas monoméricas y capacidad anti-radical del zumo de arándano y el zumo residual después de tres impregnaciones a vacío sucesivas. . . . .	112
6.3. Contenido de antocianinas individuales en el zumo y la manzana impregnada. . . . .	113
6.4. Humedad y actividad de agua de las muestras frescas, impregnadas y deshidratadas en las diferentes condiciones. . .	117
6.5. Color instrumental en el espacio CIE L*a*b*. . . . .	118
6.6. Diferencias colorimétricas de las muestras liofilizadas y deshidratadas por aire caliente. . . . .	119
6.7. Características texturales de las muestras liofilizadas y deshidratadas por aire caliente. . . . .	120
6.8. Efecto del pH sobre el crecimiento microbiano. . . . .	123
6.9. Valor nutricional de láminas de manzana impregnadas con zumo de arándano inoculado con <i>Lactobacillus salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> . . . . .	123



Parte I

Introducción



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Importancia económica del cultivo del arándano.

#### *Distribución geográfica y producción mundial.*

El arándano azul (en inglés: blueberry) es un arbusto perenne nativo del este de América del Norte, perteneciente a la familia *Ericaceae*, género *Vaccinium*, subgénero *Cyanococcus*.

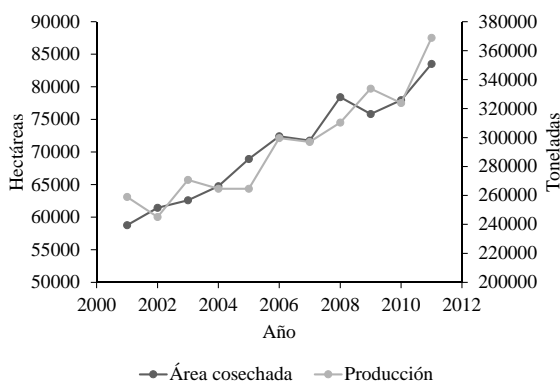
Los arándanos representan una de las especies de más reciente domesticación, ya que los primeros programas de selección de arbustos y técnicas de propagación datan de finales del siglo XIX en Norteamérica.

Las especies cultivadas con más relevancia comercial representan un 80 % de la superficie total para el *Vaccinium corymbosum* (Highbush), un 15 % para el *Vaccinium ashei* (Rabbiteye) y un 5 % para el *Vaccinium angustifolium* (Lowbush).

Estados Unidos es el principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo, junto a Canadá abarcan el 90 % del área productiva total, seguido de Chile (pionero del cultivo del arándano en el hemisferio sur), Argentina, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica. Los prin-

principales países productores europeos son, por este orden: Polonia, Alemania, España, Francia, Italia, Reino Unido, Holanda y Portugal (García Rubio, García Gonzalez de Lena, & Ciordia Ara, 2013).

En la [figura 1.1](#) se puede observar que la superficie cultivada y la producción a nivel mundial de arándanos han mantenido un ritmo constante de crecimiento durante los últimos diez años.



**Figura 1.1.** Superficie cultivada y producción mundial.

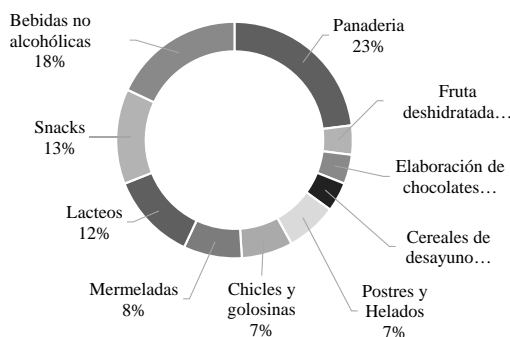
En diez años, la producción de arándanos ha mostrado un crecimiento cercano al 40%. En los últimos años el cultivo se ha expandido hacia nuevas zonas productoras, siendo las de mayor crecimiento el norte de Europa, España, sudeste de Canadá, costa este de Estados Unidos, Chile, Argentina y ciertas partes de Asia, particularmente China (Brazelton & Strik, 2007).

A pesar de que a nivel mundial el 65% de la producción total del arándano highbush se comercializa como fruta fresca, en los últimos diez años, la industria del arándano ha experimentado un acusado crecimiento con un consumo per cápita en aumento cada año y con una entrada en el mercado de nuevos productos. Como dato, en 2008, se introdujeron en Estados Unidos más de 1400 nuevos productos que contenían arándano (Villata, 2010).

Los productos finales ofrecidos que contienen arándano engloban las siguientes categorías: arándano fresco o rehidratado (yogures y helados; mermela-

das y jaleas; elaboración de salsas y cremas para untar y rellenos; arándanos enlatados en almíbar; extracción de colorantes alimentarios; golosinas y caramelos), arándano deshidratado (consumo como fruta deshidratada tipo snack; uso en repostería; con cereales de desayuno; relleno de tableta de chocolate), jugo fresco o concentrado de arándano (bebidas no alcohólicas: zumos 100 %, concentrados, bebidas a base de concentrado, néctares, purés; bebidas energéticas o alcohólicas: licores) y extractos vegetales de arándano (complementos alimenticios; colorantes)(Villata, 2010).

Las cifras de consumo de estos productos varían según el hábito de cada país. Estados Unidos produce gran cantidad de arándano fresco y congelado por lo que posee una cultura de consumo y ofrece en el mercado una amplia gama de productos derivados, tal y como muestra la [figura 1.2](#).



**Figura 1.2.** Productos derivados del arándano en Estados Unidos (2011)

### *Situación en España: cultivo, producción y consumo*

En España, en estado silvestre, se pueden encontrar tres especies, todas ellas en montañas altas y ambientes minimamente húmedos: arándano común (*Vaccinium myrtillus*), arándano negro (*Vaccinium uliginosum*) y arándano rojo (*Vaccinium vitisidaea*), mucho más raro. La especie con mayor presencia es *V. mirtyllus* que se distribuye por la cornisa Cantábrica, Gredos, Guadarrama, y Pirineos Catalán y Aragonés.



**Figura 1.3.** Localización geográfica del cultivo del arándano en España.

Sin embargo, las especies cultivadas en territorio nacional distan de las silvestres y se distribuyen como se observa en la [figura 1.3](#). La primera parcela, para el cultivo del arándano en España, surge a mediados de los años 60 en Tineo, Asturias. Es a partir de finales de los 80 cuando surgen las primeras plantaciones profesionales en las provincias de Huelva y Asturias. En el año 2012, Asturias registró 90 hectáreas cultivadas con distintas variedades de la especie *V. corymbosum* y *V. ashei* (García Rubio et al., 2013). Esta última especie también se cultiva en las 30 hectáreas que hay en Cantabria y resto de pequeñas explotaciones (<4 hectáreas) dispersas en la zona septentrional. Durante la campaña 2011-2012, se produjeron unas 200 toneladas de arándano fresco de las cuales el 80 % se exportaron a otros países.

En el sur, Huelva cuenta con 1000 hectáreas plantadas con cultivares americanos de arándano (*Vaccinium corymbosum*). Según datos del año 2011, la producción en esta zona oscila en torno a las 4000 toneladas/año (Atlantic Blue, 2011). Una elección varietal adecuada, así como el desarrollo de la tecnología de producción, pueden favorecer la producción tardía en España. El cultivo del arándano en España ha experimentado un crecimiento importante en los últimos 7 años: en 2005, Asturias contaba solo con 2 hectáreas de plantación y Huelva con 300 hectáreas. Por otra parte, actualmente el 95 % de las plantaciones en Asturias tienen menos de 4 años, por lo tanto es un cultivo en pleno desarrollo de reciente implantación.

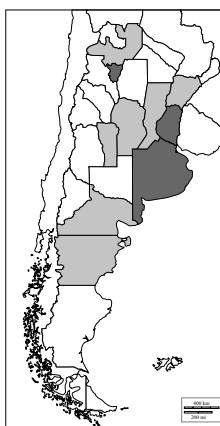


***Situación en Argentina: cultivo, producción y consumo.***

Si bien el cultivo del arándano se introdujo en Sudamérica en la década de los 80, es a partir de 1993 cuando se observa un rápido aumento de las plantaciones comerciales en Argentina y Chile. En Argentina, se puede tomar como punto inicial de la actividad productiva el año 2001, cuando la superficie cultivada con arándanos era de 400 hectáreas.

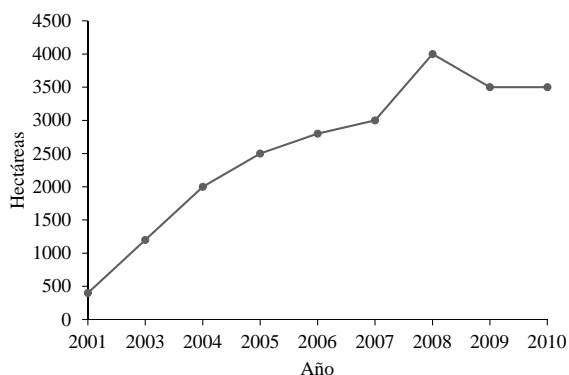
En la [figura 1.4](#) se puede observar en color gris oscuro las zonas de mayor importancia para el cultivo de arándanos. El 90 % de la superficie nacional implantada con este cultivo está representado por las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y Tucumán. En color gris claro se observan otras zonas donde el cultivo también se ha desarrollado. Las principales variedades implantadas dentro del género *Vaccinium* son las del tipo de crecimiento Southern Highbush (híbridos interespecíficos de *V. corymbosum* x *V. darrowi* y otras especies) y se caracterizan por su bajo requerimiento de horas de frío. Otro grupo de menor relevancia en Argentina corresponde a los Northern Highbush, de alto requerimiento de horas de frío, que se utiliza para plantaciones en la Patagonia (Río Negro y Chubut).

Los arándanos ocupan el cuarto lugar en lo que se refiere a la exportación de frutas argentinas. Las exportaciones del año 2012 alcanzaron más de 15000tn y más de 80 millones de dólares estadounidenses.



**Figura 1.4.** Localización geográfica del cultivo del arándano en Argentina.

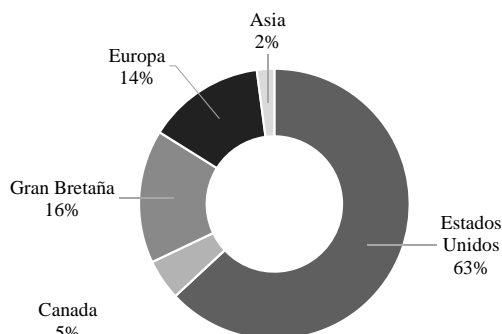
El sector ha realizado importantes inversiones para el procesado (consistente en clasificación, enfriamiento y desinfección de la fruta) y empaque. La cosecha y clasificación son manuales, con alto requerimiento de personal durante los meses de recolección, motivo por el cual este cultivo es un importante generador de empleos. En la [figura 1.5](#) se puede observar la evolución de la superficie plantada con arándanos.



**Figura 1.5.** Evolución de la superficie dedicada al cultivo del arándano en Argentina.

Como se puede observar en la [figura 1.6](#), el principal destino de las exportaciones es el mercado estadounidense. En el período inicial de cosecha (Septiembre-Octubre), el precio del arándano fresco es tan elevado que el transporte a América del Norte se realiza por vía aérea.

El consumo y mercado interno del arándano es prácticamente inexistente, esto se debe a que el arándano todavía no forma parte de los hábitos de consumo de la población argentina, aunque también se vincula a la baja capacidad del sector para ofrecer productos frescos y procesados a precios accesibles que faciliten su penetración al mercado interno (Rivadeneira & Kirschbaum, 2012). A su vez, como consecuencia del creciente aumento de las cantidades producidas, la falta de un mercado de productos industriales en base al arándano se presenta como un limitante para la colocación del remanente de fruto fresco no exportado (llamada cosecha de descarte). Actualmente, un importante porcentaje de la producción no está en condi-



**Figura 1.6.** Destinos de las exportaciones argentinas de arándano.

ciones de ser exportado y no existen oportunidades de agregado de valor al fruto fresco en el sector. En el año 2012 se registró un descarte de 900tn debido a diversos factores: aumento de productividad lo que provoca una disminución del precio de venta y por lo tanto un menor retorno al productor, selectividad de la demanda, problemas eventuales como enfermedades, granizo o la presencia de defectos. Debido a la necesidad de desarrollo científico-tecnológico en el sector de los arándanos, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) conduce, actualmente, en torno a 17 proyectos relacionados con la investigación y transferencia de tecnología:

1. Mejoramiento de material base en frutales (PNFRU 051711)
2. Material base de sanidad certificada (PNFRU 051721)
3. Manejo sustentable de factores abióticos que afectan a los cultivos frutales (PNFRU-052811)
4. Generación y desarrollo de tecnología para la detección, seguimiento, predicción y evaluación de plagas emergentes, limitantes y/o cuarentenarias de la fruticultura Argentina (PNFRU 052851).
5. Biología y tecnología para la cosecha y acondicionamiento, transporte y conservación de frutas frescas (PNFRU 053911).

6. Manejo integrado de enfermedades de poscosecha en frutas (PNFRU 053921).
7. Desarrollos innovativos para aumentar la competitividad de la industria procesadora de frutas (PNFRU-053941).
8. Conservación ex situ y valoración de las colecciones de germoplasma de la Red de Recursos Genéticos Vegetales de INTA (AERG-231221).
9. Herramientas de Socio-Economía Agraria para el desarrollo regional (ERIOS 630051).
10. Incremento en la calidad, cantidad y diversidad de la producción frutícola de Entre Ríos. (ERIOS 630081).
11. Desarrollo de los sistemas productivos y de seguridad alimentaria de los territorios involucrando tecnologías amigables con el medio ambiente y de fuerte inclusión socio organizativa en el área Tucumán Norte, provincia de Tucumán (TUSGO 31001).
12. Desarrollo y transferencia de tecnologías para la producción sustentable de berries.
13. Bases ecofisiológicas para el análisis de los efectos de la variabilidad climática y el cambio climático sobre la calidad de productos agrícolas (PICT 20-21445).
14. Estudio de la susceptibilidad de nuevas variedades de frutilla, arándano y moras híbridas a la acción de patógenos frecuentes en sistemas productivos del Noroeste Argentino (NOA). PICT 2008-311.
15. PME asociado al PICT 2008-311.
16. Investigación y transferencia de tecnología para mejorar la calidad en cosecha y poscosecha de frutas finas cultivadas en Tucumán.
17. Optimización de métodos actuales y evaluación de nuevas alternativas para el tratamiento cuarentenario contra la mosca de la fruta para el cultivo de arándanos en la provincia de Entre Ríos.

Estos proyectos demuestran la importancia, para el sector del arándano, que tienen los avances y desarrollos relacionados con el cultivo, cosecha e industrialización.

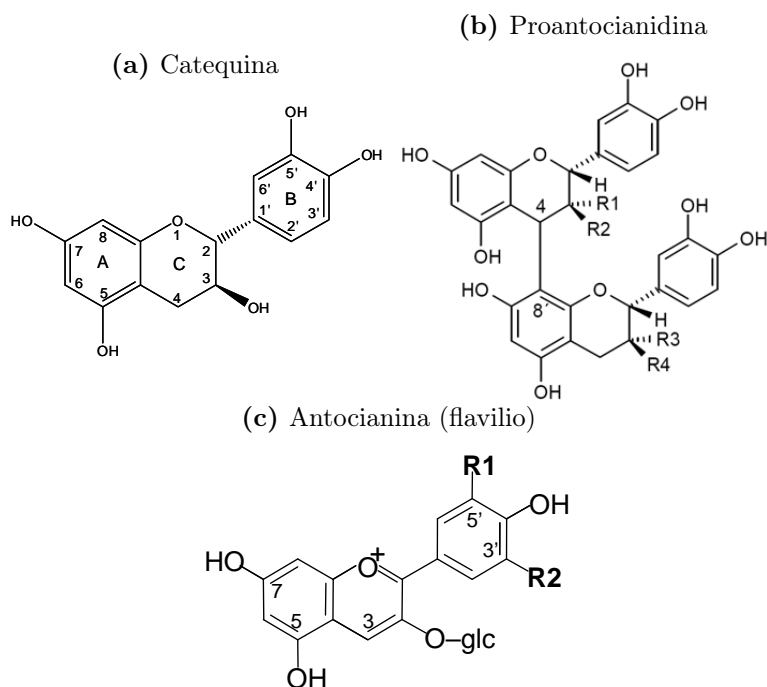
Teniendo en cuenta que el arándano es una fruta altamente perecedera, que su recolección y transporte tiene un precio elevado y que no existen alternativas claras de industrialización, se propone aprovechar principalmente sus propiedades funcionales para desarrollar nuevos alimentos por medio de tecnologías que puedan ser transferidas y utilizadas en Argentina. Este desarrollo está orientado a un mercado comercialmente atractivo como lo es el sector de los alimentos funcionales.

## 1.2 Aplicación de nuevas tecnologías en la elaboración de zumo de arándano.

Los arándanos son una importante fuente de diferentes fitonutrientes (ácido ascórbico, manganeso, compuestos polifenólicos). Entre los distintos compuestos que poseen, se le ha prestado especial atención al grupo de las antocianinas debido a que poseen una muy alta capacidad antioxidante (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley, & Pridham, 1995; Seeram & Nair, 2002) y se les atribuyen propiedades anticancerígenas, beneficiosas para el tracto urinario y reductoras de enfermedades cardiovasculares (Kalt & Dufour, 1997).

Químicamente, las antocianinas se consideran flavonoides. Los flavonoides se caracterizan por una estructura general que consiste en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres átomos de carbono (Harborne & Baxter, 1999; Harborne, 1993; Bhagwat, Haytowitz, & Holden, 2013). Entre las distintas subclases encontramos los flavanoles (compuestos monoméricos (catequinas, epicatequinas), oligoméricos, y poliméricos (proantocianidinas, también denominadas taninos condensados) y las antocianinas (cianidina, delfinidina). En la [figura 1.7](#) se pueden observar las estructuras químicas de cada tipo de compuesto.

Los flavanoles monoméricos o catequinas (flavan-3-ol), son precursores biosintéticos de las proantocianidinas. La catequina y la epicatequina son los



**Figura 1.7.** Estructuras generales de los flavanoles y las antocianinas (De Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera, 2010).

flavonoides más conocidos (Harborne & Baxter, 1999; Harborne, 1993). Las catequinas son comúnmente encontradas en la naturaleza y en alimentos derivados de plantas en su forma polimerizada, como oligómeros o polímeros (proantocianidinas). El contenido de flavanoles para frutas como la manzana y el arándano es del orden de 0.1-45 mg/100g peso fresco (De Pascual-Teresa, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2000; Arts, van de Putte, & Hollman, 2000; Tsanova-Savova, Ribarova, & Gerova, 2005; Suarez Valles, Santamaria Victorero, Mangas Alonso, & Blanco Gomis, 1994) y 1-7mg/100g peso fresco (De Pascual-Teresa et al., 2000; Arts et al., 2000; Heinonen, Meyer, & Frankel, 1998), respectivamente. La biodisponibilidad difiere notablemente entre catequinas, las proantocianidinas polimerizadas no son absorbidas y pequeñas cantidades de dímeros de proantocianidinas han sido detectados en plasma (Van Amelsvoort et al., 2001; Holt et al., 2002; Sano et al., 2003). Por último se debe aclarar que existe una con-

troversia en cuanto a la biodisponibilidad de las catequinas, debido fundamentalmente a la falta de una metodología estandarizada para procesar las muestras de plasma y para realizar determinaciones analíticas de los metabolitos presentes en los extractos utilizados (Stalmach, Troufflard, Serafini, & Crozier, 2009).

Las antocianinas son pigmentos naturales responsables de los colores azules, morados, rojos y anaranjados de muchas frutas y verduras. Su contenido en las manzanas varía de 0.0–60.0 mg por 100g peso fresco (Koponen, Happonen, Mattila, & Törrönen, 2007; Wojdyło, Oszmiański, & Laskowski, 2008) y en los arándanos se encuentra entre 25-495mg/g peso fresco (Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Skupień, 2006). En los alimentos poseen un doble interés; uno tecnológico, debido al impacto sensorial de sus colores en los productos alimenticios y otro relacionado con sus propiedades beneficiosas para la salud (De Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera, 2010). Las antocianinas están presentes en la naturaleza como heterósidos. La aglicona de las antocianinas, denominada antocianidina, está estructuralmente basada en el catión flavilio con grupos hidroxilo o metoxi presentes en diferentes posiciones. Dependiendo del número y la posición de estos grupos hidroxilo o metoxi, diferentes antocianidinas han sido descritas, seis son las más comúnmente encontradas en frutas y vegetales son: pelargonidina, cianidina, delfinidina, petunidina, peonidina y malvidina (Harborne, 1993; Bhagwat et al., 2013; De Pascual-Teresa et al., 2000).

Las antocianidinas, son inestables a la luz e insolubles en agua, por lo tanto no se las encuentra en la naturaleza en estado libre. En cambio, están presentes en las vacuolas celulares enlazadas a azúcares, los cuales proveen estabilidad y solubilidad en agua. Estos glicósidos son los que se denominan antocianinas. Los azúcares que más comúnmente se encuentran unidos a las antocianidinas son la glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y di y trisacáridos homogéneos o heterogéneos formados por combinación de estos azúcares. Además, los azúcares de las antocianinas pueden estar acilados con ácidos alifáticos o aromáticos como el cafeico, p-cumárico, sinápico, p-hidroxibenzoico, ferúlico, malónico, málico, succínico y acético. La biodisponibilidad de las antocianinas ha sido subestimada durante mucho tiempo debido a que todos los metabolitos implicados en su asimilación no han sido

todavía identificados (Manach, Williamson, Morand, Scalbert, & Rémésy, 2005). Las antocianinas pueden ser detectadas en el plasma en su forma nativa, presentes en las plantas (glicosidadas) pero también pueden sufrir una gran cantidad de reacciones químicas, en el hígado, riñón, en regiones del cerebro que median la conducta cognitiva (cotex, hipocampo) y en los ojos (Tomás-Barberán, Gil-Izquierdo, & Moreno, 2009; Andres-Lacueva et al., 2005; Passamonti, Vrhovsek, Vanzo, & Mattivi, 2005). También se las ha encontrado en el colon y más recientemente se ha propuesto que las antocianinas también pueden ser metabolizadas por la flora intestinal (Selma, Espín, & Tomás-Barberán, 2009; Ávila et al., 2009).

En general, las operaciones de procesado que permiten una oferta variada, segura y continua de alimentos afectan en gran medida al efecto funcional de muchos de sus componentes. Este efecto es muy acusado para componentes sensibles al oxígeno, la temperatura y el pH como lo son las antocianinas. No obstante, el efecto negativo que, en general, las operaciones de procesado ejercen sobre las propiedades funcionales, y particularmente sobre el poder antioxidante, puede reducirse mediante la adición de determinados ingredientes o mediante la realización de pretratamientos en los procesos de fabricación. En la mayor parte de los casos el efecto protector se basa en el establecimiento de interacciones que contribuyen a la formación de barreras protectoras que ayudan a mantener la integridad de las estructuras químicas y/o celulares y evitan la acción de factores de deterioro durante las operaciones de procesado y/o el almacenamiento.

Durante la elaboración del zumo de arándanos, uno de los principales inconvenientes tecnológicos es la gelificación del triturado debido a su alta concentración de pectinas, del orden de 0.4-0.7g pectina/100g fruta (Proctor & Peng, 1989; Marlett & Cheung, 1997) y el bajo pH de la fruta. Esta rápida gelificación impide la aplicación de subsiguientes etapas de filtración, pasteurización y/o concentración. Landbo and Meyer (2004) también observaron este tipo de problemática durante el triturado de grosellas negras. En ese caso, el triturado de estos berries resultaba en un puré de elevada viscosidad a partir del cual se hacía muy difícil la extracción del zumo por prensado.



La despectinización de zumos mediante el uso de enzimas pectinolíticas ha sido presentado como una alternativa efectiva para, evitar la gelificación del triturado, reducir la turbidez (Kashyap, Vohra, Chopra, & Tewari, 2001; Landbo, Kaack, & Meyer, 2007; Vaillant et al., 1999), aumentar el rendimiento en zumo (Höhn, 1996; Landbo & Meyer, 2004) y realizar un procesado eficiente de los zumos de berries. Sin embargo, se han observado pérdidas significativas en el contenido de antocianinas durante la elaboración del zumo (J. Lee, Durst, & Wrolstad, 2002; Rossi et al., 2003; Srivastava, Akoh, Yi, Fischer, & Krewer, 2007). Capanoglu, de Vos, Hall, Boyacioglu, and Beekwilder (2013) observaron pérdidas de antocianinas del orden del 98 % en la etapa de concentración de zumo de uvas, Kalt (2005), Skrede, Wrolstad, and Durst (2000) determinaron pérdidas del 68 % en el proceso de obtención de zumo de arándanos. Las diferencias en los niveles de pérdidas de antocianinas entre los distintos estudios dependen de una combinación de varios factores: el tipo de fruta, la variedad, factores medioambientales y/o diferencias en las técnicas de procesado del zumo (Capanoglu et al., 2013). Parte de estas pérdidas están relacionadas con la presencia de enzimas, como por ejemplo la polifenoloxidasas, que contribuye mayoritariamente a la pérdida de antocianinas durante la extracción del zumo de arándanos (Capanoglu et al., 2013). Por otro lado, también se debe considerar la localización de las antocianinas y los polifenoles en el fruto. Las procianidinas se localizan tanto en las semillas como en la piel de los berries (Mattivi, Zulian, Nicolini, & Valenti, 2002). En la piel, las procianidinas se encuentran en forma de complejo dentro de gránulos que a su vez están contenidos en vacuolas, mientras que en las semillas, las procianidinas están localizadas debajo de la cutícula y la capa epidérmica, también en forma de complejo. Por el contrario, las antocianinas suelen estar localizadas sólo en la piel de los berries, son altamente hidrosolubles bajo condiciones ácidas y se encuentran en estado libre dentro de las vacuolas (Mattivi et al., 2002). Las grandes pérdidas de estos compuestos durante el proceso de elaboración de zumo sugieren que tanto las semillas como las pieles no son lo suficientemente reducidas durante la etapa de trituración de la fruta, lo que impide la liberación de flavonoides en la fracción soluble (Capanoglu et al., 2013). Como resultado, las vacuolas que se encuentran en las semillas y las células de la epidermis no se incluyen en el zumo final (clarificado) y las procianidinas y antocianinas se pierden junto con los sólidos decantados.

Landbo and Meyer (2001) han demostrado que la degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de residuos sólidos de la elaboración de zumo de grosellas negras por prensado aumenta el rendimiento en extracción de compuestos antioxidantes fenólicos. Además, los resultados de Landbo and Meyer (2001) indican que distintos compuestos fenólicos, incluyendo algunos flavonoides, se encuentran localizados dentro o al menos fuertemente asociados a la pared celular de la epidermis de las grosellas negras.

Las enzimas pectinolíticas utilizadas en la industria de zumos de frutas y en la de producción de vinos, provienen mayoritariamente de hongos filamentosos, principalmente de *Aspergillus niger spp.* (Grassin & Fauquembergue, 1996). Distintos estudios demuestran que la despectinización enzimática a 40°C durante 1 hora, a 27°C durante 2 horas o a 43°C durante 2 horas con distintos complejos enzimáticos permiten reducir notablemente la viscosidad del zumo de arándanos (Brownmiller, Howard, & Prior, 2008; J. Lee et al., 2002; Skrede et al., 2000).

Debido a la importancia que tienen este tipo de enzimas en la industria, estudios relacionados con el aislamiento y la selección de nuevas cepas de microorganismos para su uso potencial en los procesos industriales son de vital importancia (Sandri, Lorenzoni, Fontana, & da Silveira, 2013).

Las pectinasas provenientes de levaduras por lo general son enzimas exocelulares y de naturaleza glicoprotéica (Lim, Yamasaki, Suzuki, & Ozawa, 1980; Barnby, Morpeth, & Pyle, 1990). Las enzimas pectinolíticas de levaduras son mayoritariamente endo - poligalacturonasas (endo-PG), lo que quiere decir que al azar, degradan la cadena principal de la pectina, principalmente por hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos. Como se expuso anteriormente, la principal fuente de enzimas pectinolíticas de uso industrial provienen del moho *Aspergillus niger* ya que produce una gran cantidad de estas enzimas, además de ser un microorganismo GRAS (Generally Recognised As Safe). Los preparados comerciales de origen fúngico (filamentoso) son de hecho caldos líticos que contienen una mezcla compleja de diferentes tipos de actividades pectinolíticas incluyendo endo y exo-poligalacturonasas, pectinliasas (PL) y pectinesterasas (PE). Además, otras enzimas con actividades no pectinolíticas también suelen estar presentes (amilasas, arabinofurano-

sidasas) (Blanco, Sieiro, & Villa, 1999). La actividad pectinesterasa (PE) facilita la actividad endopoligalacturonasa al liberar grupos metilos de la cadena péctica. Sin embargo, de acuerdo con algunos estudios, el uso de complejos enzimáticos con actividad PE en la clarificación de zumos promueve no sólo la hidrólisis, sino también la desesterificación y volatilización de esterres relacionados con el sabor y aroma, lo que consecuentemente produce alteraciones en el flavour del zumo de frutas (Alaña, Alkorta, Domínguez, Llama, & Serra, 1990) . Además, la PE promueve la reducción de la estabilidad del zumo por la precipitación de derivados de pectina desesterificada con iones de calcio que se encuentran en el zumo y la liberación de metanol (Alaña et al., 1989).

En este sentido, las enzimas poligalacturonasas provenientes de levaduras tienen algunas ventajas sobre las provenientes de hongos filamentosos y pueden resultar una buena alternativa a los complejos enzimáticos comerciales (Blanco et al., 1999). Una de las ventajas es que las cepas de levadura, por lo general, sólo son capaces de producir un tipo de enzima pectolítica y no presentan actividad pectinesterasa. Además, son microorganismos GRAS y las enzimas pectinolíticas pueden ser producidas sin costo como subproductos durante la producción de proteína unicelular. Sin embargo, todavía no existen muchas aplicaciones prácticas de enzimas pectolíticas provenientes de levaduras (Blanco et al., 1999). Esto se debe a que la hidrólisis total de algunos sustratos suele requerir la acción sistemática de distintos enzimas. A pesar de esto, los sistemas pectolíticos provenientes de levaduras podrían ser muy apropiados para propósitos industriales como mezclas enzimáticas estandarizadas, ofreciendo la ventaja adicional que estas mezclas podrían ser preparadas con diferentes proporciones de cada tipo de enzima (endo-PG, exo-PG y PL)(Blanco et al., 1999).

### *Utilización de levaduras con elevada actividad pectinolítica.*

En una tesis doctoral realizada en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la UPV se han obtenido levaduras con elevada actividad pectinolítica por medio de modificaciones genéticas introducidas por la técnica de evolución genómica por diseño molecular. El concepto de evolución genómica por diseño molecular

desarrollado en la tesis doctoral de Sani (2013), se basa en imitar a la propia naturaleza en su constante evolución, pero acelerando y dirigiendo el proceso evolutivo con el objeto de seleccionar en un corto periodo de tiempo aquellos cambios genéticos que específicamente hayan sido diseñado a escala molecular.

Las levaduras no son una entidad invariable en el tiempo, al contrario, como todos los organismos vivos evolucionan a lo largo de las sucesivas generaciones. Mediante esta nueva metodología, se consigue acelerar el proceso evolutivo, pues las modificaciones genéticas introducidas podrían haber tenido lugar espontáneamente en el entorno natural de la levadura como consecuencia de procesos de recombinación, duplicación o eliminación de elementos genéticos a lo largo de su ciclo reproductivo.

Sani (2013) explica que mediante la metodología desarrollada, se puede obtener y rescatar la reordenación genómica deseada de manera relativamente rápida y de forma muy específica. Además, el resultado sobre el genoma de la cepa evolucionada resulta lo que inglés se denomina “seamless”, o lo que es lo mismo, sin costuras, lo que significa que al no dejar ningún nucleótido o secuencia de nucleótidos que no estuviera ya presente en el genoma de la propia cepa de levadura, no deja ninguna huella detectable (a no ser que se conozca exactamente qué reorganización cromosómica se diseñó) y hace que la nueva cepa de levadura sea prácticamente indistinguible de la parental excepto por el nuevo fenotipo que presente o por la característica que se haya modificado. Esta nueva metodología se diferencia de las tradicionales denominadas como “self-cloning” en cuanto que aprovecha la capacidad de recombinación homóloga de las levaduras del género *Saccharomyces* y, además, no sólo incorpora material genético procedente de la misma especie, sino que dicho material genético proviene de la propia cepa de levadura a evolucionar. Además, se evita el empleo de vectores de clonación y de genes de resistencia heterólogos, homeólogos o conteniendo mutaciones, obteniendo un doble efecto positivo: 1- la ausencia de cambios en la secuencia introducida por efecto de las manipulaciones propias de las técnicas de clonaje, tales como la introducción de lugares de corte para enzimas de restricción; 2- se evita el paso del material genético por otros sistemas celulares, como por ejemplo *Escherichia coli*, y la necesidad de obtener mutantes de las cepas industriales o de los genes a utilizar como marcadores de selección.

Teniendo en cuenta las ventajas que la utilización de extractos enzimáticos provenientes de levaduras tendrían sobre los extractos provenientes de hongos filamentosos, se plantea evaluar la actividad endopoligalacturonasa de extractos de levaduras modificadas genéticamente para luego ser aplicados en el tratamiento de despectinización del triturado de arándanos. El hecho de que el tratamiento enzimático de despectinización se podría realizar a temperatura ambiente y que el extracto no contiene actividad enzimáticas colaterales o residuales, supondría una mejora del proceso y un producto final con un mayor contenido en compuestos bioactivos.

### ***Aplicación de altas presiones de homogeneización.***

Una operación que resulta interesante incorporar al diagrama de flujo del proceso de elaboración de zumo de arándanos es un tratamiento de homogeneización a altas presiones a 100-150MPa. Esta operación, que actualmente está cobrando importancia en las operaciones de procesado de productos líquidos, permitiría no sólo estabilizar el zumo de arándanos desde el punto de vista fisicoquímico sino también desde el punto de vista microbiológico. Fisicoquímicamente, un tratamiento de homogeneización permite disminuir el tamaño de las partículas suspendidas y por lo tanto estabilizar la nube del zumo, de esta manera no sólo se logra mejorar el aspecto visual sino también el sabor y el contenido en compuestos bioactivos suspendidos en la nube y/o solubilizados en la fase líquida. Desde el punto de vista microbiológico, la homogeneización permite realizar, en determinadas condiciones, un tratamiento de pasteurización no térmico, asegurando la reducción del contenido microbiológico y aumentando la vida útil del zumo.

Si bien existe un desarrollo científico entorno a la utilización de altas presiones desde finales del siglo XIX, la tecnología necesaria para el tratamiento a altas presiones en la industria de alimentos es de reciente implementación. Rivalain, Roquain, and Demazeau (2010) exponen que los tratamientos de altas presiones para inactivar microorganismos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron estudiados por primera vez por Roger (1895). Hite, Giddings, and Weakley (1914) aplicaron tratamientos de alta presión hidrostática para la inactivación de algunos microorganismos para conservar frutas y vegetales. Entre los años 1932 y 1956, James and Jac-

ques Basset, en colaboración con otros (Basset & M. Macheboeuf, 1932; M. A. Macheboeuf & Basset, 1934; Basset, Lepine, & Chaumont, 1956) estudiaron el efecto de tratamientos de alta presión para inactivar diferentes microorganismos en el procesado de alimentos y con aplicaciones biológicas. Desde los últimos cincuenta años, un aumento en el interés por parte de los investigadores en estudios biológicos a altas presiones ha permitido la introducción de un gran número de aplicaciones relacionadas con la industria de alimentos. En las décadas de los sesenta y setenta, la investigación estaba centrada en los efectos de la presión de homogeneización sobre los microorganismos encontrados en leche cruda (Timson & Short, 1965), en la esterilización de alimentos de baja acidez utilizando presión y pasteurización térmica (Wilson, 1974) y en la utilización de la presión en productos con un almacenamiento extendido en refrigeración (Charm, Longmaid III, & Carver, 1977). Durante los ochenta, la investigación relacionada con los tratamientos de altas presiones en alimentos se desarrolló hacia el efecto sobre las enzimas (Morild, 1981), proteínas y otras biomoléculas (Heremans, 1982), en los efectos biológicos de las altas presiones hidrostáticas sobre los microorganismos (Hoover, Metrick, Papineau, Farkas, & Knorr, 1989) y en la aplicación de altas presiones de homogeneización para la conservación de alimentos (Popper & Knorr, 1990).

Grandes esfuerzos se realizaron en Japón para establecer nuevas líneas de procesado (Hayashi, 1989, 1990; Horie, Kimura, Ida, Yosida, & Ohki, 1991; Ogawa, Fukuhisa, Kubo, & Fukumoto, 1990; Tanaka & Hatanaka, 1992) y el primer producto estabilizado por altas presiones se colocó en el mercado japonés en el año 1993. Durante los últimos 15 años, la tecnología de procesado a altas presiones se ha expandido constantemente. Actualmente existen una variedad importante de productos, comercializados en distintos países, estabilizados por altas presiones: zumos de frutas, mermeladas, tofu, jamones, mariscos y biopolímeros (proteínas y almidones) (Rivalain et al., 2010).

Es posible clasificar las aplicaciones de los tratamientos de altas presiones en la industria de los alimentos en tres grandes áreas:

1. Inactivación de microorganismos

## 2. Inactivación enzimática

## 3. Aplicaciones sobre componentes bioactivos y funcionales

Los tratamientos con presiones hidrodinámicas se caracterizan por el desarrollo de altas presiones durante un período de tiempo muy corto, se aplica a líquidos y generalmente, como efecto secundario, están asociados a un incremento de la temperatura. Dependiendo del nivel de presiones aplicado, la tecnología se denomina: homogeneización (20-60MPa) o homogeneización a altas presiones (HPH) (150-400MPa). Básicamente, el equipamiento de HPH consiste en una bomba de desplazamiento positivo y una válvula de homogeneización. El líquido es presurizado en una unidad denominada “intensificador de presión” y luego es forzado a pasar a través del espacio libre entre el asiento y el cabezal de la válvula. Durante la homogeneización, la caída de presión que se produce a la entrada de la válvula y en el interior de la válvula origina intensas fuerzas mecánicas y de estrés de elongación en el flujo laminar. A la salida se produce una intensa turbulencia, cavitación e impactos con el cuerpo de la válvula. Durante el flujo del líquido por el homogeneizador ocurre un fenómeno de calentamiento en un corto período de tiempo. En primer lugar, la temperatura del fluido se incrementa 2-3°C cada 100MPa de presión aplicada en el intensificador de presión. Luego, cuando el fluido presurizado es forzado a través de la válvula de homogeneización, su velocidad aumenta debido a la disminución del diámetro del conducto y se produce una caída de presión. La temperatura del fluido medida justo a la salida de la válvula se incrementa linealmente con el aumento de la presión de homogeneización por un factor de 14-18°C cada 100MPa, debido al esfuerzo de cizalla y a la conversión parcial de energía mecánica en energía térmica. En total, se ha observado un incremento de temperatura entre 17-21°C cada 100MPa en el procesado de leche entera o emulsiones agua/aceite siendo la temperatura inicial entre 4-24°C (Cortés-Muñoz, Chevalier-Lucia, & Dumay, 2009; Picart et al., 2006; Thiebaud, Dumay, Picart, Guiraud, & Cheftel, 2003).

HPH es una operación que se aplica a líquidos en régimen continuo. Los principales parámetros que determinan la eficiencia de la operación son el número de pases a través de la válvula, la temperatura y el diseño de la válvula de homogeneización (Moore, Hoare, & Dunnill, 1990; Stang, Schuchmann,

& Schubert, 2001), mientras que la escala de la operación no parece influir en el grado de homogeneización alcanzado (Siddiqi, Titchener-Hooker, & Shamlou, 1997).

Los microorganismos pueden ser considerados como partículas que pueden ser fragmentadas por efectos de cizalla en combinación con aumentos inmediatos de la temperatura (Dumay et al., 2013). En efecto, fenómenos de altas presiones, gradientes de velocidad, esfuerzos de cizalla, turbulencia, choques y cavitación que ocurren en la válvula de homogeneización pueden inducir una ruptura mecánica o, por lo menos, una alteración de las membranas celulares (Middelberg, 1995; Gogate & Pandit, 2008; Kleinig & Middelberg, 1998). La eficiencia del tratamiento de homogeneización a altas presiones para inactivar microorganismos se incrementa al incrementarse el nivel de presión aplicado, al aumentar la recirculación a través del homogeneizador y al aumentar la temperatura de entrada del fluido (Thiebaud et al., 2003; Picart et al., 2006; Donsi, Ferrari, Lenza, & Maresca, 2009; Maresca, Donsi, & Ferrari, 2011). La matriz alimenticia (fracción acuosa y lipídica, pH y viscosidad) y el tipo de microorganismo (bacterias Gram-positivas poseen una mayor resistencia) también influyen en el grado de inactivación logrado por la HPH. La inactivación enzimática puede ocurrir debido a la desnaturalización y agregación de las proteínas (Dumay et al., 2013). La combinación de fuerzas mecánicas, las variaciones de presión, los gradientes de alta velocidad, los esfuerzos cortantes y los calentamientos instantáneos inducen cambios estructurales en las proteínas a presiones por encima de 200MPa (Dumay et al., 2013). Desde el punto de vista de los compuestos funcionales, las estructuras específicas producidas por la HPH (emulsiones submicrónicas, ensamblados modificados de fosfocaseínas), son potencialmente apropiadas para entrapar y proteger componentes bioactivos que son poco hidrosolubles de condiciones medioambientales desfavorables desde el procesado hasta el consumo y la digestión (Dumay et al., 2013).

Los cambios producidos por los tratamientos de altas presiones en los compuestos bioactivos presentes en los alimentos afectan la calidad funcional, biodisponibilidad o la estabilidad de estos compuestos. En este sentido, el estudio de la influencia de las variables de proceso en la estabilidad de los compuestos bioactivos, así como también la influencia en la capacidad antioxidante y en los parámetros fisicoquímicos de los zumos, es un factor



fundamental para definir las condiciones de tratamiento y evitar pérdidas de importantes propiedades funcionales y así obtener bebidas con mayores beneficios para la salud de los consumidores (Barba, Esteve, & Frigola, 2013). Grandes esfuerzos se están realizando para determinar los efectos de los tratamientos con presiones en los compuestos bioactivos de zumos de frutas y vegetales. El número de artículos de investigación relacionados con estos aspectos se está incrementando continuamente. Principalmente, estos artículos están enfocados en tres aspectos principales:

- El efecto del procesado a altas presiones sobre los compuestos bioactivos de zumos comparados con zumos frescos, zumos tratados térmicamente y zumos tratados por otras técnicas (por ejemplo, campos eléctricos pulsantes (PEF)).
- El efecto del procesado a altas presiones sobre los compuestos bioactivos de zumos y su estabilidad durante el almacenamiento.
- El efecto del procesado a altas presiones sobre los compuestos bioactivos de zumos y su biodisponibilidad *in vitro* e *in vivo*.

El efecto de la presión en compuestos bioactivos ha sido estudiada en distintos zumos, principalmente en zumos de arándano, tomate, zanahoria y cítricos. Los principales compuestos bioactivos estudiados en los artículos de investigación son las antocianinas, vitamina C,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno y flavonoides. En la mayoría de los casos es evaluada la capacidad antioxidante, así como también la viscosidad, pulpa suspendida, turbidez, tamaño de partícula, color, entre otras propiedades. La capacidad antioxidante determinada después del tratamiento de altas presiones, en la mayoría de los casos, no difiere de manera estadísticamente significativa cuando se la compara con la capacidad antioxidante de zumos frescos. En cambio, las diferencias sí son significativas cuando se comparan zumos tratados a altas presiones y zumos tratados térmicamente, estos últimos siempre tienen una capacidad antioxidante menor que los primeros. La misma tendencia se observa cuando se analizan los compuestos bioactivos: los zumos tratados a altas presiones tienen valores más altos de componentes bioactivos que los tratados térmicamente y, en algunos casos, se observan inclusive valores más altos que en los zumos frescos. La evaluación de la influencia de las variables

de proceso en la estabilidad de los compuestos bioactivos, así como de la capacidad antioxidante, es fundamental para obtener bebidas con propiedades funcionales. Por otro lado, para lograr la aceptación del producto por parte de los consumidores es necesario valorar parámetros fisicoquímicos. De acuerdo con los resultados obtenidos por distintos autores, es posible afirmar que los tratamientos de altas presiones afectan positivamente el color de los zumos, adquiriendo una apariencia más luminosa que los zumos frescos. De la misma manera, la reducción del tamaño de las partículas suspendidas con el aumento de la presión de homogenización, mejora la estabilidad de la nube del zumo, una característica de calidad muy importante en zumos cítricos.

### **1.3 Los alimentos funcionales naturales. Desarrollo tecnológico por impregnación a vacío.**

El mercado de ingredientes y alimentos funcionales ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años debido a una mayor sensibilización de los consumidores y a la promoción de un estilo de vida y de alimentación más saludable (Day, Seymour, Pitts, Konczak, & Lundin, 2009). En la actualidad, los desafíos científico-tecnológicos están orientados a asegurar que los ingredientes funcionales no se degraden y permanezcan activos y biodisponibles después del procesado, almacenamiento y durante el consumo. Además, los alimentos pueden ser utilizados como vehículos para liberar compuestos bioactivos y micronutrientes en los niveles adecuados y proporcionar beneficios para la salud e incrementar el bienestar.

El incremento de la demanda de alimentos saludables y nutritivos por parte de los consumidores no sólo está relacionado con un contenido calórico balanceado, sino también con propiedades saludables adicionales como por ejemplo, las que aportan los alimentos funcionales (Bech-Larsen & Scholander, 2007; Hasler, 2002). Esta tendencia está promovida y apoyada por gobiernos y consumidores de todo el mundo (Arai, 2002; Lajolo, 2002; Milner, 2002; Roberfroid, 2002) y está generalmente aceptado que los alimentos saludables de alta calidad deben ser desarrollados a través de programas de investigación innovativos y multidisciplinarios.

Una definición, comúnmente aceptada por distintas organizaciones, de alimento funcional es: “alimento o ingrediente alimenticio que proporciona un beneficio fisiológico adicional más allá de su nutrición básica” (International Food Information Council, 2006; International Life Sciences Institute, 1999).

Desde el punto de vista industrial, el formato más popular de productos funcionales son las bebidas pertenecientes al grupo de los lácteos o de los zumos de frutas, y alimentos formulados y reestructurados. Estos alimentos no cuentan con una estructura propia y, en general, son relativamente fáciles de formular y elaborar en comparación con alimentos sólidos blandos, que pueden tener una formulación más complicada, con varios ingredientes y donde la estabilidad de la estructura, la textura y el sabor son de mayor importancia para la aceptación del consumidor y la biodisponibilidad de los micronutrientes (Parada & Aguilera, 2007). En el desarrollo de alimentos funcionales, la vía de la fortificación por medio de la adición de componentes bioactivos ha resultado en un gran número de desafíos tecnológicos asociados con la elección de las operaciones unitarias que no sólo permitan preservar la actividad biológica sino también los atributos sensoriales y de calidad (Day et al., 2009).

La forma más simple de alimento funcional está representado por las frutas y verduras ya que estos dos grupos de alimentos son ricos en compuestos antioxidantes, como polifenoles y carotenoides, que protegen a las células del organismo de daños oxidativos y reducen los riesgos de desarrollar ciertos tipos de cáncer (Day et al., 2009).

Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo regular de frutas y vegetales puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas (Dragsted, Strube, & Larsen, 1993; Doll, 1990; Block, Patterson, & Subar, 1992; Joshipura et al., 2001; Rimm et al., 1996). Estos beneficios están principalmente relacionados con el contenido en compuestos antioxidantes y fibra dietética (Bravo, Abia, & Saura-Calixto, 1994; K. W. Lee, Kim, Kim, Lee, & Lee, 2003; Middleton, Kandaswami, & Theoharides, 2000; Pelucchi et al., 2004; Seeram et al., 2005; Williamson, Day, Plumb, & Couteau, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda consumir 400g o 5 raciones de frutas y hortalizas al día (OMS & FAO, 2003). Sin embargo, una gran

parte de la población no cumple con estas recomendaciones, debido fundamentalmente al cambio en el estilo de vida y los hábitos alimenticios. La estructura tradicional de tres comidas al día, en horarios y lugares determinados se ha ido remplazando por un patrón más individualizado de consumo de alimentos (Bisogni et al., 2007; Jastran, Bisogni, Sobal, Blake, & Devine, 2009). Esta irregularidad en el consumo de alimentos a veces resulta en largos intervalos de tiempo entre las comidas principales. En estos intervalos, el cuerpo humano requiere un suministro constante de energía (Bilman, van Trijp, & Renes, 2010), que se cubre, fundamentalmente, mediante la ingesta de aperitivos. Estudios recientes indican que los aperitivos contribuyen aproximadamente en un 40 % a la ingesta diaria de energía (Bell, Kremer, Magarey, & Swinburn, 2005; Rangan, Randall, Hector, Gill, & Webb, 2008, 2009). El término “snacking” se utiliza para referirse al consumo de alimentos y bebidas entre las tres comidas principales del día (De Graaf, 2006; Savige, MacFarlane, Ball, Worsley, & Crawford, 2007).

La mayor parte de los aperitivos que se consumen son productos extrusados u horneados que se fabrican a partir de cereales o tubérculos, con elevado contenido en almidón, a los que se añade una elevada cantidad de azúcar o sal. Como resultado se obtienen productos de bajo valor nutritivo y alto contenido calórico, que pueden contribuir a aumentar los desequilibrios nutricionales. Además, la tecnología de extrusión implica un proceso de cocción a tiempos cortos, altas temperaturas y altos esfuerzos cortantes para formar una nueva estructura a partir de ingredientes en polvo, secos o semi-secos. Como consecuencia de las elevadas condiciones de presión y temperatura pueden ocurrir un gran número de reacciones, entre ellas reacciones de Maillard, de desnaturalización de proteínas y de degradación de componentes activos como vitaminas o componentes con actividad antioxidante (J. Smith & Hardacre, 2011). La creación de nuevas estructuras que protejan los componentes activos y la aplicación de nuevas técnicas de procesado que aseguren una mayor calidad nutricional de los productos finales constituye un reto en la actualidad. Diferentes estudios establecen el consumo de aperitivos con bajo contenido en nutrientes y alto contenido en energía, como una de las principales causas del sobrepeso, la obesidad y las alteraciones metabólicas a nivel mundial (Mirmiran, Bahadoran, Delshad, & Azizi, 2014).

En este contexto, gobiernos de diferentes países están poniendo en marcha programas de alimentación saludable, dirigidos en muchos casos a la población infantil o en edad escolar (Beets et al., 2013; Muthayya et al., 2007). En 2004, en el marco del 4º Simposio Internacional de Frutas y Vegetales se creó la alianza IFAVA (International Fruit and Vegetable Alliance) con el objetivo de facilitar la difusión de buenas prácticas, investigación y recursos para dar soporte a los programas nacionales y regionales de consumo de frutas. A nivel científico se están haciendo multitud de esfuerzos por elaborar aperitivos saludables o funcionales. En este sentido se pretende incorporar frutas, hortalizas y/o legumbres como ingredientes, reducir el contenido de sal y/o azúcar, y reducir el efecto desfavorable de las tecnologías utilizadas sobre los componentes funcionales. Maurer, Fukuda, and Nielsen (2005) desarrollaron un snack que incluía puré de habas en la cantidad necesaria para que fuese nutricionalmente equilibrado. Ryland, Vaisey-Genser, Arntfield, and Malcolmson (2010) comprobaron que la sustitución de copos de avena por copos de lentejas permitía obtener barritas para su consumo como snack, con un mayor contenido en fibra, proteínas, hierro y folato, aceptadas por el consumidor. Qiao, Huang, and Xia (2012) establecieron la proporción más adecuada de boniato morado y lichi para obtener un snack saludable con elevado contenido de componentes fenólicos. Potter, Stojceska, and Plunkett (2013), determinaron la factibilidad tecnológica de la incorporación de un 11 % de polvo de manzana, plátano, fresa o mandarina en la formulación de un snack saludable obtenido por extrusión y dirigido a la población infantil. El producto obtenido con bajo contenido en grasa y azúcar y un adecuado contenido en fibra obtuvo una buena aceptación.

Algunas frutas como, por ejemplo, los arándanos y las manzanas, son ricas en componentes activos. Además de los compuestos bioactivos, cabe destacar, el rol positivo de la fibra dietaria en la salud, particularmente en la salud digestiva, el balance energético, cáncer, diabetes, lo que justifica la creciente demanda de fibra dietaria en la alimentación diaria (Alexiou & Franck, 2008; Elia & Cummings, 2007; Lunn & Buttriss, 2007; Prosky, 1999; M. B. Schulze et al., 2004; Scott, Duncan, & Flint, 2008; Slavin & Green, 2007).

Los arándanos tienen un alto contenido en fitoquímicos, son ricos en antioxidantes (flavonoides, antocianinas), vitamina C, B, E y A. Tienen un

alto contenido en selenio, zinc, hierro, manganeso,  $\beta$ -caroteno, luteína y zeaxantina (Nile & Park, 2014). A los arándanos se les atribuyen propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antidiabéticas. Además previenen la pérdida de peso y la degeneración macular, ayudan a prevenir el Alzheimer, revierten los signos del envejecimiento, protegen y aumentan la circulación y reducen el colesterol (Faria et al., 2005; Yi, Fischer, Krewer, & Akoh, 2005). Además, las antocianinas han sido asociadas con un incremento en la señalización neuronal en los centros cerebrales y con mejoras en la memoria, beneficios que pueden mitigar la neurodegeneración (Krikorian et al., 2010). En estudios realizados por Kalt and Dufour (1997), Jepson and Craig (2007), Howell et al. (2005) se ha demostrado la efectividad de los arándanos en el tratamiento de desórdenes del tracto urinario.

Además, en la investigación de Whyte and Williams (2011) se propone que en niños de 8-9 años, el consumo de una bebida rica en flavonoides de arándanos podría tener efectos beneficiosos sobre la memoria y respuesta cognitiva de estos niños.

Wilms, Hollman, Boots, and Kleinjans (2005) ha observado que una mezcla rica en flavonoides de zumo de manzana y arándanos puede proteger los linfocitos contra la inducción ex vivo de daños en el DNA. Según los autores, esta mezcla es rica en quercetina. La combinación de sus estudios in vitro y ex vivo proporcionan evidencias de que la quercetina es capaz de proteger a los linfocitos humanos frente a daños químicamente inducidos en el DNA, lo que puede ser la base de sus sugeridas propiedades anticancerígenas.

A L Molan, Lila, and Ravindran (2010) estudiaron el efecto prebiótico de distintos genotipos de arándanos y observaron que los arándanos promueven el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos (deseables) y disminuye el crecimiento de bacteroides y clostridios en ratas.

Por otro lado, las manzanas siempre forman parte de una dieta saludable debido a su alto contenido en fibra dietaria (Sun-Waterhouse, Farr, Wibisono, & Saleh, 2008; Sun-Waterhouse, Melton, O'Connor, Kilmartin, & Smith, 2008; Sun-Waterhouse, B. G. Smith, O'Connor, & Melton, 2008) y la presencia de polifenoles beneficiosos para la salud como las proantocianidinas, catequinas, epicatequinas, ácido clorogénico y quercetina (Amiot,

Fleuriet, Cheynier, & Nicolas, 1997; Gardner, White, McPhail, & Duthie, 2000; K. W. Lee et al., 2003; McGhie, Hunt, & Barnett, 2005). Polifenoles provenientes de manzanas han exhibido propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas y la propiedad de prevenir distintas enfermedades crónicas (Boyer & Liu, 2004; McCann et al., 2007).

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que utilizados como ingredientes alimentarios pueden tener un efecto beneficioso sobre la salud (Salminen, Ouwehand, Benno, & Lee, 1999). Multitud de estudios sugieren que el consumo de probióticos en cantidades comprendidas entre 9 y 11 Log UFC/día disminuye la incidencia, duración e intensidad de las infecciones gastrointestinales (Sanders, 1999). Estudios in vitro han demostrado que diferentes cepas de microorganismos con efecto probiótico (*L. salivarius*, *L. johnsonii*) pueden inhibir el crecimiento de *H. pylori* (Aiba, Suzuki, Kabir, Takagi, & Koga, 1998; Michetti et al., 1999). *Helicobacter pylori* es un agente etiológico de la gastritis crónica y de la úlcera gastroduodenal, y constituye un factor de riesgo para la aparición de linfoma gástrico o adenocarcinoma, lo cual aumenta, a medida que persiste la infección. En España la prevalencia media en niños en población escolar está en torno al 22%, con tasas similares al resto de los países europeos (Leandro Liberato et al., 2005). En Argentina, la prevalencia de *H. pylori* en niños es del 25.1% (Santos et al., 2009) y la prevalencia global en niños y adultos es del 35.7% (Olmos, Ríos, Higa, & Group, 2000). En niños, se ha comprobado que la infección por *H. pylori* induce en la membrana de la mucosa gástrica una respuesta inflamatoria intensa que incluye un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, entre las más relevantes cabe destacar la interleukina 1 $\beta$  y en el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), los cuales aumentan el riesgo de cáncer gástrico (Leung et al., 2006). Por ello, se han efectuado recomendaciones para su erradicación en poblaciones con riesgo elevado de padecer cáncer gástrico (Hunt & Thomson, 1998). En los niños se debe considerar su erradicación en pacientes afectados de gastritis o úlcera, pero sin embargo no se recomienda el tratamiento erradicador en niños asintomáticos colonizados, entre otras razones por la facilidad en la aparición de resistencias de este germen, y la elevada tasa de recaídas después del tratamiento (Gold et al., 2000).

Además, extractos provenientes de arándano rojo, azul y uvas han inhibido la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica, sin embargo, existen muy pocos trabajos de investigación publicados de la actividad de estas frutas (enteras) contra *H. pylori* (Cavanagh, Hipwell, & Wilkinson, 2003; Burger et al., 2000; Daroch et al., 2001).

La técnica de Impregnación a Vacío (IV) es una operación de transferencia de materia entre un medio líquido y un sustrato sólido con estructura porosa, como puede ser una fruta u hortaliza fresca. La creación de gradientes de presión en el sistema constituido por el sólido sumergido en el seno del líquido provoca la salida de gas y una importante entrada de líquido en el interior de la estructura porosa (Fito, 1994). De esta forma es posible eliminar el oxígeno ocluido en los poros, e incorporar solutos de forma controlada en la estructura matricial del alimento poroso modificando convenientemente su composición original sin prácticamente afectar a su estructura. Como no requiere de la utilización de altas temperaturas se minimiza el daño a los tejidos y se preserva el color, el sabor y los aromas y componentes activos naturales (E. Betoret, Sentandreu, et al., 2012). La posibilidad de incluir en la estructura matricial de un alimento poroso componentes de interés ha establecido la impregnación a vacío como una técnica eficaz para el diseño de nuevos productos nutricionalmente equilibrados, saludables y/o funcionales (Fito et al., 2001). El hecho de que los componentes incorporados se queden incluidos en la matriz estructural del alimento natural supone una importante protección de los mismos frente a las reacciones de deterioro (E. Betoret, Betoret, Vidal, & Fito, 2011) y ayudan a modular la liberación de los mismos pudiendo influir sobre su asimilación (Ribeiro et al., 2006).

Ahora bien, los productos obtenidos tras la aplicación de la operación de impregnación a vacío son productos de humedad muy alta y altamente perecederos que deben ser sometidos a otras operaciones con la finalidad de aumentar su estabilidad. En este sentido, la combinación de la técnica de impregnación a vacío con una operación de deshidratación, tal como el secado por aire caliente o la liofilización, resulta favorable para la obtención de aperitivos de frutas saludables y con una funcionalidad específica. Este tipo de aperitivos se caracterizan por un bajo contenido calórico, alto contenido en fibra y enriquecidos en componentes como minerales, vitaminas, ácidos grasos omega-3, probióticos y/o componentes con actividad antioxidante,



que si bien podrían contribuir a equilibrar la dieta de cualquier grupo de población y en especial de la población infantil, adecuadamente formulados podrían también destinarse a grupos de población con requerimientos específicos. Por otra parte, existen estudios que demuestran que la eficacia de algunos componentes activos como los minerales, vitaminas o compuestos antioxidantes es mayor cuando forman parte de un alimento natural que cuando se incluyen en pastillas o cápsulas (Carbonneau et al., 1997; Thomas, McLean, Parker, & Ohlweiler, 1992; Elattar & Virji, 1999). Esto puede ser debido a las diferentes actividades de los distintos compuestos activos en los alimentos y sus posibles relaciones sinérgicas que pueden contribuir a una mayor efectividad (Roberts & Gordon, 2003; Shetty & Wahlqvist, 2004). En este sentido, se ha estudiado la posibilidad de llevar a cabo la impregnación a vacío utilizando zumos naturales de frutas de elevado valor nutricional sobre frutas que aporten elementos complementarios.



## Parte II

# Objetivos y Plan de trabajo



## Capítulo 2

# Objetivos y Plan de trabajo

### 2.1 Justificación e interés de la tesis doctoral.

La economía argentina, basada en un modelo agroganadero, demanda alternativas de industrialización, especialmente en el sector relativamente reciente, de los arándanos. Si bien, la actividad en el sector de la producción de arándanos aumenta exponencialmente año tras año no se ha encontrado hasta el momento una respuesta de industrialización viable para los excedentes de producción, debido fundamentalmente a la falta de investigación científica y tecnológica. De forma paralela, la industria de alimentos funcionales ha experimentado una auténtica revolución científico-técnica. Ha aparecido en el mercado una gran cantidad de nuevos productos (Sloan, 2012), se han desarrollado nuevos procesos de producción (Fito et al., 2001; Gras, Vidal-Brotóns, Betoret, Chiralt, & Fito, 2002; Noelia Betoret et al., 2003; Steinhart, 2006), se han realizado estudios sobre la actitud y preferencias de los consumidores (Verbeke, 2006), se ha desarrollado el marco legal (Coppens, Da Silva, & Pettman, 2006) y se han realizado numerosos estudios sobre la relación entre el consumo de determinados componentes y la incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer (So, Guthrie, Chambers, Moussa, & Carroll, 1996; Yang et al., 1997; Tanaka et al., 1997; Miyagi, Om, Chee, & Bennink, 2000). Además, en los últimos años se ha

incrementado el interés por los alimentos funcionales naturales a los que se les ha aumentado el contenido de compuestos que ya estaban presentes en la composición natural del mismo (Spence, 2006). A este respecto han adquirido una gran importancia los compuestos fenólicos presentes en las frutas y hortalizas. De forma específica, los zumos de arándanos contienen una gran variedad de componentes que exhiben actividad antirradical, tales como el ácido ascórbico (Johnston & Bowling, 2002), los flavonoides (Sendra, Navarro, & Izquierdo, 1988), los carotenoides (Goodner, Rouseff, & Hofsommer, 2001), las antocianinas (sólo en zumos de variedades pigmentadas) (Rapisarda, Fanella, & Maccarone, 2000), y los derivados del ácido cinámico (Robards & Antolovich, 1995) entre otros. El equipo investigador del Laboratorio de Alimentos Funcionales del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València ha desarrollado un procedimiento que permite incluir cualquier componente con actividad fisiológica (minerales, vitaminas, microorganismos probióticos, compuestos con actividad antioxidante) en el interior de una fruta u hortaliza. El procedimiento es objeto de la patente P99 02730-5 titulada “Procedimiento de impregnación de alimentos naturales con productos nutracéuticos y dispositivo para su puesta en práctica”. Este procedimiento se fundamenta en la posibilidad de utilizar la operación de impregnación a vacío como método para modificar la composición de las frutas y hortalizas de una forma controlada (Fito et al., 2001) sin la necesidad de aplicar altas temperaturas, y permitiendo por tanto conservar las propiedades nutritivas y sensoriales de la fruta fresca inicial. La viabilidad del procedimiento ha sido comprobada a nivel de laboratorio para una amplia gama de frutas, hortalizas y componentes con actividad fisiológica y a nivel de planta piloto para la obtención de hortalizas de cuarta gama enriquecidas en minerales y de productos de fruta con zumo de mandarina dirigidos a la población infantil. La presente tesis doctoral es consecuencia de la relación de cooperación y colaboración que se mantiene desde hace más de quince años entre la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER, Argentina) y la Universitat Politècnica de València (UPV, España). En el año 1998 se estableció un convenio marco entre la Universitat Politècnica de València y diferentes universidades argentinas, entre ellas la Universidad Nacional de Entre Ríos con el objetivo fundamental de promover el desarrollo y la difusión de la cultura y en particular el desarrollo de la enseñanza superior y la investigación cien-

tífica y tecnológica. En el año 2011, habiendo egresado como Ingeniero de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Nacional de Entre Ríos, la Unión Europea, dentro del programa Eurotango - Erasmus Mundus Action II me otorgó una beca predoctoral (2011- 2013), para la realización del trabajo de tesis en el Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València. Como base para el establecimiento de los objetivos de la tesis doctoral se estableció el siguiente planteamiento: *“Es posible realizar una transferencia de la tecnología desarrollada por el equipo de investigación del IU-IAD de la UPV, que permita aumentar las posibilidades de industrialización del excedente de producción de arándanos en la Región de Entre Ríos”*.

## 2.2 Objetivos.

En el planteamiento de los objetivos de la presente tesis doctoral se tuvo en cuenta el análisis DAFO sobre la situación de frutas finas en las regiones de Tucumán, Entre Ríos y Neuquén, que la Unión Industrial Argentina, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el Programa para la federalización de la ciencia, la tecnología y la innovación productiva y el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva realizaron en 2009. El análisis permitió establecer un conjunto de debilidades cuya superación implicaba un desafío científico tecnológico, y de las cuales las siguientes tres permitieron establecer los objetivos de la tesis doctoral:

- Falta de trituradoras, pulpadoras y tamizadoras para alcanzar una granulogía fina en la elaboración de dulces. En la presente tesis doctoral se estudiará la aplicación de una elevada presión de homogeneización como posible solución para reducir el tamaño de partícula del zumo de arándano. La disminución del tamaño de partícula permitirá la aplicación de la técnica de impregnación a vacío, haciendo posible el desarrollo de productos de interés industrial.
- Falta de experiencia en I+D en el desarrollo de productos con posibilidades de industrialización. En el mercado de los arándanos, prácticamente el total de la cosecha se destina a exportación en fresco. En este sentido, la experiencia del sector en desarrollar procesos que

agreguen valor al fruto fresco es escasa. La presente tesis doctoral establece como posible solución el desarrollo de productos que agreguen valor al producto agroalimentario primario mediante el desarrollo de zumos de alta calidad y productos deshidratados que proporcionarán, además, un efecto beneficioso sobre la salud.

- Escasas experiencias de investigación, y validación tecnológica que permitan una mejora de la competitividad del sector. La comprobación del valor funcional, tanto del zumo como de los productos desarrollados, mediante determinaciones analíticas, supondrán un paso decisivo para distinguir el producto regional como un producto único.

A continuación se exponen de forma concreta los objetivos de la presente tesis doctoral.

### 2.2.1 Objetivos generales.

1. Mejora del proceso de obtención de zumo de arándano rico en componentes con actividad fisiológica y apto para ser incorporado a la estructura matricial de frutas por impregnación a vacío. Se actuará sobre dos operaciones básicas del proceso de obtención:
  - a) La operación de despectinización: con el fin de reducir la temperatura a la que se lleva a cabo la operación, se determinará la factibilidad de despectinizar el zumo mediante levaduras con alta actividad pectinasa seleccionadas por evolución genómica por diseño molecular.
  - b) La operación de homogeneización: se determinará el efecto de la aplicación de una elevada presión de homogeneización sobre la calidad del producto final.
2. Desarrollo de un alimento natural y funcional de baja humedad y alta calidad que pueda ser consumido como snack, a partir de frutas y zumo de arándano con alto contenido en componentes con actividad fisiológica y/o microorganismos probióticos.



### 2.2.2 Objetivos específicos.

1. Determinar las propiedades físico-químicas y funcionales de los zumos de arándano comerciales existentes en el mercado español y en el argentino.
2. Determinar el efecto de la temperatura y del tiempo de tratamiento de despectinización con packs enzimáticos comerciales sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de arándano.
3. Evaluación de la actividad pectinasa de cuatro cepas de *Saccharomyces bayanus* (CECT 1926) seleccionadas por su alta actividad pectinasa.
4. Determinar el efecto del extracto enzimático producido por la cepa con mayor actividad sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de arándano.
5. Determinar el efecto de la aplicación de una elevada presión de homogeneización sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de arándano despectinizado.
6. Valorar la capacidad de impregnación de rodajas de manzana con zumo de arándano sin homogeneizar y homogeneizado. Estimación de la composición del producto impregnado.
7. Determinar el efecto de la temperatura de secado por aire caliente y de la liofilización sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del producto impregnado.
8. Valorar la capacidad de crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de arándano. Se determinará el efecto del pH.
9. Valorar la capacidad de impregnación de rodajas de manzana con zumo de arándano con probiótico. Estimación de la composición del producto impregnado.
10. Determinar el efecto de la temperatura de secado por aire caliente sobre el contenido en el probiótico y las propiedades físico-químicas y funcionales del producto impregnado.

### 2.3 Plan de trabajo.

1. Revisión bibliográfica
2. Estudio de mercado
3. Caracterización físico-química y funcional de bebidas comerciales adquiridas en el mercado español y argentino. Se determinará:
  - a) Color
  - b) Viscosidad
  - c) Contenido en sólidos solubles
  - d) pH y acidez
  - e) Pulpa suspendida y turbidez
  - f) Tamaño de partícula
  - g) Antocianinas totales
  - h) Fenoles totales
  - i) Capacidad antioxidante (por los métodos ABTS y DPPH)
  - j) Contenido, por HPLC, de las antocianinas específicas de mayor interés: delfinidina, malvidina y cianidina.
4. Despectinización del zumo obtenido a partir de arándano de calidad industrial procedente de Concordia (Argentina) con dos packs enzimáticos comerciales (Viscozyme L y Rapidase ex color) a las temperaturas de 50 y 60°C. Se realizarán las siguientes actividades:
  - a) Caracterización de la materia prima: sólidos solubles, pH, acidez, antocianinas totales, fenoles totales.
  - b) Trituración de la materia prima y adición de un 0.1 % (m/m) del pack enzimático comercial.

- c) Caracterización del zumo despectinizado a diferentes tiempos: viscosidad, color, antocianinas poliméricas, antocianinas totales y fenoles totales
5. Evaluación de la actividad pectinasa de cepas de *Saccharomyces bayanus* (CECT 1926) y de los transformantes 1926-TP6, 1926-12T y 1926-12T4PO seleccionadas por su alta actividad pectinasa.
  - a) Revisión bibliográfica de los métodos para determinar actividad endopoligalacturonasa.
  - b) Puesta a punto de los métodos seleccionados.
  - c) Determinación de la actividad endopoligalacturonasa de los extractos provenientes de la cepa original y de las tres obtenidas por evolución genómica por diseño molecular.
  - d) Ensayo de despectinización de zumo de arándanos con el extracto con mayor actividad endopoligalacturonasa.
6. Despectinización del zumo obtenido a partir de arándano congelado de calidad industrial procedente de Concordia (Argentina) con la cepa seleccionada de mayor actividad a temperatura ambiente. Se realizarán las siguientes actividades:
  - a) Caracterización de la materia prima: sólidos solubles, pH, acidez, antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante.
  - b) Trituración de la materia prima y adición del extracto enzimático con mayor actividad en una concentración equivalente a la utilizada en el caso del pack enzimático comercial.
  - c) Caracterización del zumo despectinizado a diferentes tiempos: viscosidad, color, antocianinas poliméricas, antocianinas totales y fenoles totales
7. Obtención de zumo de arándano despectinizado y en condiciones adecuadas para ser sometido a la operación de homogeneización.

8. Homogeneizar a 25, 50, 100 y 150 MPa el zumo de arándano despectinizado y filtrado. Se llevarán a cabo las siguientes actividades:
  - a) Caracterización de la materia prima: sólidos solubles, pH, acidez, antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante.
  - b) Aplicación de la presión de homogeneización correspondiente.
  - c) Caracterización del zumo homogeneizado a las diferentes presiones: color, pulpa suspendida y turbidez, tamaño de partícula, antocianinas totales, fenoles totales, capacidad antioxidante (por los métodos ABTS y DPPH), contenido, por HPLC, de las antocianinas específicas de mayor interés (delfinidina, malvidina y cianidina).
  
9. Impregnación de rodajas de manzana de la var. *Granny Smith* con zumo despectinizado y filtrado y con zumo homogeneizado. Cuantificación de los parámetros de impregnación y estimación de la composición de las rodajas de manzana impregnadas.
  
10. Estabilización de las rodajas impregnadas por liofilización y secado por aire caliente a 30, 40 y 50°C hasta el mismo valor de actividad de agua:
  - a) Impregnación de rodajas de manzana con zumo de arándano y cuantificación del zumo incorporado.
  - b) Liofilización de las muestras impregnadas durante 48h.
  - c) Secado por aire caliente de las muestras impregnadas a 30, 40 y 50°C.
  - d) Caracterización de las muestras secas: propiedades mecánicas, color, capacidad antioxidante, antocianinas totales, fenoles totales y contenido en las antocianinas específicas de mayor interés: delfinidina, malvidina y cianidina.
  
11. Incubación de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de arándano despectinizado y filtrado con el pH corregido a 5, 5.5 y 6.

- a) Incubación del microorganismo en medio específico y en las condiciones adecuadas.
  - b) Corrección del pH del zumo con bicarbonato de sodio.
  - c) Transferencia del microorganismo del medio específico al zumo a los diferentes pH e incubación.
  - d) Evaluación del contenido microbiano por recuento en placa
12. Impregnación de rodajas de manzana de la var. *Granny Smith* con zumo de arándano con probiótico. Cuantificación de las propiedades funcionales y del contenido probiótico.
13. Estabilización de las rodajas impregnadas con probióticos por secado por aire caliente a 30°C durante 24h:
- a) Impregnación de rodajas de manzana con zumo de arándano con probióticos
  - b) Secado por aire caliente de las muestras impregnadas a 30°C.
14. Caracterización de las muestras secas con probióticos: contenido de probióticos, capacidad antioxidante, antocianinas totales y fenoles totales.



## Parte III

# Métodos y equipos





## Capítulo 3

# Métodos analíticos

### **3.1 Análisis fisicoquímicos.**

#### **3.1.1 Sólidos solubles, pH y acidez.**

El contenido de sólidos solubles se determinó en grados Brix mediante un refractómetro Abbe (MAR-3T, Atago Co. Ltd., Japón) a 20°C. La acidez total titulable se determinó con hidróxido de sodio 0.1N NaOH mediante un titulador automático Titrando 905 (Metrhom, Gomensoro S.A., España) y se expresó en gramos de ácido cítrico por litro para los zumos de arándano comerciales y en gramos de ácido cítrico por cien gramos de muestra para la fruta y el zumo despectinizado. El pH fue determinado con un potenciómetro con corrección automática de temperatura (SevenEasy, METTLER TOLEDO GmbH, Schwerzenbach, Suiza).

### 3.1.2 Humedad y actividad de agua.

La actividad de agua se determinó utilizando un higrómetro de punto de rocío (DECAGÓN Aqualab CX-2,  $\pm 0.003$ ) y el contenido de humedad fue cuantificado por pérdida de peso de una muestra secada en estufa de vacío a 60°C hasta alcanzar un peso constante (Método 20.013 (AOAC International, 1980)).

### 3.1.3 Pulpa suspendida y turbidez.

La pulpa suspendida se determinó como porcentaje en peso de la pulpa separada por centrifugación con respecto al peso total de la muestra. Se utilizó una centrifuga (Medifriger BL-S, J.P. Selecta S.A., Barcelona, España). Diez mililitros de muestra fueron centrifugados a 365G durante 10 minutos a 27°C. La pulpa precipitada se pesó, del sobrenadante se extrajo una muestra para determinar la turbidez. Cinco mililitros de este primer sobrenadante fueron centrifugados a 3000G durante 10 minutos a 27°C, nuevamente se pesó el precipitado obtenido y se determinó la turbidez del sobrenadante. Para poder comparar los distintos valores de turbidez de las bebidas comerciales evaluados y eliminar la interferencia del color propio de cada una de las muestras, se utilizó como blanco para cada zumo, una muestra del mismo centrifugada a 14000 r.p.m. con el objetivo de eliminar toda la pulpa suspendida. La turbidez se determinó en un espectrofotómetro UV/visible (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Alemania), midiendo el porcentaje de transmitancia a 650nm.

### 3.1.4 Tamaño de partícula por difracción láser.

El tamaño de partícula de los zumos se determinó en un equipo de difracción láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Limited, Worcestershire, Gran Bretaña). Como medio dispersante se utilizó agua. El índice de refracción de las muestras fue de 1.350 y el índice de absorción utilizado fue 0.1.

### 3.1.5 Análisis reológico.

El estudio reológico se realizó con un Reometro Rotatorio (Haake Rheotress 1, Estados Unidos) en el modo de Control de Velocidad (CR: Control Rate), con los accesorios de cilindros concéntricos (Z34 DIN 53019). El método tiene programado una primera fase de mantenimiento, para estabilizar la temperatura y disminuir el estrés reológico de la muestra. Durante la segunda fase se aplica gradiente de velocidad creciente de 0 a  $250 \text{ s}^{-1}$  y se realizan las medidas reológicas. Cada una de las fases tiene una duración de 300s. La temperatura de trabajo se seleccionó a  $20^{\circ}\text{C}$  para analizar muestras de zumos comerciales y a  $50^{\circ}\text{C}$  para realizar las muestras provenientes del ensayo de despectinización. El comportamiento reológico de las muestras fue modelizado utilizando el modelo de Ostwald-de-Waele. El índice de consistencia ( $k=[\text{Pa}\cdot\text{s}^n]$ ) y el índice de comportamiento al flujo ( $n=[\text{adimensional}]$ ) del modelo fueron obtenidos por regresión lineal de los valores experimentales.

### 3.1.6 Color Instrumental.

El color instrumental fue medido utilizando un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co. Ltd., Japón). Una cerámica blanca y una cámara negra suministrados por el fabricante se utilizaron para calibrar el equipo. Las muestras líquidas se colocaron en cubetas plásticas de 25mL y 2cm de paso óptico. Los resultados se expresaron en el espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$  para el iluminante D65 y un ángulo del observador de  $10^{\circ}$ . Las muestras sólidas se analizaron colocándolas directamente en la ventana pequeña de medición. Se realizaron tres determinaciones en la muestra en tres puntos separados entre sí por un ángulo de  $120^{\circ}$ .

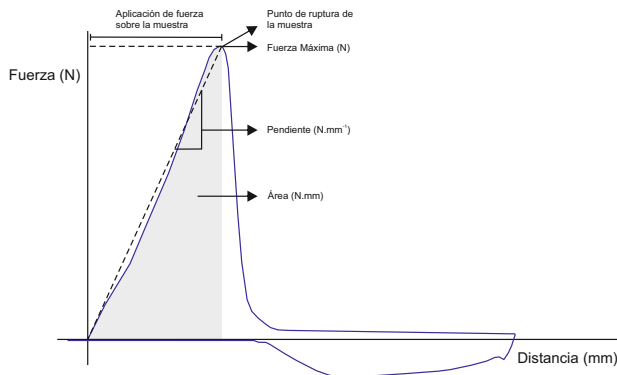
### 3.1.7 Análisis de textura.

Las propiedades mecánicas de las muestras se evaluaron mediante ensayos de punción llevados a cabo en un Analizador Universal de Textura (TA.XT2, Stable Micro Systems, Londres, Gran Bretaña). El ensayo se realizó con un punzón cilíndrico de 2 mm de diámetro. Las condiciones del ensayo fueron: velocidad de avance del punzón de  $2\text{mm/s}$ , fuerza de activación de

0,04903N, distancia recorrida por la sonda de 10mm y celda de carga de 50kg. Descripción de las variables de textura evaluadas: Haciendo uso de una macro, se pudieron procesar las curvas Fuerza vs. Distancia, obtenidas del ensayo de punción. Las variables de textura calculadas fueron:

1. Fuerza máxima: definido como el valor último de la fuerza en Newton (N) que corresponde al punto de ruptura de la muestra.
2. Pendiente o coeficiente de elasticidad: es la pendiente de la curva Fuerza vs. distancia (N/mm) desde el origen a la fuerza máxima. Altos valores del coeficiente de elasticidad implican una mayor rigidez de la muestra.
3. Área: es el área bajo la curva fuerza vs. distancia, medida en N.mm, hasta el punto de ruptura. Esta variable es un índice de la energía necesaria para romper la baya (Robin, Abbal, & Salmon, 1997; Sato, Yamane, Hirakawa, Otobe, & Yamada, 1997).

En la [figura 3.1](#) se presenta una curva típica del ensayo de punción y se puede a qué hace referencia cada una de las variables de textura calculadas.



**Figura 3.1.** Curva típica del ensayo de punción de rodajas de manzana.

## 3.2 Análisis funcionales.

### 3.2.1 Antocianinas.

#### *Antocianinas monoméricas totales.*

El contenido de antocianinas monoméricas totales se determinó mediante el método del pH diferencial de Giusti and Wrolstad (2001). Se utilizó un buffer pH 1.0 (KCl 0.025 M) y otro a pH 4.5 (CH<sub>3</sub>COONa 0.4 M). El contenido de antocianinas se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción molar para la cianidina-3-glucósido (26900L/mol.cm). Las medidas se realizaron a 510 y 700nm en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Alemania) y se utilizó como blanco una cubeta con agua destilada. Para las muestras líquidas, los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por litro de muestra. Para el caso de la determinación de antocianinas totales en muestras sólidas, se realizó una extracción sólido-líquido con metanol acidificado con ácido clorhídrico al 1%. La extracción se realizó en tres etapas con agitación. La primera etapa se llevó a cabo con 10mL de solvente de extracción durante 30 minutos y la segunda y tercera con 5mL durante 15 minutos. Los sólidos se separaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos a 10°C.

#### *Índice de color polimérico.*

El índice de color polimérico se determinó según la metodología descrita por Giusti and Wrolstad (2001). Consiste en determinar la absorbancia de las muestras en dos condiciones, una con un tratamiento con una solución de metabisulfito de potasio K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y la otra sin tratamiento, pero adicionada con el mismo volumen de agua. La absorbancia fue determinada a 420, 510 y 700nm en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Alemania). Las diluciones de las muestras se prepararon con buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M, pH 1.

### *Antocianinas por HPLC.*

Para determinar el contenido de antocianinas en las muestras sólidas, estas fueron previamente liofilizadas durante 48h. Cada rodaja se trituró y se realizó una extracción sólido-líquido con metanol acidificado con 0.1 % de ácido clorhídrico HCl. La extracción se realizó en tres etapas con agitación. La primera etapa se llevó a cabo con 10mL de solvente de extracción durante 30 minutos y la segunda y tercera con 5mL durante 15 minutos. Los sólidos se separaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos a 10°C. Las muestras de zumo se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 10°C para separar las partículas sólidas. Tanto las muestras sólidas extraídas con metanol como las de zumo centrifugado se filtraron con filtros de jeringa de nylon de 0.45 $\mu$ m. El contenido de antocianinas se determinó mediante un Sistema Alliance<sup>®</sup> HPLC (Módulo de separaciones 2695, Waters Co. Milford, Mass., Estados Unidos) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD 2996, Waters Co. Milford, Mass., Estados Unidos). La separación cromatográfica se realizó por medio de una columna Luna II C18 de 250mm x 4.6mm y 5 $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, Estados Unidos). Se utilizó el método cromatográfico de Cassano, Conidi, and Drioli (2011). El volumen de inyección fue de 10 $\mu$ L. Las antocianinas fueron identificadas por medio de sus tiempos de retención y espectros característicos comparados con los de los estándares: Cianidina-3-O-glucósido (Kuromarin chloride), Delfinidina-3-O-glucósido (Myrtillin chloride), Malvidina-3-O-glucósido (Oenin Chloride), se utilizaron estos tres estándares debido a que diversos autores los señalan como principales antocianinas encontrada en los arándanos (Kader, Rove, Girardin, & Metche, 1996; Rossi et al., 2003; J. Lee et al., 2002; Castañeda-Ovando, Pachecoherandez, Paezherandez, Rodriguez, & Galanvidal, 2009). Los estándares se disolvieron en metanol acidificado con 0.1 % de ácido clorhídrico. La cuantificación se realizó por medio de curvas de calibrado entre 5-300ppm. Los resultados se expresaron en miligramos de antocianina por 100 gramos de producto o 100 gramos de materia seca.

### 3.2.2 Fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) (Waterhouse, 2002). El reactivo de FC se utilizó en una concentración 1 N y la solución de carbonato de sodio se preparó al 7,5 %. La medida espectrofotométrica se realizó a una longitud de onda de 765nm (Espectrofotómetro Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Alemania). Se utilizó un blanco de reactivo reemplazando la muestra por agua y una curva de calibrado de 0 a 20 ppm de ácido gálico monohidratado ( $C_6H_2(OH)_3COOH \cdot H_2O$ ). Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de zumo (mg GAE/L).

### 3.2.3 Capacidad antirradical.

#### *Método del radical DPPH.*

La capacidad antirradical se determinó por el método del radical libre (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). La actividad antirradical se determinó midiendo la absorción a 515nm (Espectrofotómetro Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Alemania) del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). La solución stock se preparó disolviendo el DPPH en metanol en una concentración 2mM. La solución de trabajo se preparó disolviendo la solución stock 1:20 con metanol. Se realizó una curva de calibrado de 50-150ppm con ácido ascórbico. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido ascórbico (mg AAE/L).

#### *Método del radical ABTS.*

Para determinar la capacidad antirradical por el método del ABTS propuesto por Re et al. (1999) se preparó el radical por reacción de una solución 7mM de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) con una solución de concentración final de 2,45mM de persulfato de potasio  $K_2S_2O_8$ . La absorbancia se determinó a 734nm en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Scientific, Alemania). La capacidad antirradical fue expresada en miligramos equivalentes de trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylchroman-2-carboxylic acid)(mg TEAC/L) mediante una curva de calibrado de 20-70ppm de trolox.

### **3.2.4 Análisis estadístico.**

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los valores presentados corresponden a las medias  $\pm$  la desviación estándar. Por medio del software Statgraphics Centurion v. 16.1.11. se realizaron análisis de las varianzas (ANOVA) para determinar las diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0.5$ ).



## Capítulo 4

# Equipos e instalaciones utilizadas

### 4.1 Homogeneización.

Los tratamientos de homogeneización se realizaron en un homogeneizador de laboratorio de alta presión (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia) a 25, 50, 100 y 150MPa. La temperatura del zumo fue medida a la entrada y a la salida del homogeneizador con un termómetro de vidrio.

### 4.2 Impregnación a vacío.

La impregnación a vacío se realizó en un una cámara de vacío (Heraeus vacuum oven, Thermo Fisher Scientific Inc., Alemania). Los discos de manzana se sumergieron en el zumo de arándanos y se aplicó una presión de 50mbar durante 10 minutos. A continuación se restauró la presión atmosférica manteniendo las rodajas sumergidas en el zumo durante 10 minutos más.

### **4.3 Secado.**

El secado se realizó en un secador de bandejas CLW 750 TOP+ (Pol-Eko-Aparatura SP.J., Polonia) con flujo de aire transversal, velocidad del aire de 2 m/s, y una renovación de aire del 50 %.

## Parte IV

# Resultados y discusión



## Capítulo 5

# Mejora del proceso de obtención de zumo de arándanos

### 5.1 Análisis de mercado.

En primer lugar se realizó un análisis de mercado, tanto en Argentina como en España para tener conocimiento acerca de las bebidas comerciales con arándanos o zumo de arándanos existentes en el mercado. Se valoraron tanto sus características fisicoquímicas (pH, acidez, sólidos solubles, pulpa suspendida, turbidez, tamaño de partículas suspendidas, color instrumental y viscosidad) como la composición de las bebidas (ingredientes, formulación, alegaciones de calidad) y el contenido de componentes funcionales de interés (antocianinas totales, fenoles totales, actividad antirradical por el método del DPPH y el ABTS y análisis HPLC de antocianinas específicas: delfinidina, cianidina, malvidina).

Los productos comerciales que se presentan a continuación se adquirieron en diferentes puntos de venta en la ciudad de Valencia (España) y en la ciudad de Concordia (Argentina).

En la [tabla 5.1](#) se resumen las características de venta, presentes en la etiqueta, de cada uno de las bebidas analizadas. Los tres primeros zumos son los encontrados en el mercado argentino. Los nueve restantes son los encontrados en el mercado español. Dentro de estos últimos se han incluido bebidas procedentes de arándano rojo. El arándano rojo, no se comercializa en Argentina.

En función de la normativa española y argentina ([Parte VII](#)) se pueden clasificar los distintos productos en:

- Zumo de frutas
- Néctares
- Bebidas refrescantes

Teniendo en cuenta esta clasificación se pueden diferenciar los siguientes aspectos:

- Punto de venta: los zumos y los néctares se encuentran disponibles en sectores de dietética de grandes superficies o en tiendas especializadas como herboristerías y tiendas de productos orgánicos. Las bebidas refrescantes se pueden encontrar en supermercados junto con el resto de zumos de consumo habitual.
- Fabricante: todas las bebidas que se comercializan en el mercado español son importadas. El producto “Cranberry” indica que está elaborado en España, concretamente en Murcia, sin embargo, allí solo se realiza la elaboración de la receta final (dilución) y envasado, ya que el zumo concentrado y el puré de arándano proceden de proveedores extranjeros (Canadá y Estados Unidos). Los países de donde provienen las bebidas que se comercializan en el mercado español son: Francia, Reino Unido, Suiza y Alemania. Las bebidas que se comercializan en el mercado argentino, han sido todas elaboradas en Argentina.
- Envase: a excepción del producto “Grandiet”, todos los zumos y néctares se comercializan en envases de vidrio de 330mL o 500mL. En el caso de “Eden” y “Rabenhorst” el envase es de vidrio tintado lo que

permitiría preservar el producto frente a la oxidación producida por la luz. “Grandiet” y “Granini” son comercializados en envases de PET transparente. “Blueberry” y “Cranberry” se comercializan en envases Tetra Pak.

- Contenido de fruta: en el caso de los zumos, el etiquetado indica que contienen únicamente arándanos. No se ofrece ningún dato más, en ningún caso la formulación proviene de concentrado. Los néctares tienen un 42 % de pulpa de arándanos en el caso de “Alain Milliat” un 65 % de fruta para “Biotta azul” y un 30 % en el caso de “Biotta rojo”. Las bebidas “Cranberry” y “Granini” contienen un 27 % y un 14 % de zumo de frutas, proveniente en ambos casos de concentrado. La bebida “Blueberry” contiene un 30 % de mezcla de los siguientes zumos concentrados: manzana, arándano, uva y bayas de saúco. Únicamente se indica el porcentaje en arándano, un 5 %. Según el artículo 3 de la Directiva 2012/112/CE, “En el caso de productos elaborados a partir de dos o más frutas, [. . .], la denominación se compondrá de un lista de las frutas utilizadas, en orden decreciente según el volumen de los zumos o purés de frutas incluidos, tal como se indique en la lista de ingredientes”, se deduce que este producto no contiene mayoritariamente concentrado de arándano y sin embargo se comercializa como tal. Su envase muestra en portada un único fruto de arándano azul y se denomina “Blueberry”.
- Líquido de dilución: el agua es el principal componente de las bebidas refrescantes. En los néctares, se emplea una infusión: de hojas de abedul en una concentración de 2 g/L para “Biotta rojo”, de melisa en 1,5 g/L para “Biotta azul” y agua para “Alain Milliat”.
- Otros ingredientes: las bebidas clasificadas como zumos son las que menos aditivos contienen. En el caso de los productos argentinos, dos contienen sorbato y benzoato como conservantes y una vitamina C. Los zumos disponibles en el mercado español no indican agregado de ningún aditivo. Los néctares indican la adición de azúcares y en el caso de “Alain Milliat” ácido cítrico como acidulante y ácido ascórbico como antioxidante. Las bebidas refrescantes contienen azúcares, acidulantes, antioxidantes y agentes estabilizantes.

- Alegaciones nutricionales: los zumos del mercado argentino alegan no tener gluten, sin conservantes, endulzantes artificiales ni colorantes. Los zumos del mercado español indican su procedencia de cultivos 100% biológicos y, en el caso de los néctares, además cultivos silvestres. La bebida “Blueberry” alega, además de ser una fuente de antioxidantes, no provenir de organismos genéticamente modificados, no contener saborizantes, colorantes ni conservantes artificiales. Por último “Cranberry” indica que es una fuente natural de antioxidantes, no contiene colorantes ni conservantes.
- Precios de mercado: El conjunto de factores como el tipo de envase, el contenido de fruta, las alegaciones y el punto de venta orientan el producto hacia una escala de valores que se refleja en el precio final del mismo. Los zumos y néctares del mercado español poseen precios de mercado entre ocho y diez veces superiores a los de las bebidas refrescantes. Por ello los zumos y néctares se destinan a un consumo más específico y conllevan mayor valor añadido debido a que pertenecen a la categoría de productos dietéticos o gourmet. Los productos de arándano azul son en torno a 4€/L más caros que sus homólogos de arándano rojo. Los productos comercializados en el mercado argentino poseen precios intermedios entre las bebidas refrescantes y los zumos y néctares del mercado español. Comparativamente, las bebidas argentinas de zumo de arándanos tienen un precio entre 4 y 5 veces mayor que los zumos de frutas tradicionales.



Tabla 5.1. Bebidas comercializadas con arándanos en el mercado argentino y español.

Bebida	Tipo	Fabricante - País de origen	Ingredientes	Alegaciones nutricionales	Envase	Precio €/L
Sabores del Litoral	Zumo de fruta	Sabores del Litoral, Concordia, Entre Ríos, Argentina	Jugo de arándanos, sorbato de potasio, benzoato de sodio.	Ninguna	Vidrio transparente 500mL	10
Grandiet	Zumo de fruta	Grandiet, Córdoba, Argentina	Jugo de arándanos, agua, sorbato de potasio, benzoato de sodio.	Sin agregado de azúcar. Sin T.A.C.C. Libre de Glúten.	PET 500mL	8
Confines del mundo	Zumo de fruta	The Berry Store, Rosario, Santa Fe, Argentina	Arándanos, vitamina C	Sin conservantes, endulzantes artificiales ni colorante. Tratado térmicamente.	Vidrio transparente 500mL	7
Biotta (azul)	Néctar	Trurella Schweiz AG, Egnach, Suiza.	Néctar de mirtilo negro silvestre** (65%), infusión de melisa* (1,5 g/L.), azúcar de caña. Pasteurizado. *de producción orgánica. ** cultivo silvestre certificado bio.	Un vaso antes de cada comida. Néctar de frutas. Cultivo silvestre certificado bio.	Vidrio transparente 500mL	15,06
Rabenhorst	Zumo de fruta	Haus Rabenhorst Unkel/Rhine, Alemania.	Zumo de arándanos azul silvestre (Vaccinium myrtillus) ecológico.	Bio. 100 % puro. Sin azúcar añadido. No procedente de concentrado.	Vidrio tinto 330mL	30,27
Alain Milliat	Néctar	Alain Milliat Orleans, Francia	Agua, pulpa de arándanos 42%, azúcar, acidulante: ácido cítrico, antioxidante: ácido ascórbico.	Ninguna	Vidrio transparente 330mL	16,67
Eden (azul)	Zumo de fruta	EDEN Reform GmbH, Alemania.	Zumo de arándano*. *procedente de agricultura biológica controlada por: DE-013 Oko-Kontrollstelle.	Producto procedente de agricultura biológica. Exprimido de fruta entera.	Vidrio tinto 330ml	19,35

**Tabla 5.1. (continuación.)**

Bebida	Tipo	Fabricante - País de origen	Ingredientes	Alegaciones nutricionales	Envase	Precio /L
Blueberry	Bebida refrescante	The Berry Company, Alperton, Middlesex, Reino Unido.	Agua, concentrado de zumos de fruta, 30 % (manzana, arándano 5 %, uva, bayas de saico), concentrado de extracto de frutas, aromatizante natural, regulador de acidez (ácido cítrico), estabilizante (pectina procedente de la fruta), antioxidante (ácido ascórbico).	Rico en antioxidantes – Ayuda a preservar la salud del corazón. No artificial colourings, No artificial preservatives, No artificial additives, No artificial flavourings, No GMO's.	Tetrabrick - 1L	2.78
Biotta (rojo)	Néctar	Trurella Schweiz AG, Egnach, Suiza.	Infusión de hojas de abedul* (2 g/L), jugo de arándanos rojos** silvestres Vaccinium vitis-idaea L. (30 %), concentrado de agave*, Pasteurizado *de cultivo biológico certificado **cultivo silvestre certificado bio.	Un vaso antes de cada comida. Néctar de frutas. Cultivo silvestre certificado bio. Con taminos naturales.	Vidrio transparente 500ml	12.04
Eden (rojo)	Zumo de fruta	EDEN GmbH, Heimerdingen, Alemania.	Zumo de arándano rojo* de cultivo ecológico. *procedente de agricultura biológica controlada por: DE-013 Oko-Kontrollstelle.	Producto procedente de agricultura biológica. Exprimido de fruta entera.	Vidrio tintado 330mL	17.85
Cranberry	Bebida refrescante	AMC grupo Alimentación, Fresco y Zumos S.A., Espinardo, Murcia, España.	Agua, zumo de arándano a base de concentrado (24%), jarabe de glucosa-fructosa, azúcar, puré de arándano (3%), corrector de la acidez (ácido cítrico), antioxidante (ácido ascórbico).	Sin colorantes ni conservantes. Fuente natural de antioxidantes.	Tetrabrick 1L	1.75
Granini	Bebida refrescante	Eckes-Granini Group GmbH, Niedertal, Alemania. www.granini.es	Agua, zumo de arándano rojo a base de concentrado (14%), azúcar, zumo de limón concentrado.	Ninguna	PET transparente 1L	1.93

### 5.1.1 Características fisicoquímicas de las bebidas comerciales.

Tanto en Argentina como en España sólo se cultivan arándanos azules. Teniendo en cuenta la importancia de esta actividad, la caracterización de las bebidas comerciales sólo se realizó para las provenientes de bayas azules. Durante el análisis de las bebidas comerciales, el zumo Blueberry dejó de comercializarse por lo cual no fueron posibles realizar las determinaciones analíticas en esta muestra. En la [tabla 5.2](#) se presentan los valores de sólidos solubles, pH, acidez titulable y el índice grados Brix/acidez para las siete muestras de bebidas comerciales azules. Si bien existen diferencias significativas en términos de pH y acidez, el rango en el cual varían los valores obtenidos es reducido. Los valores de pH oscilan entre 2.8-3.6 y los valores de acidez entre 0.2-1.2 g ac. cítrico/L. En cambio, los valores obtenidos para los sólidos solubles y los valores del índice °Brix/acidez, presentan grandes diferencias, oscilando entre 1.8-14.9 y 3.9-22.8 respectivamente. No se observan diferencias en sólidos solubles en función del tipo de bebida, es decir los néctares podrían estar adicionados con azúcares y presentar un mayor contenido de sólidos solubles, sin embargo este no es el caso y las mayores diferencias se observan dentro del grupo de los zumos. Si se tiene en cuenta que los valores de sólidos solubles para la fruta se encuentran alrededor de 13-15°Brix (Antequera Klein, Betoret, Barrera, & Luna Pizarro, 2013; Skrede et al., 2000) los valores de los zumos Grandiet y Confines del mundo resultan anormalmente bajos. En cuanto al ratio °Brix/acidez, las diferencias observadas se deben a la gran variabilidad de los sólidos solubles. El zumo Confines del mundo y el néctar Alain Milliat presentan valores de ratio similares a los observados en zumos de naranja que se encuentran entre 12.5-15.6 (Carbonell, Tárrega, Gurrea, & Sentandreu, 2011; Cerdán-Calero, Izquierdo, & Sentandreu, 2013).

En la [tabla 5.3](#) se presentan los resultados obtenidos en las determinaciones relacionadas con el contenido de pulpa de los distintos zumos. Se observa una gran disparidad entre los resultados obtenidos. Algunos zumos presentan un alto contenido de pulpa: Confines del mundo y Alain Milliat; y otros presentan un bajo o prácticamente nulo contenido de pulpa: Sabores del litoral, Rabenhorst, Eden Azul. Por otra parte, los zumos: Sabores del Litoral, Grandiet, Biotta, Rabenhorst y Eden Azul presentan una proporción similar entre la pulpa menos estable (365G) y la más estable (3000G) en

**Tabla 5.2.** Propiedades fisicoquímicas de las bebidas comerciales.

Zumos	Sólidos solubles (°Brix)	pH	Acidez (g ác. cítrico/L)	°Brix/Acidez
Sabores de litoral	13.07 ± 0.06 <sup>f</sup>	3.270 ± 0.010 <sup>e</sup>	0.5728 ± 0.0013 <sup>c</sup>	22.81 ± 0.14 <sup>g</sup>
Grandiet	1.83 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.590 ± 0.010 <sup>f</sup>	0.472 ± 0.004 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.3 <sup>a</sup>
Confines del mundo	4.17 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.287 ± 0.006 <sup>g</sup>	0.263 ± 0.003 <sup>a</sup>	15.8 ± 0.2 <sup>e</sup>
Biotta azul	14.90 ± 0.10 <sup>g</sup>	2.980 ± 0.010 <sup>d</sup>	0.7201 ± 0.0010 <sup>d</sup>	20.7 ± 0.2 <sup>f</sup>
Rabenhorst	9.70 ± 0.10 <sup>d</sup>	2.920 ± 0.010 <sup>c</sup>	1.24 ± 0.02 <sup>g</sup>	7.8 ± 0.2 <sup>b</sup>
Alain Milliat	10.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.823 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.823 ± 0.008 <sup>e</sup>	12.8 ± 0.3 <sup>d</sup>
Eden azul	9.4 ± 0.2 <sup>c</sup>	2.893 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.9890 ± 0.0015 <sup>f</sup>	9.5 ± 0.2 <sup>c</sup>

Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

tanto que los zumos Confines del mundo y Alain Milliat tienen una mayor proporción en pulpa menos estable. Desde el punto de vista de la turbidez se observan cuatro grupos de zumos: los zumos de turbidez baja (tanto a 365 como a 3000G): Biotta azul, Rabenhorst, Alain Milliat, Eden Azul; los zumos de turbidez media a 365G: Grandiet y turbidez media a 3000G: Sabores del Litoral y Confines del mundo; los zumos de turbidez alta a 365G: Sabores del Litoral y de turbidez alta a 3000G: Grandiet; zumo de turbidez muy alta a 365G: Confines del mundo.

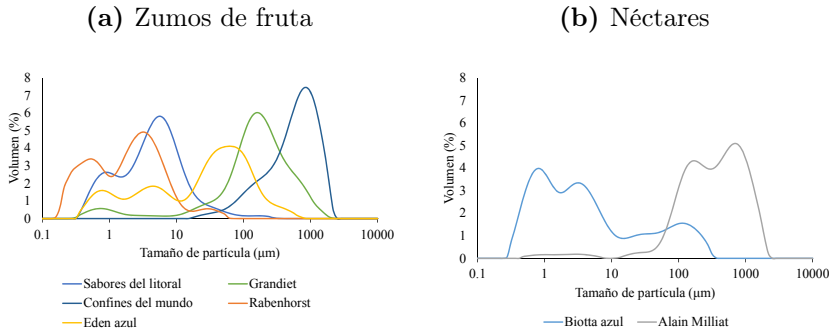
**Tabla 5.3.** Pulpa suspendida y turbidez de las bebidas comerciales.

Zumos	Pulpa suspendida 365G	Pulpa suspendida 3000G	Turbidez 365G	Turbidez 3000G
Sabores de litoral	0.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.66 ± 0.16 <sup>a</sup>	26.4 ± 4.5 <sup>c</sup>	5.0 ± 0.6 <sup>b</sup>
Grandiet	5.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.7 <sup>b</sup>	12.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	9.6 ± 0.7 <sup>c</sup>
Confines del mundo	28.4 ± 4.3 <sup>c</sup>	14.1 ± 2.3 <sup>d</sup>	65.0 ± 0.5 <sup>d</sup>	6.9 ± 2.8 <sup>b</sup>
Biotta azul	1.6332 ± 0.1098 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.93 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>a</sup>
Rabenhorst	1.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.19 <sup>a</sup>	3.238 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.14 <sup>a</sup>
Alain Milliat	18.5 ± 1.8 <sup>d</sup>	12.1 ± 1.5 <sup>c</sup>	2.998 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>
Eden azul	2.2 ± 0.6 <sup>ab</sup>	2.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.57 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.7 <sup>a</sup>

Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Adicionalmente, se determinó por difracción láser el tamaño de las partículas presentes en las bebidas comerciales. La distribución de los tamaños encontrados en las distintas bebidas se pueden observar en la [figura 5.1](#). Los zumos Confines del mundo y Grandiet tienen una distribución de tamaño de partículas mono modal y más estrecha. Las otras bebidas comerciales

presentan partículas de diversos tamaños que dan lugar a distribuciones más amplias (Sabores del litoral, Biotta Azul y Alain Milliat), bimodales (Rabenhorst) o trimodales (Eden azul).



**Figura 5.1.** Distribución del tamaño de partícula en las bebidas comerciales.

En la [tabla 5.4](#) se presentan los valores del diámetro medio ponderado suponiendo partículas esféricas del mismo volumen que las reales ( $D_{[4,3]}$ ) y el diámetro medio ponderado suponiendo partículas esféricas de la misma superficie que las reales ( $D_{[3,2]}$ ). Teniendo en cuenta las distribuciones de tamaño de partícula presentadas en la [figura 5.1](#) los valores del diámetro  $D_{[4,3]}$  son los que mejores caracterizan el tamaño de partículas de todas las bebidas excepto en el caso del néctar Biotta Azul, en donde el valor  $D_{[3,2]}$  es el que mejor caracteriza el tamaño de partícula. El valor  $D_{[3,2]}$  representa mejor las distribuciones con tamaño de partícula muy pequeñas, alrededor de  $1\mu\text{m}$  en tanto que el valor  $D_{[4,3]}$  representa mejor el diámetro de distribuciones de partículas por encima de las  $100\mu\text{m}$ .

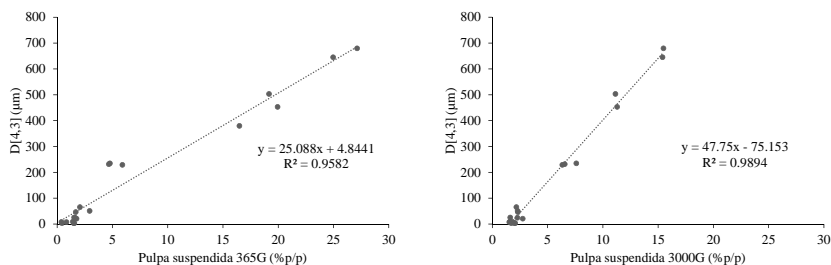
Analizando estadísticamente los resultados, se han encontrado correlaciones entre los valores  $D_{[4,3]}$  y las determinaciones de pulpa suspendida tanto a 365G como a 3000G. En la [figura 5.2](#) se presentan los resultados de una regresión lineal entre estas dos determinaciones. Se puede observar que si las partículas que contiene la nube del zumo son de mayor tamaño, la cantidad de pulpa suspendida recuperada a ambas fuerzas G es mayor. Esto indica que a tamaños de partícula más grandes, la nube es menos estable.

**Tabla 5.4.** Tamaño de partícula de las bebidas comerciales.

Zumos	$D_{[4,3]}$	$D_{[3,2]}$
Sabores de litoral	$8.3 \pm 1.7^a$	$2.113 \pm 0.004^a$
Grandiet	$217.8 \pm 41.0^c$	$11.0 \pm 0.6^b$
Confines del mundo	$640.3 \pm 8.8^e$	$272.65 \pm 2.03^d$
Biotta azul	$24.4 \pm 2.4^{ab}$	$1.494 \pm 0.018^a$
Rabenhorst	$3.65 \pm 0.08^a$	$0.87 \pm 0.03^a$
Alain Milliat	$489.86 \pm 27.15^d$	$39.69 \pm 2.19^c$
Eden azul	$61.24 \pm 12.07^b$	$3.9 \pm 0.5^a$

$D_{[3,2]}$  Diámetro medio en función de la superficie (Diámetro medio de Sauter): Es el promedio ponderado del diámetro de las partículas calculado asumiendo partículas esféricas con la misma superficie que las partículas reales.  $D_{[4,3]}$  Diámetro medio en función del volumen (Diámetro medio de De Brouckere): es la media ponderada del diámetro calculado asumiendo partículas esféricas del mismo volumen que las partículas reales. Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

(a) Pulpa suspendida 365G vs. Tamaño de partícula      (b) Pulpa suspendida 3000G vs. Tamaño de partícula



**Figura 5.2.** Correlaciones entre el tamaño de partícula por difracción láser y el contenido de pulpa suspendida.

Para analizar la percepción del color por el consumidor, se determinó el color instrumental de cada una de las bebidas en el espacio CIE  $L^*a^*b^*$ . Se determinaron las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  y se calcularon los atributos de color: croma ( $C^*$ ) y tonalidad ( $h$ ). Los resultados se presentan en la [tabla 5.5](#). Analizando estadísticamente los atributos del color percibido se observa que existen diferencias significativas para cada zumo en el valor

del croma o saturación del color, es decir, la intensidad del color es distinto para cada bebida comercial y en el caso de la tonalidad se diferencian cuatro grupos: a) Alain Milliat, Eden Azul y Confines del Mundo; b) Confines del mundo y Rabenhorst; c) Rabenhorst, Biotta azul y Grandiet; d) Sabores del Litoral.

**Tabla 5.5.** Propiedades ópticas de las bebidas comerciales.

Zumos	L*	a*	b*	C*	h
Sabores de litoral	$1.35 \pm 0.06^b$	$2.39 \pm 0.16$	$1.267 \pm 0.102$	$2.71 \pm 0.12^b$	$27.97 \pm 3.13^d$
Grandiet	$9.54 \pm 0.08^f$	$12.7 \pm 0.2$	$3.931 \pm 0.103$	$13.30 \pm 0.18^f$	$17.2 \pm 0.7^c$
Confines del mundo	$9.17 \pm 0.06^e$	$14.15 \pm 0.17$	$2.7 \pm 0.3$	$14.41 \pm 0.13^g$	$10.809 \pm 1.112^{ab}$
Biotta azul	$0.97 \pm 0.04^a$	$1.65 \pm 0.17$	$0.47 \pm 0.16$	$1.72 \pm 0.12^a$	$16.3 \pm 6.5^c$
Rabenhorst	$1.27 \pm 0.08^b$	$2.9 \pm 0.2$	$0.806 \pm 0.101$	$3.00 \pm 0.22^c$	$15.59 \pm 1.05^{bc}$
Alain Milliat	$1.92 \pm 0.06^c$	$4.69 \pm 0.08$	$0.70 \pm 0.03$	$4.74 \pm 0.08^e$	$8.4 \pm 0.5^a$
Eden azul	$2.30 \pm 0.02^d$	$4.18 \pm 0.06$	$0.46 \pm 0.02$	$4.20 \pm 0.06^d$	$6.2 \pm 0.4^a$

L\*: índice de luminosidad; a\* coordenada de color del eje verde-rojo; b\* coordenadas de color del eje azul-amarillo; C\*: saturación o intensidad del color percibido; h: tonalidad del color percibido. Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Por último se analizó el comportamiento reológico de cada uno de los zumos. En la [tabla 5.6](#) se presentan los resultados del análisis reológico de cada uno de las bebidas comerciales ajustadas por el modelo de Ostwald-de-Waele. En general, presentan un bajo índice de consistencia (k) y un valor del índice de comportamiento al flujo (n) entre 0.2 y 1.2. En la [figura 5.3](#) se puede observar que las bebidas Sabores del litoral, Biotta azul, Rabenhorst y Eden son los que presentan un comportamiento más newtoniano. Por otro lado, Grandiet, Confines del mundo y Alain Milliat presentan un comportamiento más bien pseudoplástico.

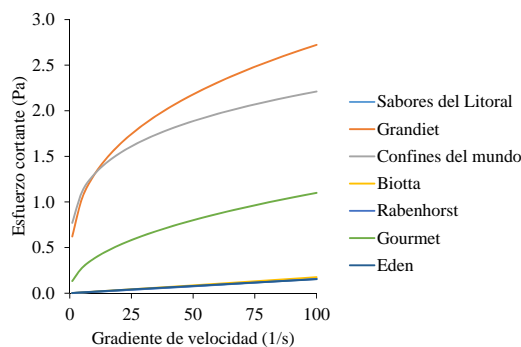
### 5.1.2 Propiedades funcionales de las bebidas comerciales.

Para cada uno de los zumos se analizó su contenido total en antocianinas monoméricas, el contenido de fenoles totales y la capacidad antirradical. Los resultados se presentan en la [tabla 5.7](#). El contenido de antocianinas totales resultó distinto para cada bebida. Los zumos comercializados en el mercado argentino son los que tienen el menor contenido de antocianinas, muy por debajo de los comercializados en España. En función de los fenoles totales también se encontraron grandes diferencias entre las bebidas argentinas y

**Tabla 5.6.** Propiedades reológicas de las bebidas comerciales.

Zumos	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n (adimensional)
Sabores de litoral	0.0013 ± 0.0003 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.05 <sup>e</sup>
Grandiet	0.62 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.320 ± 0.006 <sup>b</sup>
Confines del mundo	0.771 ± 0.113 <sup>d</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>a</sup>
Biotta azul	0.0015 ± 0.0002 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.03 <sup>e</sup>
Rabenhorst	0.00134 ± 0.00007 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.02 <sup>e</sup>
Alain Milliat	0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.04 <sup>c</sup>
Eden azul	0.0020 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.03 <sup>d</sup>

k y n: índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo respectivamente. Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 5.3.** Comportamiento reológico de las bebidas comerciales.

las comercializadas en España. En términos de la capacidad antirradical nuevamente los zumos argentinos son los que presentan valores más bajos.

Con la finalidad de valorar la contribución del contenido de antocianinas y fenoles a la capacidad antirradical de las bebidas comerciales se realizaron correlaciones entre las distintas propiedades funcionales evaluadas. En la [figura 5.4](#) se puede observar que se han encontrado correlaciones de tipo lineal entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antirradical, tanto por el método del ABTS ([figura 5.4a](#)) como por el método del DPPH ([figura 5.4b](#)). Correlaciones similares han sido encontradas entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antirradical por el método FRAP o ABTS por (Jimenez-Alvarez et al., 2008; Abdul L. Molan, De, & Meagher, 2009;



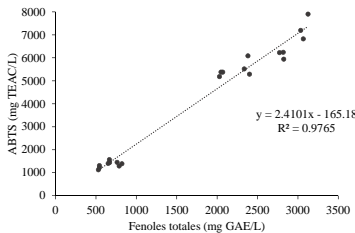
**Tabla 5.7.** Propiedades funcionales de las bebidas comerciales.

Bebidas comerciales	Antocianinas monoméricas	Fenoles totales	DPPH	ABTS
Sabores de litoral	6.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	789.8 ± 29.5 <sup>c</sup>	741.5 ± 16.8 <sup>a</sup>	1379.6 ± 82.3 <sup>a</sup>
Grandiet	10.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	661.76 ± 9.96 <sup>b</sup>	1072.9 ± 19.7 <sup>b</sup>	1474.9 ± 86.6 <sup>a</sup>
Confines del mundo	25.68 ± 0.15 <sup>a</sup>	537.88 ± 7.15 <sup>a</sup>	743.7 ± 14.4 <sup>a</sup>	1220.1 ± 93.3 <sup>a</sup>
Biotta azul	251.9 ± 2.7 <sup>c</sup>	2372.5 ± 33.5 <sup>e</sup>	1802.0 ± 13.5 <sup>d</sup>	5631.3 ± 408.9 <sup>b</sup>
Rabenhorst	472.9 ± 6.4 <sup>d</sup>	2805.1 ± 28.8 <sup>f</sup>	1833.7 ± 36.9 <sup>d</sup>	6137.4 ± 168.4 <sup>c</sup>
Alain Milliat	854.2 ± 15.8 <sup>e</sup>	2048.31 ± 20.15 <sup>d</sup>	1674.2 ± 23.4 <sup>c</sup>	5313.43 ± 112.14 <sup>b</sup>
Eden azul	212.6 ± 25.3 <sup>b</sup>	3075.6 ± 45.6 <sup>g</sup>	1996.9 ± 17.3 <sup>c</sup>	7308.72 ± 547.19 <sup>d</sup>

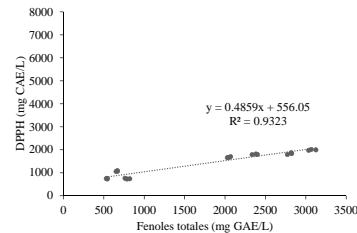
El contenido de antocianinas está expresado en mg cianidina-3-glucósido/L, fenoles totales en mg GAE/L, la capacidad antirradical por el método del DPPH en mg equivalentes de ácido ascórbico/L, la capacidad antirradical por el método del ABTS en mg trolox equivalentes/L. Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Sreeramulu & Raghunath, 2010; Stratil, Klejdus, & Kuban, 2006; Wootton-Beard, Moran, & Ryan, 2011)

(a) ABTS vs. Fenoles totales



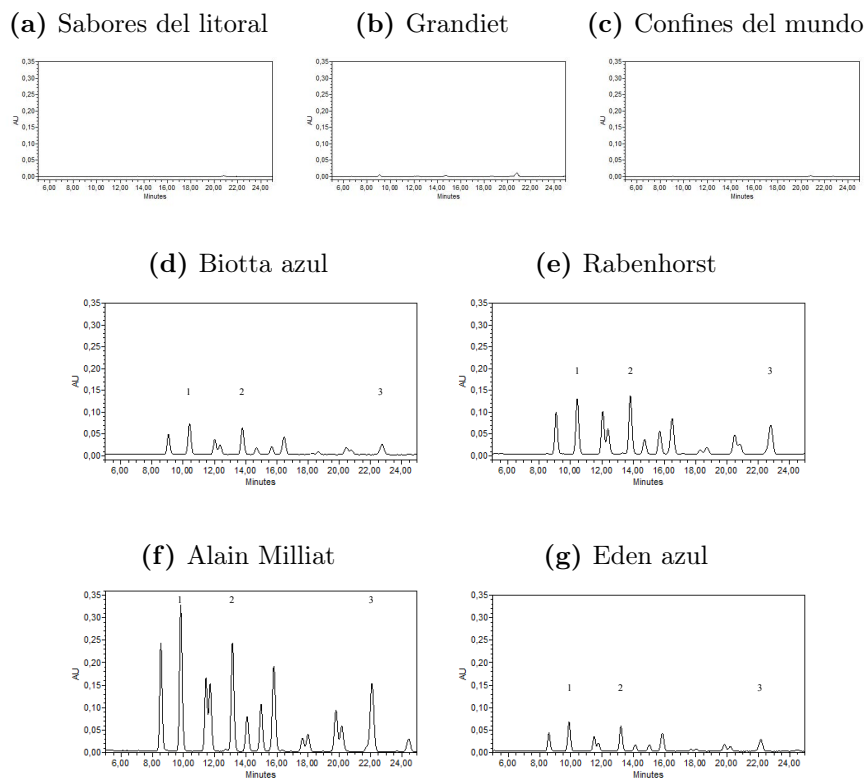
(b) DPPH vs. Fenoles

**Figura 5.4.** Correlaciones entre la capacidad antirradical y el contenido de fenoles totales en las bebidas comerciales.

### 5.1.3 Perfil de antocianinas analizadas por cromatografía líquida (HPLC).

Para completar el análisis de las bebidas comerciales se determinó el contenido de antocianinas por cromatografía líquida (HPLC). Para identificar y cuantificar las antocianinas se utilizaron tres estándares: cianidina, delphinidina y malvidina. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 r.p.m. y filtradas a 0.45 $\mu$ m. Se inyectaron directamente sin ningún otro tratamiento

previo o dilución. Los cromatogramas se analizaron a 520nm. Los resultados se presentan en la [figura 5.5](#). Como se puede apreciar, en los zumos argentinos no fue posible detectar antocianinas.



**Figura 5.5.** Perfil de antocianinas específicas obtenido en las bebidas comerciales.

#### 5.1.4 Conclusiones parciales.

Como se puede observar a partir del análisis de mercado, cada fabricante pone a la venta productos que tienen características muy distintas. Aunque las bebidas argentinas y europeas se distribuyan por las mismas vías de comercialización, como son las casas especializadas de dietética y herboristería, desde el envase elegido, etiquetado y presentación del producto se puede apreciar una calidad inferior en las bebidas argentinas. Todas las bebidas europeas tienen alguna alegación nutricional, bio o funcional, mientras que ninguna de las bebidas argentinas posee alegaciones relacionadas con las propiedades de los arándanos. Desde el punto de vista de las características fisicoquímicas no son apreciables las diferencias en calidad debido a que existe una gran variabilidad entre los valores de todos los análisis realizados. Esto indica que las bebidas comerciales con arándanos están poco estandarizadas, presentando una composición variable y en algunos casos no definida claramente. La falta de un hábito de consumo de este tipo de fruta y zumo hace que sea posible comercializar productos que, a veces, poseen una mínima proporción de arándanos o que nada tienen que ver con las características de un zumo de arándano recién preparado. Al evaluar las propiedades funcionales sí que se detectan las diferentes calidades. Aunque las bebidas argentinas poseen una actividad antirradical considerable, el contenido de antocianinas es muy bajo. Asimismo, el contenido de fenoles totales de las bebidas comercializadas en el mercado español es por lo menos tres veces mayor que las del mercado argentino. En la misma línea que los resultados anteriores, la capacidad antirradical de las bebidas españolas es dos veces superior en el caso del DPPH y cuatro a cinco veces superior en el caso del ABTS. Por último, el análisis por HPLC pone en evidencia que en realidad los zumos argentinos no contienen antocianinas, esto hace suponer procesos de elaboración deficientes en los que se somete al producto a condiciones de temperatura elevada y alta oxidación.

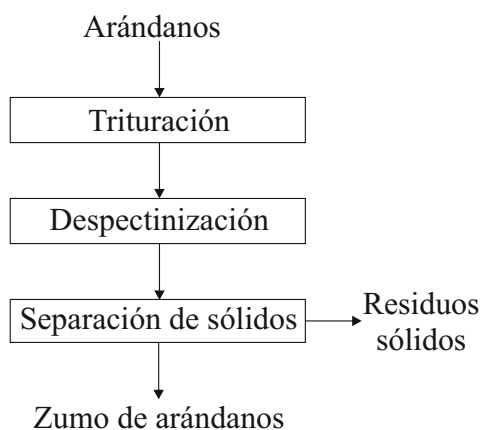
Por todo lo expuesto anteriormente, es necesario estudiar el proceso de obtención de zumo de arándano y evaluar las condiciones de procesado más favorables para preservar su alto contenido de antocianinas y obtener un producto final que represente lo mejor posible el zumo de arándano fresco. Para obtener un producto de mejor calidad, se debería estandarizar y mejorar el proceso de elaboración. Puesto que las antocianinas y fenoles presentes

en el zumo de arándano son los principales responsables de sus propiedades funcionales, se deben reducir los tratamientos térmicos utilizados durante el proceso y disminuir las etapas o tratamientos que impliquen contacto con el oxígeno. Además, para conservar el sabor original del arándano, se debería evitar la mezcla con otros tipos de zumos o infusiones. El envasado aséptico o en envases de vidrio tintado permitirían una mejor conservación de las propiedades funcionales durante la comercialización ya sea debido a una menor exposición a tratamientos térmicos de conservación o a una menor exposición a la luz.

## 5.2 Despectinización de zumo de arándanos.

A continuación se presentan los resultados del estudio realizado sobre una de las etapas críticas del proceso de elaboración de zumo de arándanos: la despectinización.

En la elaboración del zumo se siguió el diagrama de flujo que se presenta en la [figura 5.6](#).



**Figura 5.6.** Diagrama de flujo del proceso de elaboración del zumo de arándanos.

El triturado se realizó con un molino de tornillos. El tamaño de partícula inicial ha sido destacado por Landbo and Meyer (2004) como un factor de importancia ya que a menor tamaño se puede aumentar la extracción de antocianinas. En la despectinización enzimática se evaluó el efecto de distintos

packs enzimáticos comerciales y distintas condiciones de tiempo y temperatura de tratamiento (tabla 5.9) en el contenido de componentes funcionales y las propiedades reológicas del zumo. Adicionalmente se realizó un ensayo con enzimas provenientes de levaduras modificadas por evolución genómica por diseño molecular. A continuación de la etapa de despectinización, se realiza una separación de sólidos mediante un tamiz de 0.5mm para separar los sólidos de mayor tamaño y reducir el contenido de pulpa del zumo final.

### 5.2.1 Caracterización de la materia prima.

Los arándanos, de calidad industrial, recibidos desde Concordia, provincia de Entre Ríos (Argentina), fueron caracterizados fisicoquímicamente y funcionalmente antes de su almacenamiento en congelación. Las características de la materia prima se presentan en la tabla 5.8.

**Tabla 5.8.** Propiedades fisicoquímicas de los arándanos utilizados como materia prima.

Sólidos solubles	$13.8 \pm 2.3$
pH	$3.44 \pm 0.06$
Acidez	$0.50 \pm 0.09$
Antocianinas monoméricas	$141.0 \pm 37.3$
Fenoles totales	$320.2 \pm 58.4$

Sólidos solubles están expresados en °Brix; acidez en gramos de ácido cítrico/100g peso fresco; antocianinas monoméricas totales en mg cianidin-3-glucósido/100g peso fresco; fenoles totales en miligramos de GAE/100g peso fresco.

### 5.2.2 Despectinización enzimática con packs comerciales.

La etapa de despectinización enzimática es de fundamental importancia tanto desde el punto de vista tecnológico como funcional. Las propiedades reológicas resultantes y el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos determinarán la calidad del zumo obtenido. Por estas razones, se plantearon una serie de experimentos en torno a esta etapa del proceso. En primer lugar se realizaron ensayos para identificar posibles condiciones de tratamiento. En estos ensayos previos se evaluaron temperaturas de 40, 50 y 60°C tomando muestras cada 15 min hasta alcanzar los 150 minutos de tratamiento

enzimático (resultados no presentados). Teniendo en cuenta estos ensayos previos se realizó un diseño experimental, seleccionando dos niveles para cada uno de los factores. Se planteó un diseño factorial ( $2^3$ ) tipo screening con dos réplicas. Los factores evaluados y los niveles seleccionados se presentan en la [tabla 5.9](#).

**Tabla 5.9.** Factores del diseño experimental propuesto para el análisis de la operación de despectinización

Nombre	Unidades	Tipo	Papel	Bajo	Alto	Niveles
A:Enzima		Catagórico	Controlable			Viscozyme L Rapidase ex color
B:Tiempo	min	Continuo	Controlable	60	150	
C:Temperatura	°C	Continuo	Controlable	50	60	

Como variables respuesta se seleccionaron tres grupos de determinaciones:

- Variables relacionadas con la calidad funcional:
  - Índices de contenido de componentes funcionales de interés: Antocianinas monoméricas totales y Fenoles totales.
  - Índice de degradación: Índice de color polimérico.
- Variable respuesta relacionada con la calidad tecnológica: índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo (propiedades reológicas del zumo)
- Variable respuesta relacionada con la apreciación por el consumidor: Luminosidad ( $L^*$ ), saturación ( $C^*$ ) y tonalidad (h) del color del zumo.

Los resultados experimentales se analizaron mediante un análisis ANOVA multifactorial con un nivel del 95% de confianza para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre cada una de las variables respuesta.

Los packs enzimáticos comerciales utilizados fueron:

- *Viscozyme*<sup>®</sup> L (Novozymes Corp.) es un complejo multi-enzimático de *Aspergillus aculeatus* que degrada las paredes celulares. Contiene

$\beta$ -glucanasas (endo-1,3(4)-) y actividades celulasas, hemicelulasas, y xilanasas. Su temperatura óptima está comprendida entre 50-60°C y

- *Rapidase*<sup>®</sup> ex color (Gist-brocades-Beverages Ingredients Group) que contiene pectinasas y hemicelulasas. Su temperatura óptima está entre 10-50°C.

El tratamiento de despectinización con ambos packs enzimáticos permite obtener rendimientos en zumo clarificado del orden del 55 % para los tratamientos enzimáticos realizados a 50°C y del orden del 35 % para los tratamientos realizados a 60°C. Un rendimiento similar ha sido observado por Kader, Irmouli, Nicolas, and Metche (2002).

En la [tabla 5.10](#) se presentan los valores de las variables respuestas relacionadas con la calidad funcional del zumo de arándano para cada uno de los niveles y factores ensayados. El análisis estadístico revela que los tres factores evaluados (enzima, temperatura y tiempo) influyen significativamente sobre el contenido de antocianinas del zumo de arándanos despectinizado. Además existen interacciones estadísticamente significativas entre los factores enzima-temperatura y temperatura-tiempo.

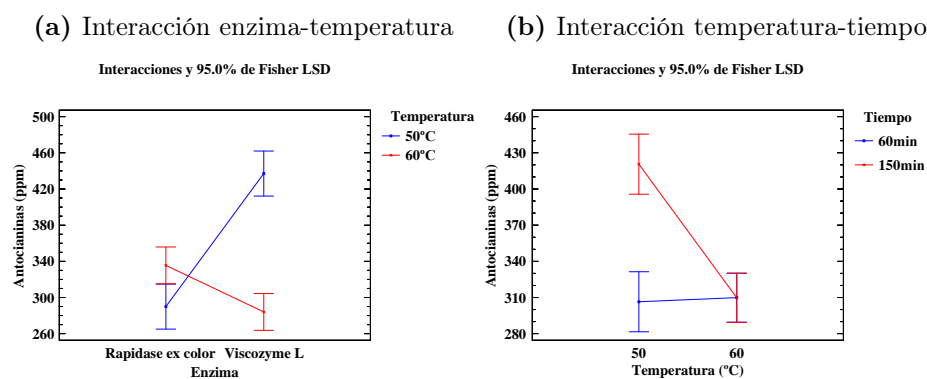
**Tabla 5.10.** Propiedades funcionales del zumo de arándano despectinizado con los diferentes packs enzimáticos comerciales en las diferentes condiciones estudiadas.

Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Antocianinas monoméricas (ppm)	Fenoles totales (ppm)	Color polimérico (%)	
Viscozyme L	50	60	348.7 ± 88.3	2488.3 ± 56.2	22.13 ± 3.13	
		150	525.5 ± 48.6	2894 ± 107	24.3 ± 1.7	
	60	60	290.4 ± 106.8	1848.5 ± 73.8	16.79 ± 1.08	
Rapidase ex color	50	150	277.65 ± 48.18	1890.7 ± 64.3	34.6 ± 3.7	
		60	60	264.26 ± 19.08	1632.9 ± 183.6	46.1 ± 6.2
	60	150	290.93 ± 42.15	2105.9 ± 132.5	43.333 ± 12.096	
		60	60	329 ± 43	1921.0 ± 190.2	23.3 ± 5.5
		150	341.8 ± 38.3	2068.8 ± 175.3	33.7 ± 6.4	

El contenido de antocianinas está expresado en mg cianidina-3-glucósido/L, fenoles totales en mg GAE/L, el índice de color polimérico en porcentaje.

La prueba de rangos múltiples indica, mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) que la enzima Viscozyme L, la temperatura de 50°C y el tiempo de 150min permiten obtener un zumo de arándanos con un mayor contenido de antocianinas monoméricas totales.

En la [figura 5.7](#) se presentan los gráficos de interacciones estadísticamente significativas. En la [figura 5.7a](#) se puede observar que la correcta elección del enzima y la temperatura permiten obtener un zumo con mayor contenido de antocianinas como es el caso de la enzima Viscozyme L y la temperatura de tratamiento de 50°C, ya que si se eligen cualquier otro par de condiciones las diferencias no existen o son muy pequeñas. En el caso de la interacción temperatura-tiempo, ocurre lo mismo, es decir sólo un tiempo de 150min junto con la temperatura de 50°C permite obtener una diferencia significativa en el contenido de antocianinas.

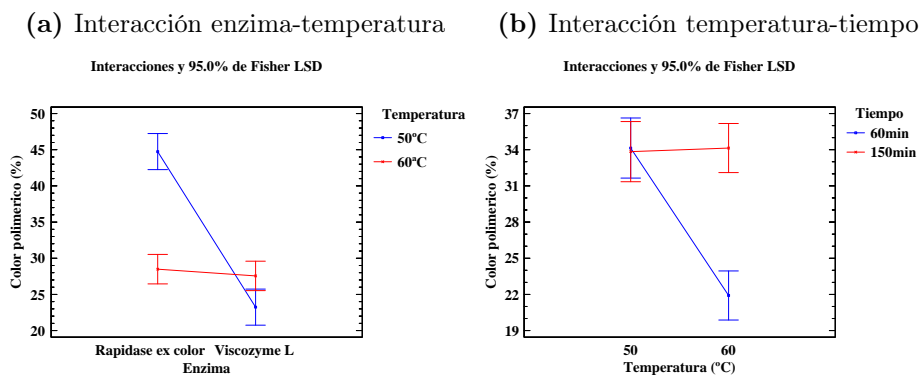


**Figura 5.7.** Gráficos de interacciones estadísticamente significativas para las antocianinas monoméricas totales.

En términos de contenido de fenoles totales, los resultados estadísticos coinciden con los obtenidos para las antocianinas.

Por último, el análisis estadístico de la variable respuesta índice de color polimérico revela que existen diferencias significativas entre los tres factores principales estudiados y que además, al igual que en el caso de las antocianinas y los fenoles, existen interacciones significativas entre los factores enzima-tiempo y temperatura-tiempo ([figura 5.8](#)). Los valores del índice de color polimérico indican que la temperatura de 60°C y un tiempo de 60 minutos permiten obtener un zumo con una menor proporción de antocianinas poliméricas. Esto se puede deber a una menor actividad de las enzimas endógenas presentes en los arándanos, responsables de la degradación y polimerización de antocianinas (Kader, Rovel, Girardin, & Metche,





**Figura 5.8.** Gráficos de interacciones estadísticamente significativas para el índice de color polimérico.

1997), puesto que la temperatura del zumo está más alejada del óptimo de estas enzimas endógenas y el tiempo de exposición es más corto. En el caso de la interacción enzima-temperatura, la combinación Viscozyme L-50°C reduce la proporción de color polimérico hasta el nivel más bajo. Los mejores resultados relacionados con el pack enzimático utilizado, pueden ser debido a un menor contenido de actividades enzimáticas residuales.

El índice de color polimérico suele ser menor al 10% en frutas y vegetales frescos (Türkyilmaz, Yemiş, & Ozkan, 2012). Sin embargo, una vez obtenido el zumo de frutas y vegetales, el valor se incrementa como resultado de la formación de complejos antocianinas-taninos así como también por la actividad de peroxidases y polifenoloxidasas (Hager, Howard, Prior, & Brownmiller, 2008). De hecho, Türkyilmaz et al. (2012) observaron que después de realizar el prensado, el zumo de arándanos sin clarificar presentaba un 19% de color polimérico. Este resultado, lo atribuyeron a actividades enzimáticas endógenas ya que en presencia de peróxido de hidrógeno y polifenoles, las peroxidases rápidamente oxidan las antocianinas produciendo pardeamiento enzimático (Hager et al., 2008). En la etapa de despectinización, Türkyilmaz et al. (2012) observaron un incremento significativo del porcentaje de color polimérico, alcanzando valores del orden del 21%, este incremento lo atribuyeron a la liberación de polifenoles y polifenoloxida-

sas que se encontraban dentro de las células vegetales, pero también puede deberse a actividades enzimáticas secundarias del pack enzimático utilizado.

**Tabla 5.11.** Propiedades reológicas del zumo de arándano despectinizado con los diferentes packs enzimáticos comerciales en las diferentes condiciones estudiadas.

Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n (adimensional)
Viscozyme L	50	60	0.0014 ± 0.0008	0.94 ± 0.14
		150	0.002 ± 0.0003	1.0 ± 0.5
	60	60	0.0010 ± 0.0004	1.02 ± 0.09
		150	0.00209 ± 0.00114	0.88 ± 0.12
Rapidase ex color	50	60	0.007 ± 0.002	0.69 ± 0.05
		150	0.009 ± 0.009	0.7 ± 0.2
	60	60	0.008 ± 0.003	0.67 ± 0.04
		150	0.0071 ± 0.0005	0.7034 ± 0.0114

k y n: índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo respectivamente.

Los resultados relacionados con las propiedades reológicas de los zumos de arándanos obtenidos en las distintas condiciones se presentan en la [tabla 5.11](#). El análisis ANOVA multifactorial para el índice de consistencia indica que existen diferencias significativas entre el pack enzimático utilizado. El pack Viscozyme L permite una mayor reducción del índice de consistencia. En este caso no se encontraron interacciones estadísticamente significativas entre los factores estudiados. Para la variable índice de comportamiento al flujo, nuevamente, el pack enzimático tiene efectos significativos, y los zumos obtenidos con este complejo comercial tienen un comportamiento más newtoniano. En cambio, los zumos obtenidos con Rapidase ex color tienen un comportamiento ligeramente más pseudoplástico.

Por último, en el análisis de los atributos del color, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la luminosidad. En cambio, la temperatura tiene un efecto significativo en la saturación del color, produciendo valores más elevados de saturación cuando la temperatura del tratamiento es de 50°C. Por último, para la tonalidad se encontró que la temperatura y el tiempo tienen efectos significativos. La temperatura de 60°C aumenta el ángulo de la tonalidad hacia el color rojo. El tiempo de 150 minutos tiende a disminuir el ángulo de la tonalidad hacia los colores morados. Según Waterhouse (2002), estos resultados pueden estar relacionados con la copigmentación que sufren las antocianinas durante el procesado. Uno de los

efectos que ocurren es un cambio hiperacrómico es decir, un incremento en la intensidad del color y el otro efecto es un desplazamiento batocrómico, es decir un cambio hacia longitudes de onda de mayor absorción. En la [tabla 5.12](#) se presentan los resultados del análisis del color instrumental para los distintos zumos.

**Tabla 5.12.** Color del zumo de arándano despectinizado con los diferentes packs enzimáticos comerciales en las diferentes condiciones estudiadas.

Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	L*	a*	b*	C*	h	
Viscozyme L	50	60	2.4 ± 0.6	6.6 ± 0.9	0.45 ± 0.18	6.6 ± 0.9	3.8 ± 1.2	
		150	3.55 ± 0.14	8.9 ± 2.5	0.3 ± 0.2	8.9 ± 2.5	2.1 ± 1.3	
	60	60	2.89 ± 0.07	4.0 ± 0.3	1.8 ± 0.4	4.38 ± 0.15	24.846 ± 6.114	
Rapidase ex color	50	150	3.7 ± 0.9	6.6 ± 0.2	2.7 ± 0.2	7.15 ± 0.13	22.2 ± 2.6	
		60	4.5 ± 0.6	9.1 ± 0.5	-0.1 ± 0.3	9.1 ± 0.5	-0.41 ± 1.96	
	60	150	3.1 ± 0.2	7.12 ± 0.14	-0.3 ± 0.3	7.13 ± 0.14	-2.5 ± 2.4	
		60	2.8 ± 0.8	3.7 ± 1.6	2.594 ± 0.095	4.6 ± 1.4	36.5 ± 11.3	
		150	60	2.9 ± 0.3	4.2 ± 1.6	2.2 ± 0.6	4.71 ± 1.71	28.74 ± 3.04
			150					

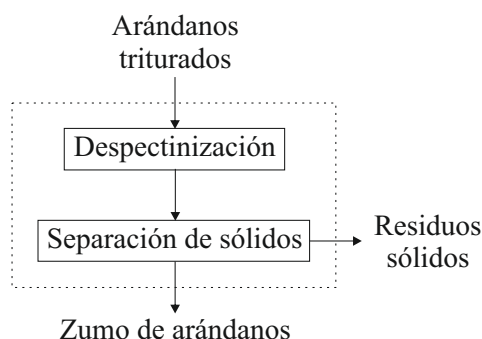
L\*: índice de luminosidad; a\* coordenada de color del eje verde-rojo; b\* coordenadas de color del eje azul-amarillo; C\*: saturación o intensidad del color percibido; h: tonalidad del color percibido.

Landbo et al. (2007) obtuvieron resultados similares en las condiciones del tratamiento enzimático de bayas de saúco, en efecto, mediante un análisis de regresión múltiple proponen que un aumento del tiempo de maceración, un aumento de la temperatura y un aumento de la dosis de enzima aumentan el rendimiento en zumo dentro de los límites de las condiciones analizadas (10-50 minutos; 32-60°C; 0.02–0.34 mL preparación enzimática/100g de triturado). En cuanto a la extracción de antocianinas y fenoles, la extracción de fenoles se incrementó con el aumento de temperatura, pero el incremento en las dosis del complejo enzimático sólo afectó el rendimiento de antocianinas, mientras que el tiempo de maceración no tuvo efecto sobre las antocianinas o fenoles totales.

### 5.2.3 Pérdida de componentes activos como consecuencia de las operaciones de despectinización y separación de sólidos.

A continuación de la etapa de despectinización se realizó una separación de sólidos mediante un tamiz. Para cuantificar el contenido de antocianinas en cada fracción, se plantea un balance de materia para la etapa despectinización-separación de sólidos como se puede apreciar en la [figu-](#)

ra 5.9. Como corriente de entrada se identifica el arándano triturado y como corrientes de salida se obtiene el zumo despectinizado y los residuos sólidos. En la tabla 5.13 se presentan los resultados obtenidos del balance de materia para la despectinización del zumo de arándanos con el pack Viscozyme L a 50°C durante 150 minutos.



**Figura 5.9.** Diagrama de flujo del proceso de obtención de zumo de arándano.

**Tabla 5.13.** Contenido de antocianinas totales, fenoles totales y color polimérico del arándano fresco, l zumo obtenido y los residuos sólidos resultantes después de la despectinización a 50°C con el pack Viscozyme L durante 150 minutos y posterior separación de sólidos.

	Antocianinas monoméricas (mg/100g fruta)	Color polimérico (%)	Fenoles totales (mg GAE/100g fruta)
Arándano	123.6 ± 8.6	-	394.903 ± 5.104
Zumo	24 ± 6	24.3 ± 2.2	132.77 ± 11.12
Residuos	38.6 ± 5.6	45.8 ± 0.8	241.6 ± 11.7

El balance de materia planteado indica que alrededor de un 24% de antocianinas monoméricas permanecen en el zumo despectinizado y filtrado por un tamiz de 0.5mm, en tanto que otro 30% de antocianinas están retenidas en los residuos sólidos. Mediante estas determinaciones no se consigue explicar el 46% restante de antocianinas. Probablemente ocurran reacciones de degradación y polimerización que modifiquen las formas químicas de estos compuestos. El contenido de antocianinas poliméricas de la fruta fresca es del orden del 1% (Brownmiller et al., 2008). Sin embargo, el procedimiento necesario para determinar el color polimérico en muestras sólidas (fruta y residuos) provoca reacciones de polimerización que generan un índice de color polimérico mínimo del 20% en la fruta. Considerando esto, el índice de

color polimérico real de los residuos sólidos sería del orden del 25 %, lo que concuerda con el índice determinado en el zumo. Ahora bien, si a la suma de los índices de color polimérico determinados en el zumo y los residuos se le resta la polimerización base debido al procedimiento experimental, el resultado, alrededor del 50 %, permitiría explicar el 46 % de las antocianinas que no fueron cuantificadas por el balance de antocianinas monoméricas. En cuanto a fenoles totales, el balance de materia consigue explicar un 96 % de contenido inicial en fenoles. Se observa una partición de los mismos, un 36 % en el zumo y un 60 % en los residuos sólidos, el 4 % restante puede haber sufrido reacciones de degradación. Brownmiller et al. (2008) analizaron las pérdidas de antocianinas a lo largo del procesado de zumo de arándanos. En sus resultados observaron que un 15 % de la concentración original de antocianinas se perdió en la torta de prensado, que un 25 % más fue eliminado con los sólidos separados durante el proceso de clarificación. Otros investigadores informaron pérdidas del 18 % (Skrede et al., 2000; Hager et al., 2008) y 42-55 % (J. Lee et al., 2002) de antocianinas en la torta de prensado. Por último Skrede et al. (2000), J. Lee et al. (2002), Srivastava et al. (2007), Hager et al. (2008) informaron retenciones del orden del 22-34 % de antocianinas en zumos no clarificados. Las distintas condiciones de tratamiento, el número de etapas, la temperatura y la duración del tratamiento térmico pueden ser la causa de los distintos resultados obtenidos. Los resultados obtenidos en nuestro caso se encuentran dentro de los valores obtenidos con anterioridad mediante otros procedimientos.

#### **5.2.4 Despectinización enzimática con levaduras con alta actividad endopoligalacturonasa.**

En colaboración con el laboratorio de Biología molecular del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo se planteó la utilización de enzimas provenientes de un cultivo de levaduras modificadas por medio de la técnica de evolución genómica por diseño molecular en las cuales se ha conseguido sobreexpresar el gen *PGU1* que codifica para una endopoligalacturonasa. Las ventajas de utilizar enzimas de esta fuente son, que las levaduras producen enzimas pectinolíticas específicas y que podrían ser utilizadas a temperatura ambiente, lo que podría aumentar el contenido de componentes funcionales del zumo y mejorar sus propiedades sensoriales.

Las cepas de levaduras utilizadas provienen de la Colección Española de Cultivos Tipo y corresponden a la cepa número 1926 y tres de sus variantes obtenidas por medio de la técnica de evolución genómica por diseño molecular por Sani (2013).

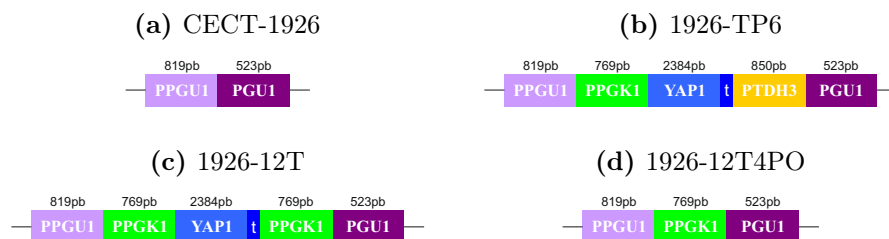
Las características de cada una de las cepas son:

- CECT 1926: Levadura industrial *Saccharomyces bayanus*, Saccardo (1895), aislada de Coca-Cola contaminada. Cepa original.
- 1926-TP6: Cepa 1926 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen *YAP1* y donde se ha sustituido una copia del promotor del gen *PGU1* por el promotor del gen *TDH3*.
- 1926-12T: Cepa 1926 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen *YAP1* y donde se ha sustituido una copia del promotor del gen *PGU1* por el promotor del gen *PGK1*.
- 1926-12T4PO: Cepa 1926-12T que ha sufrido la eliminación del marcador dominante de selección *YAP1*.

La modificación genética que permitió aumentar la productividad de la enzima con actividad endopoligalacturonasa, se llevó a cabo sólo mediante reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando como ADN base para la construcción del fragmento utilizado para la evolución, el propio ADN genómico de la cepa. El fragmento que se introdujo en la cepa original contiene el gen *YAP1* que codifica para un factor de transcripción de la familia AP-1, responsable de la adaptación de la levadura a diversas condiciones de estrés (Moye-Rowley et al., 1989; Kuge et al., 1997). De esta manera, las cepas en las cuales la inserción del fragmento ha sido exitosa se pueden seleccionar mediante la adición al medio de cultivo de compuestos tóxicos tales como la cicloheximida y la cerulenina.

El promotor del gen de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (*PTDH3*) y el promotor del gen *PGK1*, son dos promotores fuertes de la ruta de la glicólisis que activan fuertemente la transcripción del factor de selección

(gen *YAP1*) y del gen *PGU1* durante el crecimiento de la levadura por fermentación, sobreexpresando así ambos genes. Cada una de las secuencias resultantes de las modificaciones genéticas realizadas en la zona del gen *PGU1* se presentan en la [figura 5.10](#).



**Figura 5.10.** Secuencias de los transformantes obtenidos a partir de la cepa CECT-1926 por Sani (2013).

En cuanto a las condiciones de crecimiento de las levaduras, en todos los casos, los cultivos se incubaron a 30°C. Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un agitador orbital “C25 Incubator Shaker” (New Brunswick Scientific, EE. UU.). Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

- Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose): este es un medio de uso rutinario que aporta todos los nutrientes necesarios para que la levadura crezca.
- Medio definido con ácido poligalacturónico 2% (p/v) (YPA) (Sani, 2013): Este medio se utilizó para la determinación en placa de la actividad endopoligalacturonasa de cepas de levaduras industriales.
- Medio básico YNB + ácido poligalacturónico: Este es un medio mínimo que contiene YNB (Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos, glucosa, sulfato amónico y ácido poligalacturónico (Sani, 2013).

En primer lugar fue necesario determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad endopoligalacturonasa de las cepas de levaduras disponibles, para luego aplicar el extracto proveniente de la levadura con mayor actividad endopoligalacturonasa en la despectinización de un triturado de arándanos.

Para determinar cualitativamente la actividad endopoligalacturonasa de las levaduras estudiadas, las cepas se incubaron en 2mL de medio YPD líquido durante 48 horas a 30°C y 200 r.p.m. Se comprobó mediante lectura de la absorbancia a 600nm de diluciones 1:100 de los cultivos, que el crecimiento fuese el mismo en todas las cepas. Se realizó una dilución decimal seriada de los cultivos líquidos de las cepas de interés, y se transfirieron aproximadamente 3 $\mu$ L de cada dilución con la ayuda de un replicador (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) a placas de medio sólido YPA. Las placas se incubaron durante 2 días a 30°C. La producción de la enzima endopoligalacturonasa se detectó vertiendo HCl 6 N sobre la placa, según lo descrito por (Blanco, Sieiro, Diaz, & Villa, 1994). Cuando la cepa es productora de dicha enzima, aparece un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, fácilmente reconocible frente al medio opaco, cuyo tamaño está relacionado con la actividad PG.

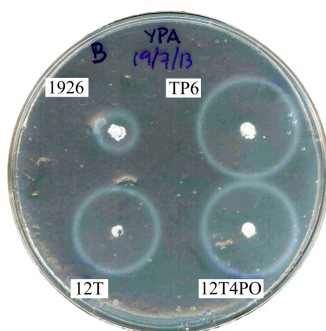
El principio de las determinaciones cuantitativas de la actividad endopoligalacturonasa es la cuantificación de la concentración de azúcares reductores. Las endopoligalacturonasas actúan hidrolizando enlaces  $\alpha$ 1-4-glicosídicos en el interior del polímero de ácido poligalacturónico (pectina), generando cadenas más cortas y liberando extremos reductores. En función de la revisión bibliográfica realizada, se seleccionaron dos métodos de determinación de azúcares reductores: el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Wood et al., 2012) y el método del bicinconinato de cobre (BCA) (McIntyre, Mukerjee, & Robyt, 2013). El método del DNS consiste en la reacción del reactivo de DNS compuesto por 10 g/L ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $C_7H_4N_2O_7$ ), 30 g/L tartrato de sodio y potasio ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ) y 16 g/L hidróxido de sodio (NaOH) con la muestra a analizar. Las condiciones de tiempo y temperatura de reacción fueron evaluadas para conseguir una reacción total y estable. El volumen de reacción fue de 1mL y la relación muestra:reactivo se estableció en 1:20 según lo propuesto por Wood et al. (2012). Se ensayaron temperaturas de reacción de 90 y 99°C; y tiempos de reacción de 2, 3, 4 y 5 minutos. La absorbancia se midió a 540 y 580nm. Las curvas de calibrado se construyeron entre 250 y 1250 $\mu$ g de ácido galacturónico. Por otro lado, el método del BCA consiste en la reacción del reactivo de BCA que se obtiene al mezclar en una relación 1:1 una solución A compuesta por 54.28 g/L (512mM) carbonato de sodio  $Na_2CO_3$ , 24.2 g/L (288mM) de bicarbonato de sodio  $NaHCO_3$  y 1.942 g/L (5mM) 2,2'-bicinconinato de



sodio ( $C_{20}H_{10}N_2Na_2O_4 \cdot xH_2O$ ). La solución B fue preparada disolviendo 1.248 g/L (5mM) sulfato de cobre pentahidratado  $CuSO \cdot 5H_2O$  y 1.262 g/L (12mM) de L-serina. Ambas soluciones se conservan en oscuridad y refrigeradas. El volumen de reacción se mantuvo en 1mL y la proporción reactivo-muestra fue 1:1. Las condiciones de reacción fueron 30 minutos a 80°C. Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron a 560nm.

### 5.2.5 Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa.

En la [figura 5.11](#) se pueden observar los halos de inhibición que generan cada una de las cepas. Se observa un notable incremento de la actividad endopoligalacturonasa en las cepas transformantes.



**Figura 5.11.** Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa de las distintas cepas de levadura.

En la [tabla 5.14](#) se presentan las áreas de cada halo de inhibición. Se puede observar como efectivamente, los transformantes poseen una actividad endopoligalacturonasa unas 5 veces mayor que la cepa original.

### 5.2.6 Métodos para determinar la actividad enzimática.

Para poder determinar de manera cuantitativa la actividad enzimática de los extractos provenientes de los cultivos de las distintas cepas de levaduras fue necesario poner a punto los métodos de determinación de azúcares reductores. Para realizar las determinaciones se utilizaron volúmenes pe-

**Tabla 5.14.** Área del halo de inhibición resultante de la actividad endopoligalacturonasa para las distintas cepas de levadura.

Cepas	Halo de inhibición (mm <sup>2</sup> )
1926	105.1 ± 1.9
1926-TP6	628.9 ± 41.9
1926-12T	517.2 ± 69.9
1926-12T4PO	524.7 ± 63.1

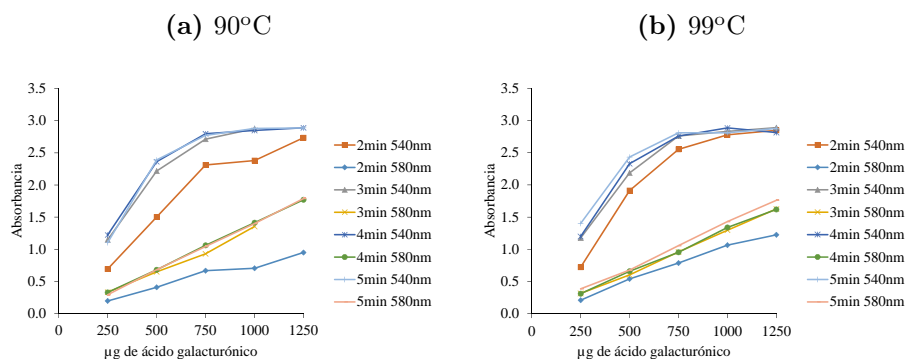
queños de reacción que se colocaron en tubos de base cónica eppendorf de 1.5mL. El calentamiento se realizó en cabezales de calefacción Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

### *Método del DNS.*

En primer lugar, se decidió ensayar el método del DNS, por ser un método más rápido de determinación aunque de menor sensibilidad. En relación al ajuste del tiempo y temperatura de reacción, en las [figura 5.12a](#) y [figura 5.12b](#) se observa que al aumentar el tiempo de reacción y la temperatura, mejora la determinación analítica ya que se observa una reacción más completa y un aumento de la linealidad. En cuanto a la longitud de onda utilizada para medir la absorbancia se observó que a 540nm se obtiene mayor sensibilidad, pero mayor saturación de la señal y a 580nm se obtiene una mejor linealidad pero menor sensibilidad, estos resultados están en concordancia con lo observado por Wood et al. (2012).

Las curvas a 580nm fueron linealizadas y comparando las pendientes y los valores  $R^2$  se seleccionó la combinación temperatura-tiempo de 99°C-5min de reacción. Teniendo en cuenta que cuando se utiliza el Thermomixer lleno se produce un descenso en la temperatura en el momento de colocar los tubos eppendorf con la mezcla de reacción, se decidió extender el tiempo de reacción dos minutos más. En conclusión, se adoptó el tiempo de reacción de 7 minutos y temperatura de 99°C.

Teniendo en cuenta que el ácido poligalacturónico es el polímero patrón que se utilizará para la determinación de la actividad enzimática de los



**Figura 5.12.** Ajuste del método del DNS.

extractos del medio de crecimiento de las levaduras, se construyeron curvas de calibrado sin y con la adición de este patrón, en una concentración del 1.25 % en tampón acetato, para evaluar si aportaba ruido de fondo en la determinación de azúcares reductores.

En la [tabla 5.15](#) se presentan las linealizaciones de las curvas de calibrado obtenidas sin y con la adición de ácido poligalacturónico. Como se puede observar, el ajuste es muy bueno, con un  $R^2$  de 0.99 y las pendientes son similares, por lo cual el patrón para las determinaciones de actividad enzimática no aporta un ruido de fondo significativo.

**Tabla 5.15.** Curvas de calibrado sin y con adición de ácido poligalacturónico.

Curva de calibrado	Linealización	Ajuste
Sin PoliG.	$y = 0,0014x - 0,105$	$R^2 = 0.9908$
Con PoliG.	$y = 0,0012x + 0,0039$	$R^2 = 0.9989$

A continuación se realizó un ensayo del procedimiento para determinar la actividad enzimática. Para esto se preparó un cóctel que contenía  $250\mu\text{L}$  de una solución de ácido poligalacturónico al 2 %,  $200\mu\text{L}$  de tampón acético/acetato  $250\text{mM}$  y  $50\mu\text{L}$  de muestra correspondiente a un extracto de medio YPD donde se había hecho crecer la cepa de levadura TP6. La muestra se preparó centrifugando una alícuota del medio y tomando el correspondiente volumen del sobrenadante. La reacción enzimática se realizó a  $45^\circ\text{C}$

en Thermomixer; las muestras se tomaron cada 10 minutos. La reacción enzimática se detuvo por cambio de temperatura (0°C, hielo) y cambio de pH (reactivo de DNS). Se preparó un blanco con la muestra tratada térmicamente durante 10 minutos a 99°C (para desnaturalizar las enzimas).

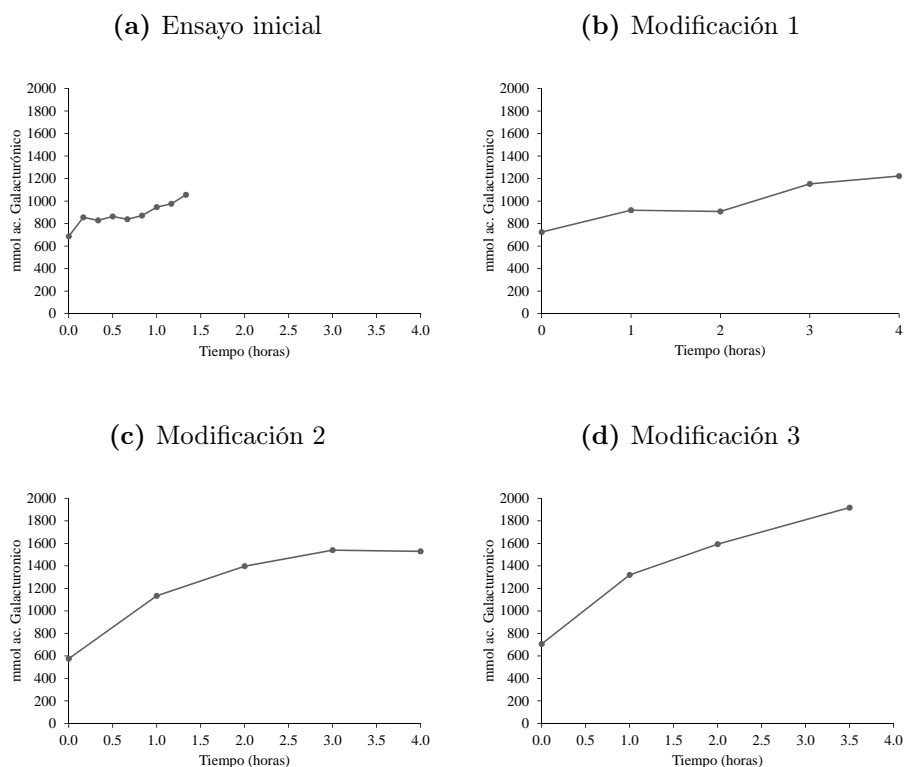
Los resultados obtenidos no definieron ninguna recta, ni a 540 ni a 580nm. Teniendo en cuenta esto, se decidió introducir una serie de modificaciones en las condiciones de la determinación enzimática con el fin de mejorar la respuesta. Las modificaciones se fueron ensayando en el siguiente orden:

1. Se decidió medir cada 1 hora la actividad y utilizar sobrenadante proveniente de un cultivo con medio YNB y ácido poligalacturónico: no se consiguieron mejorar los resultados.
2. Se modificaron las cantidades de tampón y muestra. Se utilizaron 150 $\mu$ L de tampón acético/acetato 250mM y 100 $\mu$ L de muestra: se observó una mejora en los resultados.
3. Se decidió determinar la actividad enzimática de un pack enzimático comercial (Rapidase ex color) proveniente de *Aspergillus niger*.

En las figuras [figura 5.13a](#), [figura 5.13b](#), [figura 5.13c](#), [figura 5.13d](#), se puede observar cómo los cambios introducidos de forma secuencial permitieron mejorar la determinación enzimática. Sin embargo se propuso que los problemas encontrados se deben a que la sensibilidad del método del DNS no es la suficiente como para determinar la actividad enzimática de los extractos por lo que se decidió comparar la utilidad del método del DNS con la del BCA y decidir acerca de la técnica más idónea.

### ***Método del BCA.***

Al igual que en el método del DNS, se construyeron curvas de calibrado para validar el método del BCA. Al ser éste un método 100 veces más sensible (McIntyre et al., 2013) las curvas de calibrado se construyeron en un rango de 0.5 a 7.5  $\mu$ g de ácido galacturónico. A continuación, se comprobó que el fondo del ácido poligalacturónico no interfiriera en la determinación de la actividad enzimática. Por último se realizó la determinación de la actividad

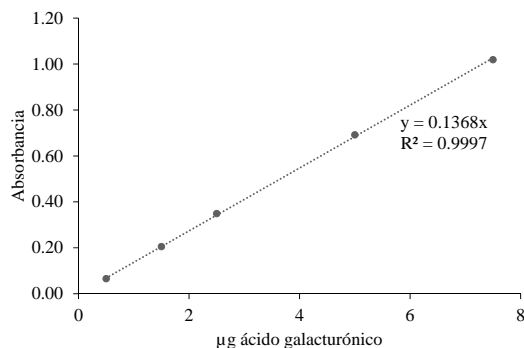


**Figura 5.13.** Determinación de la actividad enzimática a 540nm.

enzimática de extractos de las levaduras cultivadas y del pack enzimático comercial.

La curva de calibrado utilizada en la determinación de la actividad enzimática se presenta en la [figura 5.14](#)

Debido a la elevada sensibilidad del método, no fue posible determinar la actividad enzimática en el extracto proveniente del cultivo de levaduras ya que el contenido de azúcares reductores del extracto enzimático es considerable. Como solución, se planteó la purificación del extracto por filtración en gel, de esta manera se podrían eliminar los azúcares reductores presentes en el medio de cultivo.

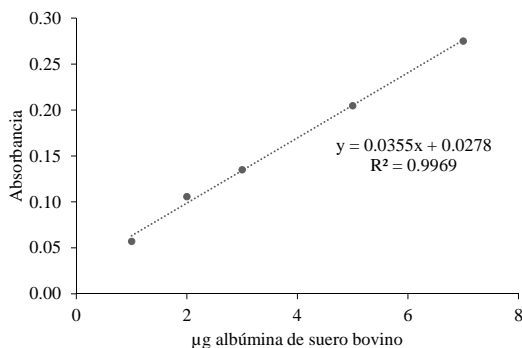


**Figura 5.14.** Curva de calibrado para la cuantificación de azúcares reductores.

La filtración en gel se realizó en columnas de 1mL rellenas con Sephadex<sup>®</sup> G-25 fino (Sigma-Aldrich Co. LLC.), que se hidrató con agua 1 hora a 90°C. Las columnas se equilibraron pasando 4 volúmenes de tampón acetato 62.5mM. Las columnas empaquetadas se centrifugaron a 1500G en una centrífuga de rotor oscilante (Mixtasel-BL, JP Selecta S. A., España) para que la muestra atravesara la columna en dirección paralela al eje vertical de la jeringa. El volumen de muestra a filtrar fue de 100µL.

Teniendo en cuenta que el proceso de filtrado en gel también puede retener proteínas fue necesario cuantificar el contenido de proteínas en las muestras antes y después de ser filtradas. La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método Bradford. Para ello, se hizo reaccionar 1mL de muestra (previamente diluida 1:100) con 1mL de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich Co. LLC.). La absorbancia se midió a 595nm. La concentración de proteína se calculó a partir de una curva patrón de BSA (albúmina de suero bovino) de 1-7 µg. Esta curva se presenta en la [figura 5.15](#)

Una vez filtrado el extracto enzimático, se realizó la determinación de la actividad enzimática para un cultivo de levaduras de 24 y 48 horas. A las 24 horas de cultivo se extrajo una alícuota del extracto para determinar la actividad enzimática y se determinó el contenido de proteína. A las 48 horas, se repitió la extracción y determinación de actividad enzimática. Para medir la actividad endopoligalacturonasa, se preparó una mezcla de reacción que contenía entre 10-25µL del extracto enzimático, 25µL de tampón



**Figura 5.15.** Curva de calibrado para la cuantificación de proteína.

acetato 187.5mM y 200µL de una solución de ácido poligalacturónico al 2%. El ensayo enzimático se realizó a 45°C, extrayendo muestras cada 1-2 minutos durante 6-10 minutos en función de la actividad de la cepa de levadura. La reacción se detiene por efecto de cambio de pH, descenso de la temperatura y dilución, al colocar la alícuota extraída de la reacción en tampón bicarbonato (pH 10) en una dilución 1:100 y en hielo.

### 5.2.7 Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de los extractos de levadura.

En la [tabla 5.16](#) se pueden observar los resultados preliminares obtenidos para los dos tiempos de cultivo, 24 y 48 horas, para cada una de las cepas estudiadas. En cuanto al contenido de proteína, los valores obtenidos son superiores al determinado en el pack enzimático Rapidase ex color ( $81 \pm 3 \mu\text{g eq BSA/mL}$ ) y similares al del pack Viscozyme L ( $148 \pm 11 \mu\text{g eq BSA/mL}$ ).

En términos de actividad enzimática específica, se puede observar que las levaduras modificadas por evolución genómica poseen una actividad entre 16 y 25 veces superior que la levadura 1926 original. Esto está relacionado con la modificación genética introducida, puesto que el promotor del gen que codifica para la enzima endopoligalacturonasa, fue cambiado por un promotor fuerte de la vía de la glicólisis. Esto quiere decir que mientras la

**Tabla 5.16.** Actividades enzimáticas de las distintas cepas de levadura.

Cepa	Tiempo de cultivo (horas)	Proteína ( $\mu\text{g}$ )	Actividad enzimática específica ( $\mu\text{gGalact.}/\text{min} * \mu\text{L} * \mu\text{g}$ )	Actividad enzimática del extracto ( $\mu\text{gGalact.}/\text{min} * \mu\text{L}$ )
1926	24	$79.79 \pm 6.12$	$0.0136 \pm 0.0003$	$1.09 \pm 0.02$
	48	$96.8 \pm 8.2$	$0.006 \pm 0.003$	$0.6 \pm 0.3$
1926-TP6	24	$176.5 \pm 29.9$	$0.1639 \pm 0.0105$	$28.9 \pm 1.8$
	48	$126.7 \pm 5.5$	$0.22 \pm 0.02$	$27.39 \pm 2.02$
1926-12T	24	$132 \pm 3$	$0.21 \pm 0.05$	$28.2 \pm 6.8$
	48	$156 \pm 7$	$0.17 \pm 0.04$	$26.98 \pm 6.06$
1926-12T4PO	24	$82.827 \pm 4.102$	$0.18 \pm 0.03$	$15.0 \pm 2.3$
	48	$104.37 \pm 10.13$	$0.246 \pm 0.006$	$25.6 \pm 2.6$

levadura esté en fase exponencial de crecimiento, el promotor *PTDH3* en el caso de la cepa 1926-TP6 y el promotor *PPGK1* en el caso de la cepa 1926-12T y 1926-12T4PO estarán activando fuertemente la transcripción del gen *PGU1* que codifica para la síntesis de una enzima con actividad endopoligalacturonasa.

La actividad enzimática final del extracto, depende del nivel de crecimiento alcanzado por la cepa de levadura y por lo tanto, con la producción de enzima. Un indicador de la cantidad de enzima producida es el contenido de proteína del extracto. Por esta razón, el extracto con mayor contenido de proteína es el que mayor actividad enzimática posee.

En la [tabla 5.17](#) se puede observar la comparación de la actividad enzimática máxima determinada para cada uno de los extractos de levadura y para los packs enzimáticos comerciales. En términos generales, existen tres niveles de actividad, el más bajo corresponde a la cepa de levadura 1926, el intermedio al pack Rapidase ex color y el nivel de actividad más alto es el determinado en las cepas de levadura 1926-TP6, 1926-12T, 1926-12T4PO y el pack comercial Viscozyme L.

Teniendo en cuenta la elevada actividad enzimática de los extractos de levaduras modificadas por evolución genómica, se decidió elegir la cepa 1926-12T4PO por ser la cepa que ha perdido el marcador dominante de selección y por lo tanto la que posee el menor número de modificaciones en el genoma original.



**Tabla 5.17.** Actividad enzimática de los extractos de levadura y packs comerciales.

Fuente	Actividad enzimática ( $\mu\text{gGalact.}/\text{min} * \mu\text{L}$ )
1926	$1.09 \pm 0.02$
1926-TP6	$28.9 \pm 1.8$
1926-12T	$28.2 \pm 6.8$
1926-12T4PO	$25.6 \pm 2.6$
Viscozyme L	$33.4 \pm 7.8$
Rapidase ex color	$13.2 \pm 2.7$

### 5.2.8 Despectinización del zumo de arándanos con el extracto de levadura 1926-12T4PO.

La despectinización enzimática con el extracto de levadura se realizó al 0.2 % y a temperatura ambiente (25°C). La elaboración del zumo se realizó siguiendo el mismo diagrama de flujo utilizado en el caso de la despectinización con los packs enzimáticos comerciales (figura 5.6). Sobre la materia prima y el producto final se realizaron las mismas determinaciones físicas: reología y color instrumental; y funcionales: antocianinas monoméricas, fenoles totales y índice de color polimérico.

En la tabla 5.18 se presentan los resultados del ajuste del modelo de Ostwald-de-Waele de las propiedades reológicas del zumo de arándano despectinizado con un extracto enzimático proveniente del cultivo de la levadura 1926-12T4PO. Las muestras de zumo tomada a 60 y 150 minutos no pudieron ser filtradas por el tamiz de 0.5mm. Esto se debe a que la intensidad del tratamiento de despectinización no fue la suficiente. Por esta razón, el zumo tiene un alto índice de consistencia y un bajo índice de comportamiento al flujo. En términos generales, el zumo tiene características pseudoplásticas. Para obtener mejores resultados reológicos será necesario ajustar la dosis de extracto enzimático utilizado.

Desde el punto de vista del color instrumental, como se puede observar en tabla 5.19, se obtiene un producto que tiene una mayor luminosidad, mayor saturación y una tonalidad similar al zumo obtenido con el pack enzimático comercial Viscozyme L a 50°C. Estos resultados indican que el tratamiento de despectinización produjo una considerable extracción de color de las

**Tabla 5.18.** Propiedades reológicas del zumo despectinizado mediante un extracto enzimático de levadura.

	Tiempo (min)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n (adimensional)
1926-12T4PO	60	11.1 ± 0.7	0.28 ± 0.05
	150	12.6 ± 0.9	0.21 ± 0.04

k y n: índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo respectivamente.

pieles del arándano. Además, la mayor intensidad y saturación del color del zumo obtenido, puede estar relacionado con el hecho de que el tratamiento de despectinización se realizó a temperatura ambiente.

**Tabla 5.19.** Color instrumental del zumo despectinizado mediante un extracto enzimático de levadura.

Enzima	Tiempo (min)	L*	a*	b*	C*	h
1926-12T4PO	60	7.23 ± 0.06	14.0 ± 0.2	2.320 ± 0.114	14.2 ± 0.2	9.4 ± 0.6
	150	6.57 ± 0.08	13.3 ± 0.3	2.4 ± 0.4	13.5 ± 0.2	10.4 ± 1.8

L\*: índice de luminosidad; a\* coordenada de color del eje verde-rojo; b\* coordenadas de color del eje azul-amarillo; C\*: saturación o intensidad del color percibido; h: tonalidad del color percibido.

Por último, los resultados del contenido de componentes funcionales se presenta en la [tabla 5.20](#). En principio, se observa un ligero aumento del contenido de antocianinas monoméricas al aumentar el tiempo de tratamiento. Esto puede estar relacionado con el avance del proceso de despectinización que produce una mayor rotura de estructuras, liberando las antocianinas. La concentración de antocianinas a los 150 minutos es similar al obtenido en el caso del tratamiento con el pack enzimático comercial. Probablemente, una mayor dosis de extracto enzimático de levadura, produciría una mayor extensión del proceso de despectinización y permitiría una mayor liberación de estos compuestos. La cantidad de antocianinas que permanecen en los restos sólidos no pudo ser determinada debido a que, como se dijo anteriormente, no fue posible aplicar la etapa de separación de sólidos. En términos de color polimérico, los resultados son notablemente mejores puesto que los valores obtenidos en este caso son del orden de la mitad de los obtenidos

para el tratamiento con los packs comerciales. Esto puede deberse a que al no calentar el zumo a 50-60°C las reacciones de degradación y/o polimerización no se verifican con la misma intensidad. Por último, en términos de fenoles totales, se observa que alrededor del 60% están presentes en el zumo de arándanos. Este contenido es casi el doble del determinado en el ensayo de despectinización con Viscosyme L. Nuevamente, no fue posible cuantificar que cantidad de fenoles totales permanecieron retenidos en los residuos sólidos.

**Tabla 5.20.** Propiedades funcionales del zumo despectinizado con extracto de levadura 1926-12T4PO.

	Antocianinas monoméricas (mg/100g)	Color polimérico (%)	Fenoles totales (mg GAE/100g)
Arándano	108 ± 7	-	252 ± 3
Zumo 60min	23.9 ± 1.8	13.56 ± 0.13	161 ± 4
Zumo 150min	33.2 ± 9.6	11.3 ± 0.3	161 ± 8

### 5.2.9 Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos confirman que la etapa de despectinización del triturado de arándanos es de vital importancia tanto desde el punto de vista tecnológico como funcional.

En términos generales, es fundamental realizar una correcta elección de la fuente de enzimas pectinolíticas, lo que determinará el rango de condiciones de tiempo y temperatura de tratamiento de despectinización. Estas tres variables condicionarán la calidad funcional del producto final.

Desde el punto de vista tecnológico, la utilización de complejos enzimáticos comerciales, en el rango de temperaturas recomendado, asegura sin ningún problema propiedades reológicas (bajo índice de consistencia) adecuadas del producto final. En el caso de la aplicación de las levaduras modificadas por evolución genómica, los resultados preliminares presentados, indican que es necesario realizar un ajuste de la dosis utilizada para lograr reducir el índice de consistencia del producto final.

En términos funcionales, entre las dos opciones comerciales utilizadas, se obtuvieron mejores resultados con el pack enzimático Viscosyme L, a una

temperatura de 50°C y 150min. Por otro lado, a priori, la utilización de un extracto enzimático proveniente de levaduras permitiría elaborar un zumo con un mayor contenido de antocianinas y fenoles totales y un menor índice de color polimérico. Además, el hecho de realizarse a temperatura ambiente tendría como beneficios unas mejores características de color y supondría un proceso más económico ya que no sería necesario realizar un calentamiento de la mezcla de reacción.

### 5.3 Homogeneización de zumo de arándano.

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento de homogeneización a bajas y altas presiones sobre los componentes funcionales, el tamaño de las partículas en suspensión, la turbidez, el color y las propiedades reológicas del zumo de arándanos, se sometió al zumo obtenido según el procedimiento descrito en la [sección 5.2](#) a un tratamiento de homogeneización a 25, 50, 100 y 150 MPa. Las muestras se obtuvieron cuando el equipo se encontraba en estado estacionario a la presión correspondiente  $\pm 5$ MPa. Adicionalmente, se registró la temperatura a la entrada y la temperatura del zumo a la salida del homogeneizador.

En la fruta y el zumo inicial se determinaron el contenido de sólidos solubles, el pH, la acidez y la pulpa suspendida. Los resultados se presentan en la [tabla 5.21](#).

**Tabla 5.21.** Propiedades fisicoquímicas de los arándanos congelados y el zumo de arándano.

	Fruta	Zumo de arándanos
Sólidos solubles	12.1 $\pm$ 0.8	13.28 $\pm$ 1.12
Acidez	0.563 $\pm$ 0.102	0.602 $\pm$ 0.114
Pulpa suspendida	-	8.9 $\pm$ 0.5
pH	3.487 $\pm$ 0.107	3.25 $\pm$ 0.04

Sólidos solubles están expresados en °Brix; acidez en gramos de ácido cítrico/100g.

En primer lugar, cabe destacar que el aumento de temperatura debido al procesado a altas presiones, en el rango estudiado, fue del orden de  $0.15 \pm 0.03^\circ\text{C}/\text{MPa}$ . Estos resultados se encuentran en el rango de los ob-

servados por otros autores (Cortés-Muñoz et al., 2009; Picart et al., 2006; Thiebaud et al., 2003).

A continuación se exponen los resultados relacionados con la caracterización física de los zumos de arándanos homogeneizados a distintas presiones. Los valores de pulpa suspendida y turbidez se presentan en la [tabla 5.22](#). Para la pulpa suspendida a 365G se observan unos porcentajes bajos de pulpa sedimentable, lo que indica cierta estabilidad de la nube. En general, se observa una disminución del porcentaje en pulpa separada por centrifugación, a medida que aumenta la presión de homogeneización. Esto concuerda con los resultados esperados ya que a mayor presión de homogeneización menor es el tamaño de las partículas en suspensión y más estable debería resultar la nube. Diferencias estadísticamente significativas se encontraron para las presiones por debajo de 50 y por encima de 100 MPa, marcando las presiones de 100 y 150MPa como las que más estabilidad aportan a la nube. En términos de la pulpa suspendida a 3000G también se observan unos valores bajos de pulpa sedimentada, y aunque existe una ligera tendencia a disminuir aún más el porcentaje con el aumento de la presión de homogeneización, no existen diferencias significativas.

En términos de turbidez, también se observan tendencias que indican que a mayor presión de homogeneización más estable es la nube, sin embargo, el color de fondo del zumo de arándanos le quita sensibilidad al método de determinación del porcentaje de transmitancia.

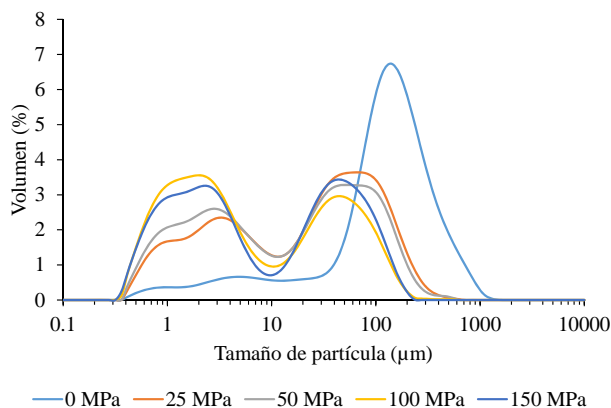
Tendencias similares fueron encontradas por E. Betoret, Betoret, Carbonell, and Fito (2009) para el tratamiento de zumos cítricos a presiones de homogeneización entre 0-30MPa.

**Tabla 5.22.** Pulpa suspendida y turbidez de los zumos homogeneizados a distintas presiones.

		0 MPa	25 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa
365G	Pulpa Suspendida	$8.9 \pm 0.5$	$7.851 \pm 1.109$	$6.9 \pm 1.7$	$4.9 \pm 0.7$	$4.0 \pm 0.6$
	Turbidez	$1.5 \pm 0.4$	$1.1 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.6$	$0.84 \pm 0.06$	$0.72 \pm 0.18$
3000G	Pulpa Suspendida	$6 \pm 1$	$5.6 \pm 1.5$	$5.6 \pm 1.4$	$5.04 \pm 0.04$	$3.7 \pm 0.3$
	Turbidez	$6.4 \pm 0.8$	$6.23 \pm 1.04$	$7.4 \pm 2.4$	$5.8 \pm 1.3$	$4.4 \pm 1.7$

La distribución del tamaño de partículas del zumo sin tratamiento de homogeneización y los zumos tratados a 25, 50, 100 y 150 MPa se presenta en la

figura 5.16. Como se puede observar, el zumo sin tratamiento de homogeneización presenta una distribución monomodal con un máximo en  $138.04\mu\text{m}$ . En cambio, las muestras sometidas al proceso de homogeneización presentan distribuciones bimodales con un primer pico alrededor de  $2-3\mu\text{m}$  y un segundo pico en torno a  $45-80\mu\text{m}$ .



**Figura 5.16.** Distribución del tamaño de partícula en los zumos tratados a las diferentes presiones de homogeneización.

Los parámetros relacionados con el tamaño de partículas del zumo sin tratamiento de homogeneización y los tratados a las distintas presiones se presentan en la tabla 5.23. Al tratarse de distribuciones bimodales de tamaño de partículas, no es suficiente un parámetro de la distribución para poder observar el efecto del tratamiento. La información que permite obtener el parámetro  $D_{[3,2]}$  está más cercana a los valores del primer modo de la distribución en tanto que los valores del parámetro  $D_{[4,3]}$  parecen correlacionarse mejor con los tamaños de partícula del segundo modo. Tanto en los valores de estos dos diámetros equivalentes, como en los valores de los  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$  se aprecia una tendencia a la disminución del tamaño de partícula a medida que aumenta la presión de homogeneización. En términos del parámetro  $D_{[4,3]}$ , se encontraron diferencias significativas para las muestras 0-25MPa y las tratadas a 100-150MPa

Analizando estadísticamente los parámetros  $D_{[4,3]}$  y  $D_{[3,2]}$ , se encontraron diferencias significativas entre la muestra sin tratamiento y las muestras

tratadas a altas presiones. Entre los niveles de presiones aplicadas no se encontraron diferencias significativas.

**Tabla 5.23.** Tamaño de partícula de los zumos de arándanos tratados a las diferentes presiones de homogeneización.

Presión de homogeneización (MPa)	1º Moda ( $\mu\text{m}$ )	2º Moda ( $\mu\text{m}$ )	$D_{[4,3]}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{[3,2]}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{(0,1)}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{(0,5)}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{(0,9)}$ ( $\mu\text{m}$ )
0	138.04		$162.95 \pm 22.6^d$	$14.3 \pm 2.4^b$	$10.2 \pm 5.3$	$122.2 \pm 10.8$	$358.3 \pm 61.4$
25 MPa	3.31	79.43	$44.4 \pm 3.4^c$	$3.76 \pm 0.17^a$	$1.15 \pm 0.04$	$23.2 \pm 3.6$	$118.4 \pm 5.6$
50 MPa	2.51	69.18	$38.5 \pm 0.9^{ab}$	$3.15 \pm 0.12^a$	$0.98 \pm 0.04$	$16.0 \pm 2.7$	$107.2 \pm 2.9$
100 MPa	1.91	45.71	$23.2 \pm 1.2^a$	$2.13 \pm 0.03^a$	$0.753 \pm 0.006$	$4.10 \pm 0.18$	$70.468 \pm 2.012$
150 MPa	2.19	45.71	$25.6 \pm 1.6^a$	$2.29 \pm 0.12$	$0.77 \pm 0.02$	$6.5 \pm 2.8$	$75.4 \pm 2.4$

$D_{[3,2]}$  Diámetro medio en función de la superficie (Diámetro medio de Sauter): Es el promedio ponderado del diámetro de las partículas calculado asumiendo partículas esféricas con la misma superficie que las partículas reales.  $D_{[4,3]}$  Diámetro medio en función del volumen (Diámetro medio de De Brouckere): es la media ponderada del diámetro calculado asumiendo partículas esféricas del mismo volumen que las partículas reales.  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  and  $d_{90}$ :  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  and  $d_{90}$ : tamaño de partícula, por debajo del cual, se encuentran el 10 %, 50 % y 90 % de las partículas del zumo. Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de color instrumental se presentan en la [tabla 5.24](#). El análisis estadístico permite distinguir dos grupos, uno formado por las muestras tratadas a 0, 100 y 150MPa y el otro formado por las muestras tratadas a 25 y 50MPa. Se encontraron diferencias significativas en términos de luminosidad ( $L^*$ ), registrándose un aumento en este parámetro para las presiones de tratamiento de 25 y 50MPa. Aunque sin diferencias estadísticamente significativas, se observaron cambios similares en las coordenadas psicométricas de saturación y tonalidad. Se observó un aumento de la saturación del color a 25 y 50MPa con respecto a la muestra control y a las tratadas a 100 y 150MPa. En términos de tonalidad, se observa a 25 y 50MPa el ángulo de tonalidad hacia colores más rojos. Sin embargo, en términos de la diferencia global de color, las diferencias no son lo suficientemente grandes como para que el consumidor aprecie diferencias entre los colores de los distintos zumos. Es escasa la información publicada que correlacione la diferencia global de color con la percepción visual de los cambios de color en zumos de arándanos. Stojanovic and Silva (2007) analizaron el cambio de color en arándanos con diferentes tratamientos. Las coordenadas de color las midieron en el espacio Hunter Lab y encontraron diferencias globales de color del

orden de siete puntos, diferencias que resultaron imperceptibles a simple vista.

**Tabla 5.24.** Color instrumental de los zumos tratados a distintas presiones de homogeneización.

Presión de Homogeneización (MPa)	L*	a*	b*	C*	h	ΔE
0	5.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	12.20 ± 2.06	1.0 ± 0.3	12.25 ± 2.08 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.9 <sup>ab</sup>	-
25	7.93 ± 0.09 <sup>b</sup>	13.96 ± 0.12	1.65 ± 0.06	14.06 ± 0.13 <sup>ab</sup>	6.74 ± 0.18 <sup>bd</sup>	2.78 ± 0.15
50	7.58 ± 0.06 <sup>b</sup>	14.47 ± 0.05	1.9 ± 0.2	14.59 ± 0.07 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.7 <sup>d</sup>	2.95 ± 0.13
100	5.12 ± 0.04 <sup>a</sup>	12.38 ± 0.12	0.89 ± 0.07	12.41 ± 0.12 <sup>ab</sup>	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.13
150	5.47 ± 0.02 <sup>a</sup>	12.87 ± 0.17	1.28 ± 0.03	12.94 ± 0.17 <sup>ab</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>bc</sup>	0.828 ± 0.099

L\*: índice de luminosidad; a\* coordenada de color del eje verde-rojo; b\* coordenadas de color del eje azul-amarillo; C\*: saturación o intensidad del color percibido; h: tonalidad del color percibido.

Por último se presentan los resultados obtenidos de las determinaciones funcionales realizadas a cada uno de los zumos. El contenido de antocianinas monoméricas fue ligeramente superior en el zumo no tratado y en los tratados a 25 y 50MPa. La disminución del contenido de antocianinas en los zumos tratados a 100 y 150MPa puede estar relacionado con procesos de polimerización que ocurren durante las sucesivas etapas de tratamiento del zumo y/o por el mayor calentamiento experimentado como consecuencia de una más alta presión de tratamiento. Esto está en concordancia con los resultados de Barba et al. (2013), que observaron que el tratamiento de altas presiones hidrostáticas principalmente puede modificar los mecanismos de degradación de antocianinas afectando las moléculas implicadas en la cinética de reacción, principalmente enzimas.

Por otra parte, en los compuestos fenólicos se observó un incremento del orden del 11% para las presiones de 100 y 150MPa. Barba et al. (2013) obtuvieron resultados similares en el tratamiento con altas presiones hidrostáticas de zumo de arándanos, observando que los fenoles parecen ser relativamente resistentes al tratamiento con altas presiones, registrando incrementos del orden 13-27% para tratamientos a 200MPa por un tiempo entre 5-15 minutos y un aumento del 24% después de un tratamiento a 400MPa durante 15 minutos. Corrales, Toepfl, Butz, Knorr, and Tauscher (2008) también observaron un incremento en el contenido de fenoles en el tratamiento con altas presiones hidrostáticas aplicadas a subproductos de la



uva. Estos incrementos en el contenido de fenoles pueden estar relacionados con un aumento en la extracción de algunos compuestos antioxidantes como consecuencia del tratamiento de altas presiones (Barba et al., 2013).

En cuanto a la capacidad antirradical, determinada tanto por el método del DPPH como por el método del ABTS se observó un pequeño aumento. Esto puede ser consecuencia del aumento en el contenido de fenoles y/o a la formación de compuestos de Maillard (que reaccionan con los radicales) producto del aumento de temperatura que ocurre durante la homogeneización a altas presiones. Un comportamiento similar fue observado por Hager et al. (2008) en la pasteurización de zumo de frambuesas.

**Tabla 5.25.** Propiedades funcionales de los zumos tratados a diferentes presiones de homogeneización.

Presión de Homogeneización (MPa)	Antocianinas (ppm)	Fenoles totales (ppm)	Capacidad Anti-radical	
			DPPH (ppm)	ABTS (ppm)
0	109.5 ± 19.6	1710.2 ± 109.3	909 ± 48	2661.8 ± 398.8
25	135.26 ± 22.16	1602.3 ± 43.5	896.5 ± 27.5	2270.24 ± 227.06
50	116.9 ± 12.4	1612 ± 14	892.2 ± 24.3	2371.4 ± 299.6
100	62.5 ± 5.5	1930.6 ± 12.9	931.698 ± 29.013	2961.7 ± 119.8
150	85.2 ± 18.2	1936.8 ± 6.4	987.8 ± 12.2	3115 ± 134

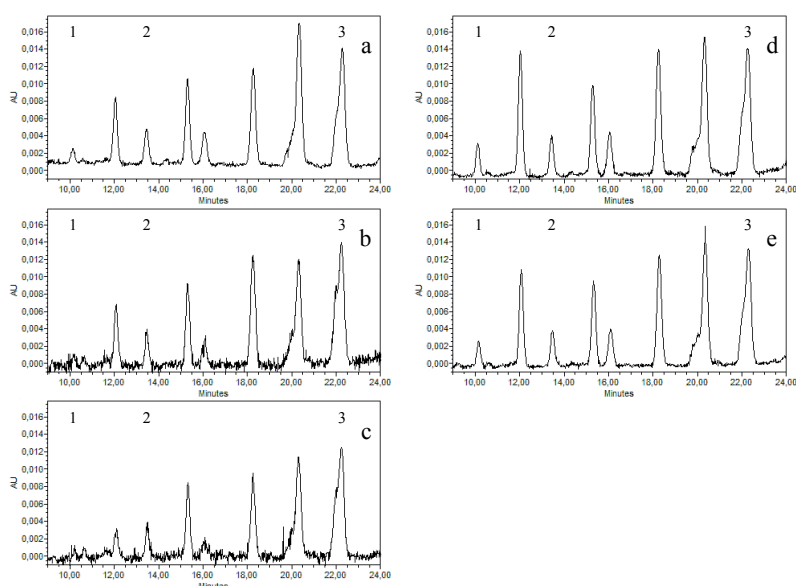
El contenido de antocianinas está expresado en mg cianidina-3-glucósido/L, fenoles totales en mg GAE/L, la capacidad antirradical por el método del DPPH en mg equivalentes de ácido ascórbico/L, la capacidad antirradical por el método del ABTS en mg trolox equivalentes/L.

Los zumos con y sin tratamiento de homogeneización fueron analizados por HPLC con la finalidad de determinar el contenido de antocianinas específicas y determinar si ocurren cambios en el perfil de compuestos presentes en los distintos zumos. Los resultados de la cuantificación de las antocianinas delphinidina, cianidina y malvidina se presentan en la [tabla 5.26](#). Como se puede observar, no existen diferencias en las concentraciones de estas tres antocianinas. Esto indicaría que el tratamiento de homogeneización no modifica sensiblemente el perfil de antocianinas de los zumos. En la [figura 5.17](#) se presentan los cromatogramas obtenidos.

Debido a que una de las posibilidades de industrialización del zumo de arándano consiste en utilizarlo como ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales y teniendo en cuenta la reducción del tamaño de partícula y el

**Tabla 5.26.** Contenido de antocianinas específicas para los zumos homogeneizados a las diferentes presiones.

Presión (MPa)	Delfinidina (ppm)	Cianidina (ppm)	Malvidina (ppm)
0	1.0 ± 0.3	2.7 ± 0.2	15.0 ± 0.6
25	1.3 ± 0.4	2.6 ± 0.9	16.1 ± 0.6
50	1.6 ± 0.2	3.1 ± 0.9	17.0 ± 0.7
100	2.0 ± 0.3	3.2 ± 0.5	15.6 ± 0.8
150	1.5 ± 0.3	2.9 ± 0.3	15.2 ± 0.6



**Figura 5.17.** Perfil de antocianinas específicas en los zumos tratados a distintas presiones de homogeneización. a. Zumo de arándano sin homogeneizar, b. Zumo de arándano homogeneizado a 25MPa, c. Zumo de arándano homogeneizado a 50MPa, d. Zumo de arándano homogeneizado a 100MPa, e. Zumo de arándano homogeneizado a 150MPa

aumento en la estabilidad de la nube observados como consecuencia de la aplicación del tratamiento de homogeneización, se planteó evaluar el efecto de la operación de homogeneización sobre la capacidad de impregnación de discos de manzana con zumo de arándano. En la valoración de la capacidad

de impregnación se trabajó únicamente con zumo sin homogeneizar y zumo homogeneizado a 150MPa.

La cantidad de zumo introducido en la matriz porosa de una rodaja de manzana se determinó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Fito, Andrés, Chiralt, and Pardo (1996). Los resultados fueron expresados en función del parámetro volumétrico de impregnación  $X$  ( $\text{m}^3$  de líquido incorporado/ $\text{m}^3$  de muestra inicial). Además, se determinó el parámetro volumétrico de deformación de la muestra  $\gamma$  ( $\text{m}^3$  de deformación de la muestra / $\text{m}^3$  de muestra).

Los valores obtenidos se presentan en la [tabla 5.27](#). Se puede observar que el zumo homogeneizado es incorporado en una mayor cantidad dentro de la estructura porosa de la manzana. Esto se explica debido a que el tratamiento de homogeneización disminuye el tamaño de las partículas suspendidas. Al existir una mayor proporción de partículas más pequeñas, existe una mayor cantidad de partículas que pueden ingresar junto con el zumo en el interior éstas son capaces de pasar a través de la estructura porosa de la manzana.

**Tabla 5.27.** Parámetros del modelo hidrodinámico de impregnación a vacío.

Muestra	$X$	$\gamma$
0 MPa	$0.179 \pm 0.005$	$-0.058 \pm 0.009$
150 MPa	$0.202 \pm 0.006$	$-0.039 \pm 0.007$

### 5.3.1 Conclusiones parciales.

Desde el punto de vista tecnológico, la homogeneización reduce el tamaño de las partículas suspendidas en la nube del zumo. Como consecuencia aumenta la estabilidad de la nube y mejora la apariencia y palatabilidad del zumo de arándanos. En relación a los resultados de luminosidad, croma y saturación del color del zumo, la homogeneización a más altas presiones (100 y 150MPa) produce menores diferencias cuando se comparan los zumos obtenidos a 100 y 150MPa con el que no ha sido homogeneizado. Desde el punto de vista funcional, el tratamiento de homogeneización no afecta considerablemente las propiedades del zumo. Si bien se observa una ligera disminución del contenido de antocianinas monoméricas al aumentar

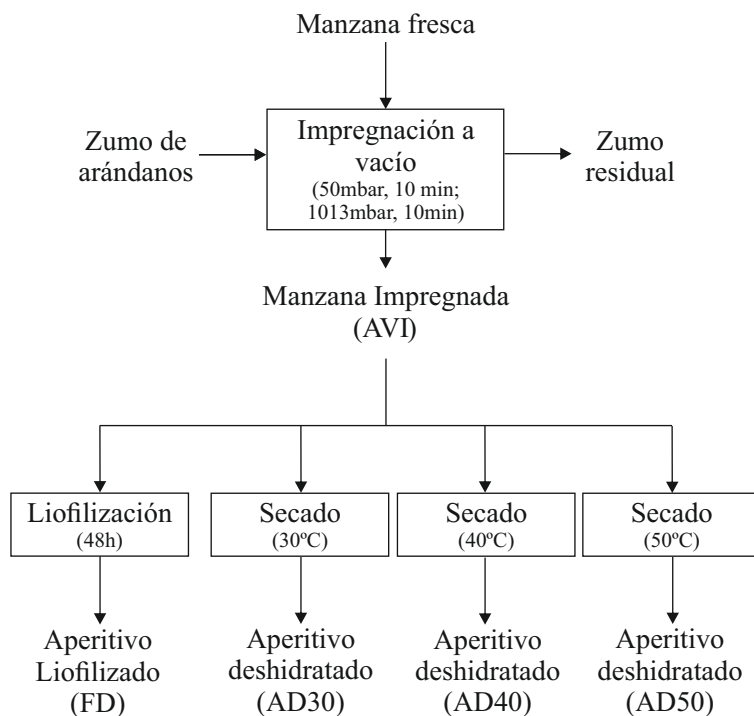
la presión de tratamiento, esto está contrarrestado por un aumento del contenido de fenoles totales. Como consecuencia se produce un ligero aumento de la capacidad antioxidante a medida que aumenta la presión de homogeneización. Por último, el perfil de compuestos de interés no se ve modificado por las altas presiones. Los resultados obtenidos indican que sería factible introducir un tratamiento de homogeneización en el diagrama de flujo de elaboración del zumo de arándanos sin afectar negativamente las propiedades funcionales y mejorando las propiedades físicas del mismo. Teniendo en cuenta el amplio rango de presiones que se ha ensayado, podemos decir que la operación de homogeneización supone una mejora, tanto para las propiedades físicas, como para las propiedades funcionales del zumo y sobre todo, debido a la reducción del tamaño de partícula, puede suponer una ventaja en la utilización del zumo como ingrediente en la aplicación de la operación de impregnación a vacío.

## Capítulo 6

# Utilización del zumo de arándanos como ingrediente funcional

### 6.1 Desarrollo de un aperitivo funcional de manzana y zumo de arándanos.

El zumo de arándano fue utilizado como ingrediente funcional para el desarrollo de un aperitivo de manzana. La impregnación a vacío se realizó en una cámara de vacío. Manzanas (var. *Granny Smith*) fueron cortadas en discos de 5mm de espesor, 65mm de diámetro exterior y 20mm de diámetro interior. Estos discos de manzana fueron sumergidos en el zumo de arándano e introducidos en la cámara de vacío. En la primera etapa de impregnación se aplicó una presión de vacío de 50mbar durante 10 minutos. A continuación, se restauró la presión atmosférica manteniendo los discos sumergidos en el zumo durante 10 minutos más. Tras las determinaciones pertinentes, las muestras impregnadas fueron deshidratadas en un secador convectivo de bandejas durante 28, 20 y 12 horas a 30, 40 y 50°C respectivamente. En la [figura 6.1](#) se esquematiza en forma de diagrama de flujo el proceso experimental.



**Figura 6.1.** Diagrama de flujo del proceso experimental.

*Nota del autor: debido a la cantidad necesaria, el zumo de arándano utilizado para el desarrollo del aperitivo se obtuvo a nivel de planta piloto en condiciones diferentes a las de laboratorio. Por esta razón sus propiedades fisicoquímicas y funcionales fueron ligeramente diferentes. Aquellas que sean necesarias para la interpretación de los resultados del proceso de desarrollo del aperitivo serán presentadas en este capítulo.*

### **6.1.1 Efecto de la impregnación a vacío sobre las propiedades funcionales del zumo de arándano.**

Por medio de la impregnación a vacío, una estructura celular puede ser utilizada como soporte, protección y transporte de compuestos antioxidantes presentes en un medio líquido, protegiéndolos de la oxidación por el oxígeno y facilitando la liberación de los mismos en el lugar adecuado durante el pro-

ceso fisiológico. Para lograr esto, es necesario conseguir un adecuado nivel de impregnación. Además, si todos los compuestos presentes en el líquido de impregnación son introducidos en la misma proporción en el interior de la estructura porosa, entonces la impregnación será homogénea. Las características del medio líquido, en este caso el zumo de arándano, necesarias para alcanzar un adecuado nivel de impregnación son: un tamaño de partículas suspendidas menor que el tamaño de los canales y poros de la estructura celular, una estabilidad de la nube que asegure que las partículas no precipitarán o bloquearán el flujo del zumo al interior de la matriz porosa y propiedades reológicas que aseguren el flujo del zumo de arándano hacia el interior de la estructura porosa. En la [tabla 6.1](#) se presentan las características físicas relacionadas con el tamaño de partícula, pulpa suspendida, turbidez y propiedades reológicas del zumo de arándano.

**Tabla 6.1.** Tamaño de partículas, pulpa suspendida, turbidez y propiedades reológicas del zumo de arándano.

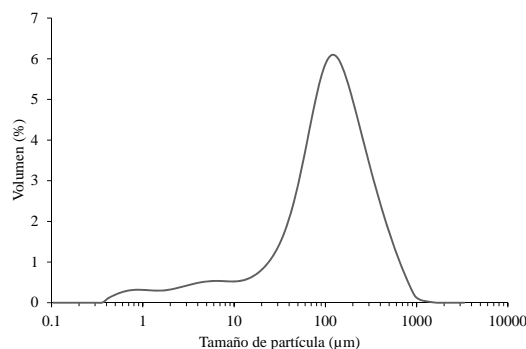
	Zumo de arándano
$D_{[4,3]}$ ( $\mu\text{m}$ )	$147.21 \pm 6.04$
$D_{[3,2]}$ ( $\mu\text{m}$ )	$15.23 \pm 0.37$
$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	$13 \pm 1$
$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	$105.3 \pm 2.4$
$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )	$331.3 \pm 14.6$
Pulpa suspendida 365G (%m/m)	$36.12 \pm 2.19$
Pulpa suspendida 3000G (%m/m)	$7.8 \pm 0.8$
Turbidez 365G (%T)	$0.12 \pm 0.03$
Turbidez 3000G (%T)	$14.2 \pm 1.5$
k ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ )	$0.57 \pm 0.03$
n (adimensional)	$0.33 \pm 0.02$

$D_{[3,2]}$  Diámetro medio en función de la superficie (Diámetro medio de Sauter): Es el promedio ponderado del diámetro de las partículas calculado asumiendo partículas esféricas con la misma superficie que las partículas reales.  $D_{[4,3]}$  Diámetro medio en función del volumen (Diámetro medio de De Brouckere): es la media ponderada del diámetro calculado asumiendo partículas esféricas del mismo volumen que las partículas reales.  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  and  $d_{90}$ : tamaño de partícula, por debajo del cual, se encuentran el 10 %, 50 % y 90 % de las partículas del zumo.

k y n: índice de consistencia e índice de comportamiento al flujo de acuerdo con el modelo de Ostwald-de-Waele.

Se puede observar una gran diferencia entre el  $D_{[3,2]}$  y el  $D_{[4,3]}$  que puede ser atribuida a la forma de la mayoría de las partículas suspendidas. Teniendo en cuenta que la distribución del tamaño de partículas presentada

en la [figura 6.2](#) y los valores  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$  son más próximos al valor del diámetro medio de De Brouckere, puede considerarse que este último es más representativo del tamaño real de las partículas suspendidas y el más apropiado para ser comparado con el tamaño de poro promedio de la manzana. Los poros de la estructura celular de las manzanas son variables en lo que se refiere a su forma, distribución y tamaño, viéndose tremendamente influidos por la variedad considerada. Cerca de la superficie, los poros son prácticamente esféricos y no presentan una orientación definida. Hacia el interior, los poros tienen formas más elongadas y se encuentran ligeramente orientados (Mendoza et al., 2010). Algunos autores han determinado diferentes dimensiones características de los poros. Rahman, Al-Zakwani, and Guizani (2005) determinaron un diámetro medio de poro de  $12.07 \pm 2.69 \mu\text{m}$ , un diámetro medio ponderado linealmente de  $109.0 \pm 82.1 \mu\text{m}$  y un diámetro de Sauter de  $142.6 \pm 95.6 \mu\text{m}$ . Considerando para la manzana, un tamaño de poro entre  $12\text{-}100 \mu\text{m}$  y teniendo en cuenta la distribución del tamaño de partícula del zumo de arándano, puede considerarse que alrededor del 50 % de las partículas en suspensión pueden ser introducidas en la estructura de la manzana por impregnación a vacío.



**Figura 6.2.** Distribución del tamaño de las partículas suspendidas en el zumo de arándano.

La pulpa suspendida y la turbidez fueron determinadas a dos fuerzas centrífugas diferentes con la finalidad de evaluar diferentes tipos de pulpa presentes en la nube del zumo. Centrifugando a 365G se elimina la pulpa suspendida menos estable, mientras que centrifugando a 3000G se logra separar



la pulpa suspendida más estable ya que sólo las partículas más estables se mantienen en suspensión. Aunque los valores de pulpa suspendida a 3000G son similares a los obtenidos para zumos comerciales con pulpa (Kale & Ad-sule, 1995; Carbonell et al., 2011; Cerdán-Calero et al., 2013), las grandes diferencias observadas entre los valores obtenidos para las dos fuerzas centrífugas, nos hacen considerar que una gran cantidad de pulpa no estable está presente en la nube del zumo. De acuerdo con el conocimiento disponible con respecto a la nube y turbidez de zumos de frutas, puede asumirse que las sustancias que son responsables de la turbidez son fundamentalmente partículas pécticas y proteínicas (Grassin & Fauquembergue, 1996; Hilz, Bakx, Schols, & Voragen, 2005). Sin embargo, fracciones de otros componentes de la pared celular pueden también formar parte de la nube del zumo. Si bien la localización precisa de las antocianinas y otros compuestos fenólicos y sus interacciones con otros componentes de la piel de los arándanos son actualmente en gran parte desconocidas, se acepta que una fracción considerable de antocianinas está presente en la nube del zumo de arándano. En relación con las propiedades reológicas, los valores obtenidos para el índice de consistencia y el índice de comportamiento al flujo aseguran un adecuado flujo del zumo hacia el interior de la estructura porosa de las muestras de manzana. Puesto que desde el punto de vista del tamaño de partículas no estaría totalmente asegurada una impregnación homogénea de los discos de manzana, se decidió evaluar la cantidad de compuestos bioactivos incorporados. Para ello se cuantificó el contenido de fenoles totales, antocianinas monoméricas totales y la capacidad antirradical del zumo de arándano y el zumo residual después de aplicar tres impregnaciones a vacío sucesivas. Los resultados se presentan en la [tabla 6.2](#).

Como se puede observar en la [tabla 6.2](#), no existen diferencias estadísticamente significativas entre el zumo de arándanos y los zumos residuales, por lo tanto se puede asumir que las antocianinas, fenoles y otros compuestos con actividad antirradical son incorporados de forma homogénea en la estructura de la manzana. Teniendo en cuenta que los compuestos bioactivos han sido incorporados de forma homogénea en la matriz de la manzana, es posible predecir mediante el modelo del mecanismo hidrodinámico (HDM)

**Tabla 6.2.** Fenoles totales, antocianinas monoméricas y capacidad antirradical del zumo de arándano y el zumo residual después de tres impregnaciones a vacío sucesivas.

	Antocianinas monoméricas	Fenoles totales	Capacidad antirradical	
			DPPH	ABTS
Zumo de arándano	447.03 ± 43.03 <sup>a</sup>	1979.8 ± 307.7 <sup>b</sup>	1603.9 ± 154.5 <sup>c</sup>	3499.24 ± 181.14 <sup>d</sup>
<i>JVI</i> <sub>1</sub>	443.7 ± 28.5 <sup>a</sup>	1874 ± 254 <sup>b</sup>	1604.0 ± 165.6 <sup>c</sup>	3357.4 ± 190.7 <sup>d</sup>
<i>JVI</i> <sub>2</sub>	421.8 ± 35.4 <sup>a</sup>	1690.84 ± 211.16 <sup>b</sup>	1552.8 ± 113.9 <sup>c</sup>	3317.7 ± 80.8 <sup>d</sup>
<i>JVI</i> <sub>3</sub>	404.4 ± 23.9 <sup>a</sup>	1817.0 ± 257.8 <sup>b</sup>	1522.20 ± 135.07 <sup>c</sup>	3420.3 ± 58.3 <sup>d</sup>

El contenido de antocianinas está expresado en mg cianidina-3-glucósido/L, fenoles totales en mg GAE/L, la capacidad antirradical por el método del DPPH en mg equivalentes de ácido ascórbico/L, la capacidad antirradical por el método del ABTS en mg trolox equivalentes/L. *JVI*<sub>1</sub>, *JVI*<sub>2</sub>, *JVI*<sub>3</sub> hacen referencia al zumo residual después de la 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> impregnación a vacío. Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas.

propuesto por Fito et al. (1996), la cantidad de antocianinas específicas en el producto impregnado [Ecuación 6.1](#).

$$x_i^I = \frac{x_i^0 + X \frac{\rho^{IS}}{\rho^0} \cdot y_i}{1 + X \frac{\rho^{IS}}{\rho^0}} \quad (6.1)$$

Donde:  $x_i^I$ : fracción másica del componente i en el producto impregnado,  $x_i^0$ : fracción másica del componente i en la muestra fresca,  $y_i$ : fracción másica del componente i en el líquido de impregnación,  $\rho^{IS}$ : densidad de la solución de impregnación (1.06 g/cm<sup>3</sup>),  $\rho^0$ : densidad de la muestra fresca (0.813 g/cm<sup>3</sup>).

El contenido de cianidina, delphinidia y malvidina calculado con la [Ecuación 6.1](#) y el dato del parámetro volumétrico de impregnación de la [tabla 5.27](#) junto con las determinaciones experimentales por HPLC de estos componentes específicos en las muestras secas se presentan en la [tabla 6.3](#). Los resultados se discuten a continuación.

**Tabla 6.3.** Contenido de antocianinas individuales en el zumo y la manzana impregnada.

		Delfinidina	Cianidina	Malvidina	Total
Zumo de arándano	mg/L	21.35 ± 2.09	3.07 ± 1.34	43.2 ± 4.7	67.62
AVI*	mg/100g m.s.	3.25	0.47	6.59	10.31
FD	mg/100g m.s.	3.19 ± 0.16	3.463 ± 0.109	6.04 ± 0.17	12.69
AD30	mg/100g m.s.	1.42 ± 0.15	0.029 ± 0.013	2.18 ± 0.16	3.63
AD40	mg/100g m.s.	1.942 ± 0.107	0.39 ± 0.08	3.1 ± 0.3	5.43
AD50	mg/100g m.s.	n.d.	n.d.	3.058 ± 0.114	3.06
Zumo de arándano	mg/100g	2.0 ± 0.2	0.29 ± 0.13	4.1 ± 0.4	6.39
AVI*	mg/100g	0.38	0.05	0.77	1.20
FD	mg/100g	0.373 ± 0.019	0.406 ± 0.013	0.71 ± 0.02	1.49
AD30	mg/100g	1.20 ± 0.13	0.0242 ± 0.0107	1.84 ± 0.14	3.06
AD40	mg/100g	1.72 ± 0.09	0.35 ± 0.08	2.7 ± 0.3	4.77
AD50	mg/100g	n.d.	n.d.	2.826 ± 0.106	2.83

\*calculado por la [Ecuación 6.1](#). n.d.: no detectado.

### 6.1.2 Efecto de la liofilización y de la temperatura de secado por aire caliente sobre las propiedades funcionales de un aperitivo de manzana y zumo de arándano.

Las frutas deshidratadas generalmente tienen un mayor contenido energético, una mayor densidad nutricional, un mayor contenido de fibra y una capacidad antioxidante significativamente mayor cuando se las compara con frutas frescas. Esto se debe al efecto de concentración que ocurre durante el secado (Bennett et al., 2011). Sin embargo, el proceso de secado puede tener como consecuencia importantes pérdidas en el contenido de antioxidantes dependiendo fundamentalmente de las condiciones de deshidratación (temperatura, velocidad de aire, tiempo de secado) (Vinson, Zubik, Bose, Samman, & Proch, 2005).

Gran cantidad de trabajos sugieren que, de todos los procedimientos de secado, la liofilización es la que menos pérdidas de compuestos bioactivos produce (B. Schulze, Hubbermann, & Schwarz, 2014; Ratti, 2001; Genin & René, 1995; Irzyniec, Klimczak, & Michalowski, 1995). De acuerdo con esto, sería el método de estabilización ideal para productos con elevado contenido en compuestos antioxidantes. Sin embargo, los elevados costes industriales asociados a la operación hacen su aplicación poco viable. En este trabajo, se analizó el contenido de antocianinas específicas de muestras de manzana

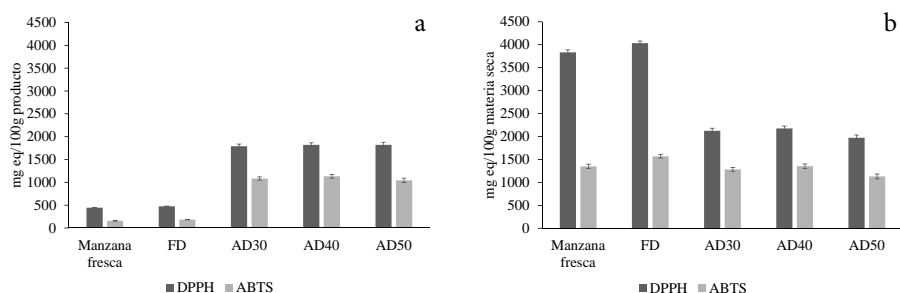
impregnadas y liofilizadas con la finalidad de que sirvieran como referencia en la evaluación del efecto de la temperatura de secado por aire caliente.

En la [tabla 6.3](#) se observa una gran similitud entre los valores calculados de delfinidina, cianidina y malvidina en las muestras de manzana impregnadas y los determinados experimentalmente para la manzana liofilizada. Sólo en el caso de la cianidina, factores no controlados producen un valor experimental mayor que el valor teórico. Una posible explicación podría ser que al producirse un intercambio de líquido intercelular por el zumo de arándano durante la impregnación a vacío, se pueden inducir reacciones de conversión de las procianidinas presentes en la manzana en cianidinas que luego son detectadas por la determinación de HPLC. De hecho, Guyot, Le Bourvellec, Marnet, and Drilleau (2002) determinó un contenido de procianidinas en manzanas *Granny Smith* del orden de  $753 \pm 131$  mg/kg (peso fresco). Además, Wellmann et al. (2006) expusieron que las reacciones que involucran a las antocianinas y las procianidinas han permanecido en debate. A propósito, ellos proponen distintos tipos de reacciones, enzimáticas y no-enzimáticas que podrían explicar la síntesis de cianidina y cianidina-3-glucósido a partir de (+)-catequina. En base a estos resultados, la hipótesis de interacción entre el zumo de arándano y las procianidinas presentes en la manzana sería posible. La impregnación en cantidades adecuadas y la ausencia de efectos del proceso de impregnación a vacío sobre cualquiera de los componentes funcionales, demuestra la utilidad de esta operación para la incorporación de zumo de arándano en discos de manzana y la habilidad para estimar teóricamente la composición del producto final.

En la [tabla 6.3](#) se puede observar una disminución del contenido de antocianinas debido al efecto del secado por aire caliente. A 40°C el contenido de antocianinas experimenta un menor descenso que en el secado a 30 o 50°C. Este efecto también podría estar relacionado con la duración del secado, en efecto, las manzanas impregnadas permanecen 28 horas a 30°C, 20 horas a 40°C y 12 horas a 50°C. Las características cinéticas de la degradación de antocianinas en alimentos sólidos y semisólidos estarían relacionados con la estabilidad individual de cada antocianinas, además de la influencia que ejercen la composición, estructura, propiedades fisicoquímicas y la presencia de otros compuestos como las flavonas y/o ácidos orgánicos presentes en el alimento (Patras, Brunton, O'Donnell, & Tiwari, 2010). La degradación

térmica de las antocianinas ha sido extensamente estudiada para varios tipos de frutas y sus productos procesados. En la deshidratación de frutas, el contenido de antocianinas totales de pasas de uva blancas (*V. vinifera* L.) provenientes del mercado de Argelia es del orden de  $1.0 \pm 0.1$  mg/100g materia seca (Ouchemoukh, Hachoud, Boudraham, Mokrani, & Louaileche, 2012), mientras que el respectivo contenido para pasas de uva (*V. vinifera* L.) sin semillas secadas al sol del mercado de Jordania fue determinado en 34.5 mg/100g materia seca (Rababah et al., 2012). En arilos de granada secados al sol se determinó un 83 % de pérdidas de antocianinas totales comparado con el producto fresco (Jaiswal, DerMarderosian, & Porter, 2010). Sin embargo, se han encontrado disminuciones e incrementos en el contenido individual de antocianinas en uvas Merlot y Syrah durante el secado para producir pasas de uva (Marquez, Dueñas, Serratos, & Merida, 2012). Los incrementos en las antocianinas individuales pueden ser explicados por el efecto de concentración que ocurre durante el secado debido a la pérdida de agua por evaporación y debido a la ruptura de las paredes celulares de la piel de las uvas. Por otra parte, la disminución del contenido de antocianinas puede estar relacionado con distintas reacciones químicas en las que las antocianinas pueden participar, como por ejemplo, polimerización, copigmentación, reacción con taninos y formación de productos de adición (Marquez et al., 2012). Adicionalmente se han determinado pérdidas del orden del 21-25 % de fenoles totales, 30-43 % de antocianinas totales y 50-60 % de la capacidad antioxidante durante el secado con aire caliente a 70°C de arándanos osmodeshidratados con soluciones de sacarosa, glucosa y fructosa (Giovanelli, Brambilla, & Sinelli, 2013). Si se considera la suma del contenido de las tres antocianinas determinado por HPLC, el proceso de secado con aire caliente produce pérdidas del orden del 70, 56 y 75 % para las temperaturas de 30, 40 y 50°C, respectivamente. Bueno et al. (2012) estimaron el consumo recomendado de antocianinas en unos 12.5-250 mg/día en función de las diferencias nutricionales, sociales y culturales de la población investigada y de las metodologías aplicadas. Teniendo en cuenta que el contenido total de antocianinas monoméricas determinado espectrofotométricamente es de  $54.1 \pm 6.5$ mg cianidina-3-glucósido/100g aperitivo (40°C), el consumo de una ración de 40g del producto obtenido aporta 21.6mg de antocianinas, por lo que se puede asumir que el consumo de este aperitivo podría contribuir con una parte interesante de la ingesta diaria recomendada

de antocianinas. Desde el punto de vista de la capacidad antirradical, aunque en la [figura 6.3](#) se observa una disminución, la combinación de zumo de arándano incluido en la matriz de la manzana y deshidratado conserva una alta capacidad antirradical. Esto está relacionado, en parte, con el efecto de concentración que se produce durante el secado y con que las “pérdidas” de antocianinas y fenoles, pueden quedar enmascarados por una reconversión química (Bennett et al., 2011).



**Figura 6.3.** Capacidad antirradical de las diferentes muestras por 100g de producto (a) y 100g de materia seca (b). La concentración está expresada en miligramos de ácido ascórbico equivalente para el método del DPPH y en miligramos equivalentes de trolox para el método del ABTS.

En la [tabla 6.4](#) se presentan los resultados de actividad de agua y humedad de las muestras de manzana después de cada operación. Con el secado por aire caliente se alcanzan actividades de agua del orden de 0.3 que aseguran la estabilidad del producto final. A una actividad de agua próxima a 0.3 la movilidad molecular se reduce considerablemente y podría estar por debajo del nivel necesario para que ocurran reacciones enzimáticas (Labuza, Tanenbaum, & Karel, 1970; Fennema, 1996; Slade & Levine, 2004). Además, desde el punto de vista funcional, se ha observado que las antocianinas son más estables conforme disminuye la actividad de agua (Khachik, Beecher, & Whittaker, 1986). Nuevamente, desde el punto de vista de la estabilidad del producto, la liofilización del aperitivo permite alcanzar actividades de agua menores que las alcanzadas con el secado por aire caliente. Sin embargo cabe considerar que un producto con una actividad de agua tan baja

debe conservarse en unas condiciones adecuadas en cuanto a atmósfera y material de envase que impidan su posible rehidratación.

**Tabla 6.4.** Humedad y actividad de agua de las muestras frescas, impregnadas y deshidratadas en las diferentes condiciones.

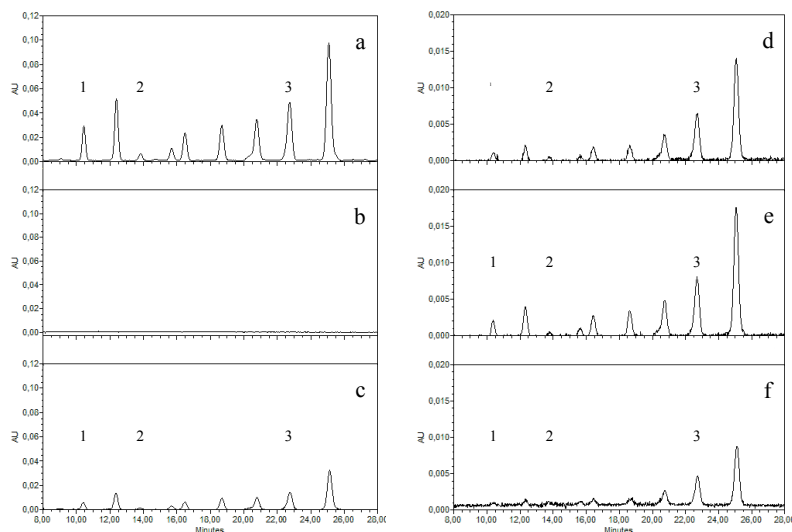
	$a_w$	Humedad (g agua/g base seca)	Humedad (g agua/g producto)
Manzana fresca	$0.989 \pm 0.002^d$	$7.63 \pm 0.07^c$	$0.88413 \pm 0.00096^e$
AVI	$0.9878 \pm 0.0008^d$	$7.5 \pm 0.4^c$	$0.883 \pm 0.002^e$
FD	$0.2149 \pm 0.003^a$	$0.014 \pm 0.003^a$	$0.014 \pm 0.002^a$
AD30	$0.348 \pm 0.007^c$	$0.186 \pm 0.019^b$	$0.156 \pm 0.014^d$
AD40	$0.301 \pm 0.007^b$	$0.13 \pm 0.03^b$	$0.114 \pm 0.019^c$
AD50	$0.304 \pm 0.004^b$	$0.082 \pm 0.003^b$	$0.076 \pm 0.003^b$

El análisis por HPLC permite verificar, identificar y cuantificar la incorporación de antocianinas en la matriz de la manzana. En la [figura 6.4](#) se pueden observar los cromatogramas correspondientes al zumo de arándano, la manzana fresca, la manzana impregnada y liofilizada y la manzana impregnada y secada a 30, 40 y 50°C. En efecto, el zumo de arándanos está incluido en la matriz estructural de la manzana ya que todos los picos presentes en el zumo de arándano se reproducen en las muestras impregnadas.

### 6.1.3 Características físicas del producto final.

Con el fin de cuantificar los efectos macroestructurales de las diferentes condiciones de estabilización del producto final se realizó un análisis textural y se determinó el color instrumental en el espacio CIE L\*a\*b\* de cada una de las muestras. Los resultados de las determinaciones colorimétricas se presentan en la [tabla 6.5](#). Se puede observar que prácticamente no existen diferencias en términos de luminosidad entre los distintos tratamientos de estabilización. Como consecuencia del proceso de secado por aire caliente se produce un cambio en la saturación del color hacia valores más elevados para el caso de las muestras AD40 y AD50. Además, en las tres condiciones de secado se produce un cambio en el ángulo de la tonalidad hacia colores más morados.

Las diferencias colorimétricas globales fueron calculadas para los distintos procedimientos de estabilización y utilizando como referencia la manzana



**Figura 6.4.** Cromatogramas de las muestras analizadas por HPLC. a. Zumo de arándano, b. Manzana fresca, c. Manzana impregnada y liofilizada, d. Aperitivo secado a 30°C, e. Aperitivo secado a 40°C, f. Aperitivo secado a 50°C. Pico N° 1: delfinidina, 2: cianidina y 3: malvidina.

**Tabla 6.5.** Color instrumental en el espacio CIE L\*a\*b\*.

Muestra	L*	a*	b*	C*	h
Manzana fresca	66.2 ± 4.5 <sup>d</sup>	0.3 ± 1.7	18.6 ± 3.6	18.7 ± 3.7 <sup>c</sup>	89.6 ± 4.6 <sup>d</sup>
AVI	27.04 ± 4.13 <sup>ab</sup>	8.0 ± 1.5	4.770 ± 2.096	9.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	30.1 ± 11.6 <sup>c</sup>
FD	37.24 ± 2.12 <sup>c</sup>	24.7 ± 1.5	0.6 ± 0.5	24.7 ± 1.5 <sup>d</sup>	1.28 ± 1.14 <sup>a</sup>
AD30	26.87 ± 4.14 <sup>a</sup>	13.5 ± 3.5	1.96 ± 0.96	13.7 ± 3.4 <sup>b</sup>	8.7 ± 4.5 <sup>b</sup>
AD40	31.024 ± 1.996 <sup>b</sup>	20.7 ± 2.5	4.1 ± 1.8	21.1 ± 2.7 <sup>c</sup>	11.0 ± 3.9 <sup>b</sup>
AD50	29.696 ± 4.006 <sup>ab</sup>	18.827 ± 2.005	4.22 ± 1.14	19.3 ± 1.8 <sup>c</sup>	12.9 ± 4.3 <sup>b</sup>

L\*: índice de luminosidad; a\* coordenada de color del eje verde-rojo; b\* coordenadas de color del eje azul-amarillo; C\*: saturación o intensidad del color percibido; h: tonalidad del color percibido.

impregnada con zumo de arándano. Hasta el momento no se han realizado estudios que correlacionen la diferencia total de color ( $\Delta E$ ) con la percepción visual en productos con arándano. Stojanovic and Silva (2007) analizaron los cambios de color en arándanos concentrados osmóticamente, tratados con ultrasonido o secados por aire caliente y determinaron el color en el espacio Hunter Lab. Encontraron que diferencias de  $\Delta E$  del orden de 7



unidades no eran apreciables a simple vista. En este sentido, aunque existen variaciones entre los tres productos estabilizados por aire caliente, éstas no son perceptibles desde el punto de vista del consumidor. Donde sí se observaron diferencias fue entre los productos estabilizados por aire caliente y el producto liofilizado. El valor  $\Delta E$  obtenido para las muestras liofilizadas es un 50 % mayor que los valores obtenidos para las muestras deshidratadas por aire caliente.

**Tabla 6.6.** Diferencias colorimétricas de las muestras liofilizadas y deshidratadas por aire caliente.

Muestra	$\Delta E$	$\Delta C$	$\Delta h$
FD	$20.1 \pm 1.6$	$15.2 \pm 1.5$	$-28.80 \pm 1.14$
AD30	$7.6 \pm 2.8$	$4.2 \pm 3.4$	$-21.4 \pm 4.5$
AD40	$13.5 \pm 2.6$	$11.6 \pm 2.7$	$-19.0 \pm 3.9$
AD50	$11.8 \pm 2.4$	$9.8 \pm 1.8$	$-17.2 \pm 4.3$

Desde el punto de vista de las propiedades texturales, los resultados presentados en la [tabla 6.7](#) indican que el secado por aire caliente a 40 y 50°C produce un aumento en la fuerza máxima y la pendiente. Una pendiente mayor indica una mayor rigidez de la muestra (Vargas, Perez, Zoffoli, & Perez, 2000) en tanto que una fuerza máxima más elevada indica una mayor resistencia del producto a la rotura (Prothon et al., 2001). En combinación, estas dos características indican una mayor crujencia de las muestras. En términos del área, que representa la cantidad de energía requerida para romper la estructura, las diferencias entre las muestras secadas por aire caliente no son tan importantes. Sin embargo, para la muestra liofilizada se obtiene un menor valor para el área, lo que indica que se requiere menos energía para romper la estructura, es decir, el producto es más frágil. Desde el punto de vista de la fuerza máxima y la pendiente los valores obtenidos son menores a los determinados en la muestras deshidratadas por aire caliente. Esto se debe a que el proceso de liofilización produce una gran cantidad de roturas microscópicas en la estructura celular de la manzana.

**Tabla 6.7.** Características texturales de las muestras liofilizadas y deshidratadas por aire caliente.

Muestra	Fuerza máxima (N)	Pendiente (N/mm)	Área (N.mm)
FD	$7.9 \pm 2.3^a$	$3.66 \pm 1.08^a$	$8.1 \pm 4.4^a$
AD30	$11.78 \pm 1.08^b$	$2.9 \pm 0.6^a$	$17.529 \pm 4.012^{bc}$
AD40	$15.8 \pm 1.7^d$	$5.2 \pm 0.6^b$	$19.8 \pm 2.7^c$
AD50	$14.0 \pm 2.4^c$	$5.05 \pm 1.98^b$	$14.8 \pm 3.4^b$

#### 6.1.4 Conclusiones parciales.

Los resultados indican que es posible incorporar una cantidad adecuada de zumo de arándanos en la estructura matricial de manzana fresca por impregnación a vacío sin que se produzca un efecto negativo sobre los compuestos bioactivos presentes en el zumo fresco. La cantidad de componentes incorporados puede calcularse a partir de las ecuaciones del modelo hidrodinámico. La operación de secado por aire caliente produce pérdidas en los compuestos bioactivos del orden del 70 y 75 % para las temperaturas de secado de 30 y 50°C, no obstante, a 40°C es posible mantener alrededor del 50 % del contenido inicial de antocianinas determinadas por HPLC. La estabilización del producto por medio de la liofilización no produce ningún tipo de pérdida en el contenido de antocianinas individuales. Desde el punto de vista de la capacidad antirradical, el secado a 40°C permite mantener un alto poder antirradical en el producto final.

## 6.2 Desarrollo de un aperitivo antioxidante y probiótico.

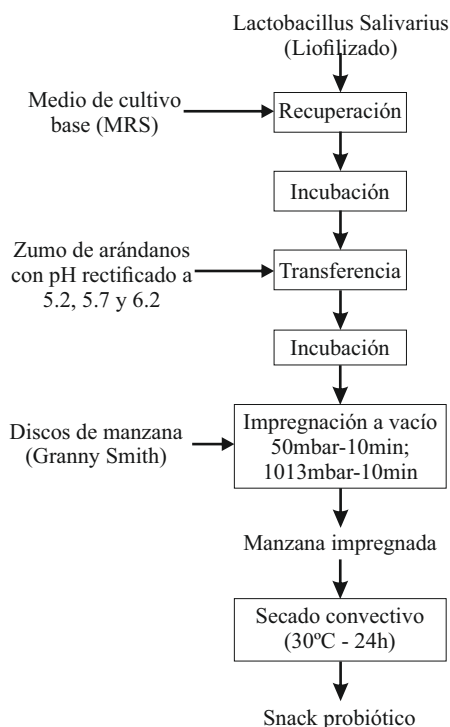
La infección ocasionada por *Helicobacter pylori* se ha convertido en uno de los principales problemas a nivel mundial en la población infantil. Una gran cantidad de estudios sugieren que el consumo de probióticos en cantidades comprendidas entre  $10^9$  y  $10^{11}$  UFC/día disminuye la incidencia, duración e intensidad de las infecciones gastrointestinales, entre ellas las ocasionadas por *H. pylori*. En este sentido, y habiendo demostrado en la sección anterior la factibilidad de incorporar zumo de arándano en el interior de la matriz porosa discos de manzana, se planteó la posibilidad de elaborar un aperitivo que combine las características funcionales que aportan los componentes

bioactivos presentes en el zumo arándano, con el efecto probiótico de una cepa microbiana. Este producto consumido de forma regular, podría disminuir la colonización de *H. pylori* en niños en edad escolar infectados. El zumo de arándano se utilizará como medio de crecimiento del microorganismo y al mismo tiempo permitiría el transporte del mismo al interior de la matriz porosa de la manzana. Como microorganismo probiótico se utilizó una cepa de *Lactobacillus salivarius spp. salivarius* (CECT 4063) por su efecto probiótico comprobado en ratones (Aiba et al., 1998). Además, en estudios piloto previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, con zumo de mandarina, manzana y este probiótico se comprobó la mejora de indicadores de infección en niños infectados que habían consumidos 40g del aperitivo durante 28 días (E. Betoret, N. Betoret, Arilla, et al., 2012).

En la [figura 6.5](#) se puede observar el diagrama de flujo del proceso seguido para la obtención de un aperitivo antioxidante y probiótico.

En primer lugar, la cepa de cultivo puro se resuspendió en un medio de cultivo específico que asegura su desarrollo. En el caso del lactobacilo, se recomienda la utilización del medio específico MRS Broth. La cepa, después de ser resuspendida e incubada durante 24 horas se encontraba en condiciones adecuadas para ser utilizada en la formulación del líquido de impregnación. Con la finalidad de mejorar las condiciones de crecimiento del microorganismo, se suplementó el zumo de arándano con extracto de levadura en una proporción de 5g/L y se realizó un ajuste del pH a tres niveles (5, 5.5 y 6). La transferencia del microorganismo del medio de cultivo específico al zumo de arándanos se realizó en una proporción de 4mL/L, dejándolo incubar durante 24 horas a 37°C. A continuación se realizó la impregnación a vacío de discos de manzana de la variedad *Granny Smith* con el zumo de arándano con probiótico. Las muestras impregnadas se secaron con aire caliente a 30°C durante 24 horas con el fin de asegurar la supervivencia del probiótico.

El contenido de probiótico de las muestras se determinó por duplicado mediante el procedimiento de dilución en agua de peptona tamponada, siembra en placa con doble capa de agar MRS para garantizar condiciones de micro anaerobiosis, incubación a 37°C durante 24 horas y conteo de las placas con un número de colonias comprendido entre 30 y 300 UFC.



**Figura 6.5.** Diagrama del procedimiento experimental para obtener un aperitivo probiótico.

### 6.2.1 Efecto del pH en el crecimiento del probiótico.

Se determinó el nivel de crecimiento de *Lactobacillus salivarius spp. salivarius* en zumo de arándano a 3 pH diferentes. El pH se corrigió con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio.

Como se puede observar en la [tabla 6.8](#), la mayor concentración del probiótico se alcanzó en el zumo de arándano cuyo pH había sido ajustado hasta un valor de 6.2 y además resultó similar al valor máximo obtenido en un estudio previo, en el que se utilizaban zumos comerciales de mandarina, de piña y uva como medios de crecimiento (E. Betoret, N. Betoret, Arilla, et al., [2012](#)).

**Tabla 6.8.** Efecto del pH sobre el crecimiento microbiano.

Bicarbonato de sodio (g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /L)	pH	Contenido de microorganismos (UFC/mL) (Log UFC/mL)	
4	5.20 ± 0.02	5.8 ± 0.3·10 <sup>7</sup>	7.76 ± 0.04
5	5.70 ± 0.01	9.7 ± 0.4·10 <sup>7</sup>	7.98 ± 0.03
6.7	6.20 ± 0.01	1.13 ± 0.02·10 <sup>8</sup>	8.05 ± 0.01

Una vez seleccionada la disolución de impregnación óptima, se procedió a la incorporación del microorganismo probiótico a la matriz celular de discos de manzana mediante la técnica de impregnación a vacío. Con la finalidad de obtener un producto estable, las muestras de manzana impregnadas se secaron con aire a 30°C durante 24 horas. En la [tabla 6.9](#) se muestra el contenido microbiano, el contenido de antocianinas y fenoles y la capacidad antioxidante de las muestras de manzana impregnadas con el zumo de arándano inoculado a pH 6.2 con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, antes y después de su secado convectivo.

**Tabla 6.9.** Valor nutricional de láminas de manzana impregnadas con zumo de arándano inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

	Manzana impregnada	Manzana deshidratada
Antocianinas	4.04 ± 0.07	20 ± 3
Fenoles totales	86.0 ± 2.7	72.4 ± 3.9
Capacidad antirradical	3611 ± 43	2265 ± 27
Contenido de microorganismos	1.83 ± 0.03·10 <sup>8</sup>	9.22 ± 0.05·10 <sup>7</sup>

Las antocianinas monoméricas totales están expresadas en mg cianidina-3-glucósido/100g, los fenoles totales en mg GAE/100g, la capacidad antirradical en mg DPPH reducido/100g, el contenido de microorganismos en UFC/g.

Por lo que respecta al contenido microbiano de los discos de manzana deshidratada, éste resultó, a pesar del descenso experimentado durante el secado, lo suficientemente elevado (> 10<sup>6</sup> microorganismos vivos/g de producto) como para afirmar que se trata de un alimento probiótico (De Champs, Maroncle, Balestrino, Rich, & Forestier, 2003).

En cuanto a la capacidad antirradical, su descenso tras la etapa de secado convectivo no fue debido tanto a la pérdida de antocianinas (cuyo contenido resultó ligeramente superior en el producto deshidratado), como a la degradación de compuestos fenólicos. Y es que, a pesar que algunos autores afirman que el secado convectivo a temperaturas inferiores a 40°C durante unas horas parece no tener un efecto significativo en la degradación térmica de los compuestos fenólicos (Achaerandio Puente, Rózek, Güell, López, & Ferrando, 2008), la realidad es que su concentración disminuyó drásticamente en las muestras de manzana deshidratadas, posiblemente debido al efecto del tiempo de exposición a las condiciones de secado. Es de esperar que otros compuestos, como el ácido ascórbico, más sensibles al calor y a la oxidación, también se hayan degradado durante la etapa de secado, contribuyendo en el descenso de la capacidad antioxidante de la manzana deshidratada.

Finalmente, cabe destacar que, además del valor añadido del probiótico, el consumo de 100g del aperitivo obtenido proporciona cantidades de antocianinas entre 20 y 210 mg cianidina-3-glucósido/100 g y de fenoles entre 40 y 256 mg de GAE/100g. Estos valores son similares a los encontrados en diferentes variedades de uva tinta (Revilla, Carrasco, A., & Arroyo-García, 2009).

### 6.3 Conclusiones parciales.

Ha sido posible obtener un crecimiento adecuado de una cepa con efecto probiótico en zumo de arándano, y utilizar la operación de impregnación a vacío para incorporarlo al interior de la estructura de manzana fresca. El aperitivo de manzana obtenido cumple con los requisitos para ser considerado un alimento funcional, tanto por su contenido de probióticos como de compuestos con capacidad antioxidante (antocianinas y fenoles, fundamentalmente).

Este aperitivo supondría una alternativa a la gran variedad de productos lácteos con probióticos existentes en el mercado, pudiendo ser consumido por colectivos intolerantes a la lactosa. La inclusión del producto en la dieta habitual de niños infectados por *H. pylori* proporcionaría la cantidad de

microorganismos probióticos necesaria para disminuir el nivel de infección y aliviar los síntomas, atenuando el riesgo de sufrir complicaciones en la edad adulta.





Parte V

Conclusiones



## Capítulo 7

### Conclusiones.

En la presente tesis doctoral se proponen acciones de mejora del proceso de fabricación de zumo de arándano y alternativas de industrialización en las que la fruta se utiliza como ingrediente para la fabricación de nuevos productos funcionales. Las acciones propuestas pueden ayudar a mejorar la calidad de los productos ya existentes y a disminuir el excedente de producción que afecta a la región de Entre Ríos (Argentina).

En el proceso de fabricación de zumo, la actuación sobre la operación de despectinización y la aplicación de una operación de homogenización a altas presiones permitiría elaborar un producto con alto contenido en componentes con actividad antirradical y elevada capacidad antioxidante, mejorando en gran medida la calidad funcional de las bebidas de arándano que se comercializan actualmente tanto en el mercado argentino como en el español.

Como mejora del proceso de despectinización se planteó la utilización de extractos enzimáticos provenientes de levaduras con alta actividad pectinolítica seleccionadas mediante la técnica de evolución genómica por diseño molecular. Si bien la utilización del extracto de la levadura modificada 1926-12T4PO indicó que la dosis utilizada debe ser ajustada para disminuir el índice de consistencia, desde el punto de vista funcional permitió obtener un producto final con un contenido ligeramente superior de antocianinas monoméricas y un 30% más de fenoles totales, comparado con el obtenido

para la despectinización en las mejores condiciones con el pack enzimático comercial.

En cuanto a la introducción de la etapa de homogeneización en el proceso de elaboración del zumo de arándano, los resultados obtenidos indican que, si bien se produjo una ligera disminución del contenido de antocianinas monoméricas, esto fue contrarrestado por un aumento del contenido de fenoles y por lo tanto de la capacidad antioxidante. En cuanto a las características físicas, la estabilidad de la nube mejoró al incrementarse la presión de homogeneización como consecuencia de la reducción del tamaño de las partículas suspendidas. Teniendo en cuenta los resultados globales es posible afirmar que el tratamiento de homogeneización puede ser introducido en el proceso de elaboración de zumo de arándanos con distintos objetivos, ya sea para mejorar la estabilidad de la nube del zumo, modificar las propiedades funcionales o como pretratamiento para mejorar la incorporación del zumo a estructuras porosas por impregnación a vacío. En todos los casos, se obtuvieron los mejores resultados a presiones de homogeneización comprendidas entre 100 y 150 MPa.

En la segunda etapa de la investigación se han establecido las bases para llevar a cabo el desarrollo tecnológico de aperitivos de fruta que incluyan zumo de arándano como ingrediente funcional. De esta manera se puede aprovechar el principal atractivo de esta fruta, su alto contenido en compuestos bioactivos beneficiosos para la salud.

Por medio de la técnica de impregnación a vacío se formuló un aperitivo funcional de manzana y zumo de arándano. La operación de impregnación a vacío no tuvo ningún efecto negativo sobre el contenido de componentes funcionales del zumo. En la estabilización del aperitivo por secado con aire caliente se observaron efectos significativos en la disminución del contenido de antocianinas. El secado a 40°C permitió obtener el aperitivo con mayor contenido de componentes funcionales, con la mayor capacidad antioxidante y con las mejores propiedades físicas y mecánicas. Además en la comparación de la operación de secado con de la liofilización se observó que la liofilización es el mejor proceso para conservar prácticamente el 100% del contenido funcional.

---

Por último fue posible desarrollar un aperitivo probiótico de manzana y zumo de arándanos. El zumo de arándanos fue utilizado como medio de crecimiento y transporte de un microorganismo probiótico al interior de la estructura porosa de rodajas de manzana. De esta manera fue posible desarrollar un producto sólido, alternativo a la línea de probióticos lácteos, que puede ser consumido por colectivos intolerantes a la lactosa. La inclusión del *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* junto con las propiedades funcionales del zumo de arándano y la manzana permitirían reducir los síntomas de la infección causada por *H. pylori* en niños en edad escolar.



Parte VI

Bibliografía





# Bibliografía

- Achaerandio Puente, M. I., Rózek, A., Güell, C., López, F., & Ferrando, M. (2008). Efecto del secado convectivo en la estabilidad de compuestos fenólicos añadidos a alimentos sólidos mediante deshidratación osmótica. In *II congreso iberoamericano sobre seguridad alimentaria; v congreso español de ingeniería de los alimentos*. Mercè Raventós, Jordi Salazar. (Cit. on p. [124](#)).
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M. A., Takagi, A., & Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology*, *93*(11), 2097–2101. (Cit. on pp. [29](#), [121](#)).
- Alaña, A., Alkorta, I., Domínguez, J. B., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1990). Pectin lyase activity in a *penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(12), 3755–3759. (Cit. on p. [17](#)).
- Alaña, A., Gabilondo, A., Hernando, F., Moragues, M. D., Dominguez, J. B., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1989). Pectin lyase production by a *penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(6), 1612–1616. (Cit. on p. [17](#)).
- Alexiou, H. & Franck, A. (2008). Prebiotic inulin-type fructans: nutritional benefits beyond dietary fibre source. *Nutrition Bulletin*, *33*(3), 227–233. (Cit. on p. [27](#)).

- Amiot, M., Fleuriet, A., Cheynier, V., & Nicolas, J. (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In F. Tomas-Barberan & R. Robins (Eds.), *Phytochemistry of fruit and vegetables* (Chap. 4, pp. 51–85). Oxford, Clarendon Press. (Cit. on p. 28).
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R. L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R. M., & Joseph, J. A. (2005). Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neuroscience*, 8(2), 111–120. PMID: 16053243. (Cit. on p. 14).
- Antequera Klein, L., Betoret, N., Barrera, C., & Luna Pizarro, P. (2013). Determinación de aspectos nutricionales y tecnológicos del arándano y de su zumo para su posterior aplicación en productos funcionales. (Cit. on p. 65).
- AOAC International. (1980). *Official methods of analysis of aoac international*. AOAC International. (Cit. on p. 48).
- Arai, S. (2002, November). Global view on functional foods: asian perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, S139–S143. (Cit. on p. 24).
- Arts, I. C. W., van de Putte, B., & Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in the netherlands. 1. fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1746–1751. (Cit. on p. 12).
- Atlantic Blue, S. (2011). *Investigación y desarrollo de cultivos agrícolas y comercialización y ventas de plantas y frutos*. (Cit. on p. 6).
- Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & de Pascual-Teresa, S. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by bifidobacteria and lactobacillus. *Food Research International*, 42(10), 1453–1461. (Cit. on p. 14).

- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, *50*(2), 545–549. (Cit. on pp. [23](#), [102](#), [103](#)).
- Barnby, F. M., Morpeth, F., & Pyle, D. (1990). Endopolygalacturonase production from *kluyveromyces marxianus*. i. resolution, purification, and partial characterisation of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, *12*(11), 891–897. (Cit. on p. [16](#)).
- Basset, J., Lepine, P., & Chaumont, L. (1956). Effects of high pressures on the poliomyelitis virus (lansing strain). In *Annales de l'institut pasteur (parís)* (Vol. 90, 5, p. 575). (Cit. on p. [20](#)).
- Basset, J. & Macheboeuf, M. (1932). Etude sur les effets biologiques des ultra-pressions: résistance des bactéries, des diastases et des toxines aux pressions très élevées. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, *195*, 1431–1433. (Cit. on p. [20](#)).
- Bech-Larsen, T. & Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(4), 231–234. (Cit. on p. [24](#)).
- Beets, M. W., Tilley, F., Weaver, R. G., Turner-McGrievy, G., Moore, J. B., & Webster, C. (2013). From policy to practice: addressing snack quality, consumption, and price in after-school programs. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, pages. (Cit. on p. [27](#)).
- Bell, A. C., Kremer, P. J., Magarey, A. M., & Swinburn, B. A. (2005). Contribution of “noncore” foods and beverages to the energy intake and weight status of Australian children. *European journal of clinical nutrition*, *59*(5), 639–645. (Cit. on p. [26](#)).
- Bennett, L. E., Jegasothy, H., Konczak, I., Frank, D., Sudharmarajan, S., & Clingeffer, P. R. (2011). Total polyphenolics and anti-oxidant properties of selected dried fruits and relationships to drying conditions. *Journal of Functional Foods*, *3*(2), 115–124. (Cit. on pp. [113](#), [116](#)).

- Betoret, E., Betoret, N. [N.], Arilla, A., Bennár, M., Barrera, C., Codoñer, P., & Fito, P. (2012). No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against helicobacter pylori. *Journal of Food Engineering*, *110*(2), 289–293. International Conference on Food Innovation - FoodInnova 2010. (Cit. on pp. [121](#), [122](#)).
- Betoret, E., Betoret, N., Carbonell, J. V., & Fito, P. (2009). Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering*, *92*(1), 18–23. (Cit. on p. [99](#)).
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(9), 498–508. (Cit. on p. [30](#)).
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., & Fito, P. (2012). Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *16*, 298–304. (Cit. on p. [30](#)).
- Betoret, N. [Noelia], Puente, L., Díaz, M., Pagán, M., García, M., Gras, M., . . . Fito, P. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, *56*(2), 273–277. (Cit. on p. [35](#)).
- Bhagwat, S., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2013). USDA database for the flavonoid content of selected foods. (Cit. on pp. [11](#), [13](#)).
- Bilman, E. M., van Trijp, J. C. M., & Renes, R. J. (2010). Consumer perceptions of satiety-related snack food decision making. *Appetite*, *55*(3), 639–47. (Cit. on p. [26](#)).
- Bisogni, C. A., Falk, L. W., Madore, E., Blake, C. E., Jastran, M., Sobal, J., & Devine, C. M. (2007). Dimensions of everyday eating and drinking episodes. *Appetite*, *48*(2), 218–231. (Cit. on p. [26](#)).

- Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., & Villa, T. G. (1994). Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, *40*(11), 974–7. (Cit. on p. 86).
- Blanco, P., Sieiro, C., & Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, *175*(1), 1–9. (Cit. on p. 17).
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, *18*(1), 1–29. (Cit. on p. 25).
- Boyer, J. & Liu, R. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, *3*(1), 5. (Cit. on p. 29).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25–30. (Cit. on p. 53).
- Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(7), 1481–1487. (Cit. on p. 25).
- Brazelton, D. & Strik, B. C. (2007). Perspective on the us and global blueberry industry. *Journal American Pomological Society*, *61*(3), 144. (Cit. on p. 4).
- Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Food Science*, *73*(5), H72–H79. (Cit. on pp. 16, 82, 83).
- Bueno, J. M., Sáez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jiménez, A. M., Fett, R., & Asuero, A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake

of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(2), 126–151. (Cit. on p. 115).

Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E. I., Sharon, N., & Neeman, I. (2000). A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits helicobacter pylori adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 29(4), 295–301. (Cit. on p. 30).

Capanoglu, E., de Vos, R. C. H., Hall, R. D., Boyacioglu, D., & Beekwilder, J. (2013). Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. *Food Chemistry*, 139(1-4), 521–6. (Cit. on p. 15).

Carbonell, J., Tárrega, A., Gurrea, M., & Sentandreu, E. (2011). Chilled orange juices stabilized by centrifugation and differential heat treatments applied to low pulp and pulpy fractions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 315–319. (Cit. on pp. 65, 111).

Carbonneau, M. A., Léger, C. L., Monnier, L., Bonnet, C., Michel, F., Fouret, G., ... Descomps, B. (1997). Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51(10), 682–690. (Cit. on p. 31).

Cassano, A., Conidi, C., & Drioli, E. (2011). Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *Journal of Food Engineering*, 107(3-4), 366–373. (Cit. on p. 52).

Castañeda-Ovando, a., Pachecoherandez, M., Paezherandez, M., Rodriguez, J., & Galanvidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. (Cit. on p. 52).

Cavanagh, H. M. A., Hipwell, M., & Wilkinson, J. M. (2003). Antibacterial activity of berry fruits used for culinary purposes. *Journal of Medicinal Food*, 6(1), 57–61. (Cit. on p. 30).

- Cerdán-Calero, M., Izquierdo, L., & Sentandreu, E. (2013). Valencia Late orange juice preserved by pulp reduction and high pressure homogenization: Sensory quality and gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatiles. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(2), 476–483. (Cit. on pp. 65, 111).
- Charm, S. E., Longmaid III, H. E., & Carver, J. (1977). A simple system for extending refrigerated, nonfrozen preservation of biological material using pressure. *Cryobiology*, *14*(5), 625–636. (Cit. on p. 20).
- Coppens, P., Da Silva, M. F., & Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: a framework based on safety. *Toxicology*, *221*(1), 59–74. (Cit. on p. 35).
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(1), 85–91. (Cit. on p. 102).
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., & Dumay, E. (2009). Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids*, *23*(3), 640–654. (Cit. on pp. 21, 99).
- Daroch, F., Hoeneisen, M., Gonzalez, C. L., Kawaguchi, F., Salgado, F., Solar, H., & Garcia, A. (2001). In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios*, *104*(408), 79–85. (Cit. on p. 30).
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 388–395. (Cit. on pp. 24, 25).
- De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., & Forestier, C. (2003). Persistence of Colonization of Intestinal Mucosa by a Probiotic

- Strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after Oral Consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1270–1273. (Cit. on p. 123).
- De Graaf, C. (2006). Effects of snacks on energy intake: an evolutionary perspective. *Appetite*, 47(1), 18–23. (Cit. on p. 26).
- De Pascual-Teresa, S., Moreno, D., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1679–703. (Cit. on pp. 12, 13).
- De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5331–5337. PMID: 11087482. (Cit. on pp. 12, 13).
- Doll, R. (1990). An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 119–131. (Cit. on p. 25).
- Donsi, F., Ferrari, G., Lenza, E., & Maresca, P. (2009). Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: Operating parameters and scale of operation. *Chemical Engineering Science*, 64(3), 520–532. (Cit. on p. 22).
- Dragsted, L. O., Strube, M., & Larsen, J. C. (1993). Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacology & Toxicology*, 72 Suppl 1, 116–35. (Cit. on p. 25).
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., & Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), 13–26. (Cit. on p. 22).



- Elattar, T. M. & Virji, A. S. (1999). The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Research*, 19(6B), 5407–5414. (Cit. on p. 31).
- Elia, M. & Cummings, J. H. (2007). Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(S1), S40–S74. (Cit. on p. 27).
- Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6896–902. (Cit. on p. 28).
- Fennema, O. R. (1996). Water and ice. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (pp. 17–94). New York: Marcel Dekker. (Cit. on p. 116).
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649–671. PMID: 18663616. (Cit. on p. 13).
- Fito, P. (1994). Modelling of vacuum osmotic dehydration of food. *Journal of Food Engineering*, 22(1-4), 313–328. (Cit. on p. 30).
- Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A., & Pardo, P. (1996). Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. *Journal of Food Engineering*, 27(3), 229–240. (Cit. on pp. 105, 112).
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret, N., Gras, M., Cháfer, M., Martínez-Monzó, J., ... Vidal, D. (2001). Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering. Application in functional fresh food development. *Journal of Food Engineering*, 49(2-3), 175–183. (Cit. on pp. 30, 35, 36).
- García Rubio, J. C., García Gonzalez de Lena, G., & Ciordia Ara, M. (2013). Situación actual del cultivo del arándano en el mundo. *Tecno-*

- logía Agroalimentaria. *Boletín informativo del SERIDA*, 12, 5–8. (Cit. on pp. 4, 6).
- Gardner, P. T., White, T. A., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin c, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4), 471–474. (Cit. on p. 29).
- Genin, N. & René, F. (1995). Analyse du rôle de la transition vitreuse dans les procédés de conservation agro-alimentaires. *Journal of Food Engineering*, 26(4), 391–408. (Cit. on p. 113).
- Giovanelli, G., Brambilla, A., & Sinelli, N. (2013). Effects of osmo-air dehydration treatments on chemical, antioxidant and morphological characteristics of blueberries. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 577–584. (Cit. on p. 115).
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In *Current protocols in food analytical chemistry* (pp. 1–13). John Wiley & Sons, Inc. (Cit. on p. 51).
- Gogate, P. R. & Pandit, A. B. (2008). Application of cavitation reactors for cell disruption for recovery of intracellular enzymes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(8), 1083–1093. (Cit. on p. 22).
- Gold, B. D., Colletti, R. B., Abbott, M., Czinn, S. J., Elitsur, Y., Hassall, E., ... Sherman, P. M. (2000). Helicobacter pylori infection in children: recommendations for diagnosis and treatment. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 31(5), pages. (Cit. on p. 29).
- Goodner, K. L., Rouseff, R. L., & Hofsommer, H. J. (2001). Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1146–1150. (Cit. on p. 36).

- Gras, M., Vidal-Brotóns, D., Betoret, N., Chiralt, A., & Fito, P. (2002). The response of some vegetables to vacuum impregnation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(3), 263–269. (Cit. on p. 35).
- Grassin, C. & Fauquembergue, P. (1996). Application of pectinases in beverages. *Progress in Biotechnology*, 14, 453–462. (Cit. on pp. 16, 111).
- Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., & Drilleau, J. (2002). Procyanidins are the most Abundant Polyphenols in Dessert Apples at Maturity. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 289–291. (Cit. on p. 114).
- Hager, A., Howard, L., Prior, R., & Brownmiller, C. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Black Raspberry Products. *Journal of Food Science*, 73(6), H134–H140. (Cit. on pp. 79, 83, 103).
- Harborne, J. B. (1993). *The flavonoids advances in research since 1986*. Chapman and Hall: London, UK. (Cit. on pp. 11–13).
- Harborne, J. B. & Baxter, H. (1999). *The handbook of natural flavonoids*. John Wiley & Sons. (Cit. on pp. 11, 12).
- Hasler, C. M. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges - a position paper from the american council on science and health. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3772–3781. (Cit. on p. 24).
- Hayashi, R. (1989). Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development. *Engineering and Food*, 2, 815–826. (Cit. on p. 20).
- Hayashi, R. (1990). Pressure-processed food: research and development. *San-Ei Publishing, Kyoto*. (Cit. on p. 20).
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome

- oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4107–4112. (Cit. on p. 12).
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 11(1), 1–21. (Cit. on p. 20).
- Hilz, H., Bakx, E. J., Schols, H. a., & Voragen, A. G. (2005). Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers*, 59(4), 477–488. (Cit. on p. 111).
- Hite, B. H., Giddings, N. J., & Weakley, C. E. (1914). The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *West Virginia University. Agricultural Experiment Station Bulletin*, 146, 1–67. (Cit. on p. 19).
- Höhn, A. (1996). Enzymes in the fruit juice and wine industry. In L. P. Somogyi, H. S. Ramaswamy, & Y. H. Hui (Eds.), *Processing fruits: science and technology, volume 1* (Chap. 4, pp. 95–115). CRC Press. (Cit. on p. 15).
- Holt, R. R., Lazarus, S. A., Sullards, M. C., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., ... Keen, C. L. (2002). Procyanidin dimer b2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 798–804. (Cit. on p. 12).
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A., Farkas, D., & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43. (Cit. on p. 20).
- Horie, Y., Kimura, K., Ida, M., Yosida, Y., & Ohki, K. (1991). Jam preparation by pressurization. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*. (Cit. on p. 20).

- Howell, A. B., Reed, J. D., Krueger, C. G., Winterbottom, R., Cunningham, D. G., & Leahy, M. (2005). A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry*, *66*(18), 2281–2291. Tannins and Related Polyphenols (Part 2). (Cit. on p. 28).
- Hunt, R. & Thomson, A. B. (1998). Canadian helicobacter pylori consensus conference. canadian association of gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology*, *12*(1), pages. (Cit. on p. 29).
- International Food Information Council. (2006). Retrieved from <http://www.ific.org/nutrition/functional>. (Cit. on p. 25)
- International Life Sciences Institute. (1999). Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *39*(3), 203–206. PMID: 10367185. (Cit. on p. 25).
- Irzyniec, Z., Klimczak, J., & Michalowski, S. (1995). Freeze-drying of the black currant juice. *Drying Technology*, *13*(1-2), 417–424. (Cit. on p. 113).
- Jaiswal, V., DerMarderosian, A., & Porter, J. R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.) *Food Chemistry*, *118*(1), 11–16. (Cit. on p. 115).
- Jastran, M. M., Bisogni, C. A., Sobal, J., Blake, C., & Devine, C. M. (2009). Eating routines. Embedded, value based, modifiable, and reflective. *Appetite*, *52*(1), 127–136. (Cit. on p. 26).
- Jepson, R. G. & Craig, J. C. (2007). A systematic review of the evidence for cranberries and blueberries in uti prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*(6), 738–745. (Cit. on p. 28).
- Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Vanrobaeys, F., Golay, P., Cotting, C., Lardeau, A., & Keely, B. J. (2008). High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3470–3477. (Cit. on p. 70).
- Johnston, C. S. & Bowling, D. (2002). Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(4), 525–529. (Cit. on p. 36).
- Joshipura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., ... Spiegelman, D. (2001). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*, 134(12), 1106–1114. (Cit. on p. 25).
- Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J., & Metche, M. (2002). Involvement of Blueberry Peroxidase in the Mechanisms of Anthocyanin Degradation in Blueberry Juice. *Journal of Food Science*, 67(3), 910–915. (Cit. on p. 77).
- Kader, F., Rove, B., Girardin, M., & Metche, M. (1996). Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries ( *Vaccinium corymbosum* , L . ) 55(1). (Cit. on p. 52).
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., & Metche, M. (1997). Mechanism of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Role of Blueberry Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(1), 31–34. (Cit. on p. 78).
- Kale, P. N. & Adsule, P. (1995). Citrus. In D. K. Salunkhe & S. Kadam (Eds.), *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing* (p. 57). CRC Press. (Cit. on p. 111).
- Kalt, W. (2005). Effects of Production and Processing Factors on Major Fruit and Vegetable Antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), R11–R19. (Cit. on p. 15).

- Kalt, W. & Dufour, D. (1997). Health functionality of blueberries. *Hort-Technology*, 7(3), 216–221. (Cit. on pp. 11, 28).
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215–227. (Cit. on p. 15).
- Khachik, F., Beecher, G. R., & Whittaker, N. F. (1986). Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(4), 603–616. (Cit. on p. 116).
- Kleinig, A. R. & Middelberg, A. P. (1998). On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenisation. *Chemical Engineering Science*, 53(5), 891–898. (Cit. on p. 22).
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Törrönen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1612–1619. (Cit. on p. 13).
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T. A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2010, April). Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3996–4000. (Cit. on p. 28).
- Labuza, T. P., Tannenbaum, S. R., & Karel, M. (1970). Water content and stability of low-moisture & intermediate-moisture foods. *Food Technology*. (Cit. on p. 116).
- Lajolo, F. M. (2002). Functional foods: latin american perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, S145–S150. (Cit. on p. 24).
- Landbo, A. K., Kaack, K., & Meyer, A. S. (2007). Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to

- increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 135–142. (Cit. on pp. 15, 81).
- Landbo, A. K. & Meyer, A. S. (2001, July). Enzyme-Assisted Extraction of Antioxidative Phenols from Black Currant Juice Press Residues ( *Ribes nigrum* ). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3169–3177. (Cit. on p. 16).
- Landbo, A. K. & Meyer, A. S. (2004). Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 503–513. (Cit. on pp. 14, 15, 74).
- Leandro Liberato, S. V., Hernández Galindo, M., Torroba Álvarez, L., Sánchez Miramón, F., Leandro Ciriza, S., Gómez Abadía, A., & Chueca Rodríguez, P. (2005). Infección por helicobacter pylori en población infantil: prevalencia, factores asociados e influencia sobre el crecimiento. *Anales de Pediatría*, 63, 489–494. (Cit. on p. 29).
- Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2002). Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. *Journal of Food Science*, 67(5), 1660–1667. (Cit. on pp. 15, 16, 52, 83).
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D.-O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6516–6520. (Cit. on pp. 25, 29).
- Leung, W. K., Chan, M. C., To, K.-F., Man, E. P., Ng, E. K., Chu, E. S., ... Sung, J. J. (2006). H. pylori genotypes and cytokine gene polymorphisms influence the development of gastric intestinal metaplasia in a chinese population. *American Journal of Gastroenterology*, 101(4), 714–720. (Cit. on p. 29).



- Lim, J., Yamasaki, Y., Suzuki, Y., & Ozawa, J. (1980). Multiple forms of endopolygalacturonase from *saccharomyces fragilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(3), 473–480. (Cit. on p. 16).
- Lunn, J. & Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin*, 32(1), 21–64. (Cit. on p. 27).
- Macheboeuf, M. A. & Basset, J. (1934). Die Wirkung sehr hoher Drucke auf enzyme. *Ergebnisse der Enzymforschung*, 3, 303–308. (Cit. on p. 20).
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. i. review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S–242S. (Cit. on p. 14).
- Maresca, P., Donsì, F., & Ferrari, G. (2011, June). Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices. *Journal of Food Engineering*, 104(3), 364–372. (Cit. on p. 22).
- Marlett, J. & Cheung, T. (1997). Database and quick methods of assessing typical dietary fiber intakes using data for 228 commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*. (Cit. on p. 14).
- Marquez, A., Dueñas, M., Serratosa, M. P., & Merida, J. (2012). Formation of Vitisins and Anthocyanin-Flavanol Adducts during Red Grape Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (Cit. on p. 115).
- Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., & Valenti, L. (2002). Wine, Biodiversity, Technology, and Antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 37–56. (Cit. on p. 15).
- Maurer, G., Fukuda, G., & Nielsen, S. (2005). Development of bean-based granola bars and cereal. *Cereal Foods World*. (Cit. on p. 27).

- McCann, M., Gill, C., Brien, G. O., Rao, J., McRoberts, W., Hughes, P., ... Rowland, I. (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1224–1230. (Cit. on p. 29).
- McGhie, T. K., Hunt, M., & Barnett, L. E. (2005). Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in new zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3065–3070. PMID: 15826060. (Cit. on p. 29).
- McIntyre, A. P., Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2013). Reducing values: dinitrosalicylate gives over-oxidation and invalid results whereas copper bicinchoninate gives no over-oxidation and valid results. *Carbohydrate Research*. (Cit. on pp. 86, 90).
- Mendoza, F., Verboven, P., Ho, Q. T., Kerckhofs, G., Wevers, M., & Nicolaï, B. (2010). Multifractal properties of pore-size distribution in apple tissue using X-ray imaging. *Journal of Food Engineering*, 99(2), 206–215. (Cit. on p. 110).
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., ... Corthésy-Theulaz, I. (1999). Effect of Whey-Based Culture Supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* Infection in Humans. *Digestion*, 60(3), 203–209. (Cit. on p. 29).
- Middelberg, A. P. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13(3), 491–551. (Cit. on p. 22).
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751. (Cit. on p. 25).
- Milner, J. A. (2002, November). Functional foods and health: a us perspective. *British Journal of Nutrition*, 88, S152–S158. (Cit. on p. 24).

- Mirmiran, P., Bahadoran, Z., Delshad, H., & Azizi, F. (2014). Effects of energy-dense nutrient-poor snacks on the incidence of metabolic syndrome: A prospective approach in Tehran Lipid and Glucose Study. *Nutrition*, *30*(5), 538–43. (Cit. on p. 26).
- Miyagi, Y., Om, A. S., Chee, K. M., & Bennink, M. R. (2000). Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutrition and Cancer*, *36*(2), 224–229. PMID: 10890034. (Cit. on p. 35).
- Molan, A. L. [A L], Lila, M. A., & Ravindran, G. (2010). Blueberries : Genotype-dependent variation in antioxidant, free-radical scavenging, and prebiotic activities. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 427–434. (Cit. on p. 28).
- Molan, A. L. [Abdul L.], De, S., & Meagher, L. (2009). Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *60*(6), 497–506. (Cit. on p. 70).
- Moore, E. K., Hoare, M., & Dunnill, P. (1990). Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: new evidence on mechanism. *Enzyme and Microbial Technology*, *12*(10), 764–770. (Cit. on p. 21).
- Morild, E. (1981). The theory of pressure effects on enzymes. *Advances in Protein Chemistry*, *34*, 93–166. (Cit. on p. 20).
- Muthayya, S., Thomas, T., Srinivasan, K., Rao, K., Kurpad, A. V., van Klinken, J.-W., ... de Bruin, E. a. (2007, January). Consumption of a mid-morning snack improves memory but not attention in school children. *Physiology & Behavior*, *90*(1), 142–50. (Cit. on p. 27).
- Nile, S. H. & Park, S. W. (2014). Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, *30*(2), 134–44. (Cit. on p. 28).

- Ogawa, H., Fukuhisa, K., Kubo, Y., & Fukumoto, H. (1990). Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in satsuma mandarin juice: effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*(5), 1219–1225. (Cit. on p. 20).
- Olmos, J. A., Ríos, H., Higa, R., & Group, t. A. H. E. S. (2000). Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Argentina: Results of a Nationwide Epidemiologic Study. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *31*(1). (Cit. on p. 29).
- OMS & FAO. (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Technical report series 916. Genova. (Cit. on p. 25).
- Ouchemoukh, S., Hachoud, S., Boudraham, H., Mokrani, A., & Louaileche, H. (2012). Antioxidant activities of some dried fruits consumed in Algeria. *LWT - Food Science and Technology*, *49*(2), 329–332. (Cit. on p. 115).
- Parada, J. & Aguilera, J. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, *72*(2), R21–R32. (Cit. on p. 25).
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2005). Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(18), 7029–7034. PMID: 16131107. (Cit. on p. 14).
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(1), 3–11. (Cit. on p. 114).
- Pelucchi, C., Talamini, R., Galeone, C., Negri, E., Franceschi, S., Dal Maso, L., ... La Vecchia, C. (2004). Fibre intake and prostate cancer risk. *International Journal of Cancer*, *109*(2), 278–280. (Cit. on p. 25).

- Picart, L., Thiebaud, M., René, M., Pierre Guiraud, J., Cheftel, J. C., & 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(04), 454–463. (Cit. on pp. 21, 22, 99).
- Popper, L. & Knorr, D. (1990). Applications of high-pressure homogenization for food preservation: high-pressure homogenization can be used alone or combined with lytic enzyme or chitosan to reduce the microbial population and heat treatment damage in foods. *Food Technology*, 44(7), 84–89. (Cit. on p. 20).
- Potter, R., Stojceska, V., & Plunkett, A. (2013). The use of fruit powders in extruded snacks suitable for Children’s diets. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 537–544. (Cit. on p. 27).
- Proctor, A. & Peng, L. (1989). Pectin transitions during blueberry fruit development and ripening. *Journal of Food Science*, 54(2), 385–387. (Cit. on p. 14).
- Prosky, L. (1999). What is fibre. current controversies. *Trends in Food Science & Technology*, 10(8), 271–275. (Cit. on p. 27).
- Prothon, F., Ahrné, L. M., Funebo, T., Kidman, S., Langton, M., & Sjöholm, I. (2001). Effects of combined osmotic and microwave dehydration of apple on texture, microstructure and rehydration characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 34(2), 95–101. (Cit. on p. 119).
- Qiao, F., Huang, L.-l., & Xia, W.-s. (2012). A study on microwave vacuum dried re-structured lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) mixed with purple sweet potato (*Ipomoea batatas*) snacks. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 653–658. (Cit. on p. 27).
- Rababah, T. M., Al-u’datt, M., Almajwal, A., Brewer, S., Feng, H., Al-Mahasneh, M., . . . Yang, W. (2012). Evaluation of the nutraceutical,

physiochemical and sensory properties of raisin jam. *Journal of Food Science*, 77(6), C609–13. (Cit. on p. 115).

Rahman, M. S., Al-Zakwani, I., & Guizani, N. (2005). Pore formation in apple during air-drying as a function of temperature: porosity and pore-size distribution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 979–989. (Cit. on p. 110).

Rangan, A. M., Randall, D., Hector, D. J., Gill, T. P., & Webb, K. L. (2008). Consumption of ‘extra’foods by Australian children: types, quantities and contribution to energy and nutrient intakes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(3), 356–364. (Cit. on p. 26).

Rangan, A. M., Schindeler, S., Hector, D. J., Gill, T. P., & Webb, K. L. (2009). Consumption of ‘extra’foods by Australian adults: types, quantities and contribution to energy and nutrient intakes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(7), 865–871. (Cit. on p. 26).

Rapisarda, P., Fanella, F., & Maccarone, E. (2000). Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2249–2252. (Cit. on p. 36).

Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311–319. Drying. (Cit. on p. 113).

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. (Cit. on p. 53).

Revilla, E., Carrasco, D., A., B., & Arroyo-García, R. (2009). *La composición antocianica y la biodiversidad de las poblaciones naturales de Vitis vinifera L. spp sylvestris*. (Cit. on p. 124).

Ribeiro, H. S., Guerrero, J. M. M., Briviba, K., Rechkemmer, G., Schuchmann, H. P., & Schubert, H. (2006). Cellular uptake of carotenoid-

- loaded oil-in-water emulsions in colon carcinoma cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9366–9369. PMID: 17147419. (Cit. on p. 30).
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375–83. (Cit. on p. 11).
- Rimm, E. B., Ascherio, A., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (1996). Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *Jama*, 275(6), 447–451. (Cit. on p. 25).
- Rivadeneira, M. F. & Kirschbaum, D. S. (2012). Inta-programa nacional frutales-cadena arándano. (Cit. on p. 8).
- Rivalain, N., Roquain, J., & Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology advances*, 28(6), 659–72. (Cit. on pp. 19, 20).
- Robards, K. & Antolovich, M. (1995). Methods for assessing the authenticity of orange juice. a review. *Analyst*, 120, 1–28. (Cit. on p. 36).
- Roberfroid, M. B. (2002). Global view on functional foods: european perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, S133–S138. (Cit. on p. 24).
- Roberts, W. G. & Gordon, M. H. (2003). Determination of the Total Antioxidant Activity of Fruits and Vegetables by a Liposome Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1486–1493. (Cit. on p. 31).
- Robin, J., Abbal, P., & Salmon, J. (1997). Fermeté et maturation du raisin. définition et évolution de différents paramètres rhéologiques au cours de la maturation. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31, 127–138. (Cit. on p. 50).

- Roger, H. (1895). Action des hautes pressions sur quelques bactéries. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, 7, 12–17. (Cit. on p. 19).
- Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo Scalzo, R., Nani, R. C., & Torreggiani, D. (2003). Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, 36(9–10), 999–1005. (Cit. on pp. 15, 52).
- Ryland, D., Vaisey-Genser, M., Arntfield, S. D., & Malcolmson, L. J. (2010, March). Development of a nutritious acceptable snack bar using micronized flaked lentils. *Food Research International*, 43(2), 642–649. (Cit. on p. 27).
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. (1999). Probiotics: how should they be defined. *Trends in Food Science & Technology*, 10(3), 107–110. (Cit. on p. 29).
- Sanders, M. E. (1999). Probiotics. *Food Technology*, 53, 67–77. (Cit. on p. 29).
- Sandri, I. G., Lorenzoni, C. M. T., Fontana, R. C., & da Silveira, M. M. (2013). Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 469–475. (Cit. on p. 16).
- Sani, D. (2013). *Evolución genómica por diseño molecular de levaduras industriales* (A. L. Navarro Marzal & R. Serrano Salom, Eds.). Universitat Politècnica de València. (Cit. on pp. 18, 84, 85).
- Sano, A., Yamakoshi, J., Tokutake, S., Tobe, K., Kubota, Y., & Kikuchi, M. (2003). Procyanidin b1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(5), 1140–1143. (Cit. on p. 12).
- Santos, I. S., Boccio, J., Davidsson, L., Hernandez-Triana, M., Huanca-Sardinas, E., Janjetic, M., . . . Thomas, J. (2009). *Helicobacter pylori* is



- not associated with anaemia in Latin America: results from Argentina, Brazil, Bolivia, Cuba, Mexico and Venezuela. *Public Health Nutrition*, 12(10), 1862–70. (Cit. on p. 29).
- Sato, A., Yamane, H., Hirakawa, N., Otobe, K., & Yamada, M. (1997). Varietal differences in the texture of grape berries measured by penetration tests. *Vitis-Geilweilerhof*, 36, 7–10. (Cit. on p. 50).
- Savidge, G., MacFarlane, A., Ball, K., Worsley, A., & Crawford, D. (2007). Snacking behaviours of adolescents and their association with skipping meals. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 4(1), 36. (Cit. on p. 26).
- Schulze, B., Hubbermann, E. M., & Schwarz, K. (2014). Stability of quercetin derivatives in vacuum impregnated apple slices after drying (microwave vacuum drying, air drying, freeze drying) and storage. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 426–433. (Cit. on p. 113).
- Schulze, M. B., Liu, S., Rimm, E. B., Manson, J. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2004). Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 348–356. (Cit. on p. 27).
- Scott, K. P., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2008). Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin*, 33(3), 201–211. (Cit. on p. 27).
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M. G., & Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(6), 360–367. (Cit. on p. 25).
- Seeram, N. P. & Nair, M. G. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocya-

nins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5308–5312. (Cit. on p. 11).

Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485–6501. PMID: 19580283. (Cit. on p. 14).

Sendra, J. M., Navarro, J. L., & Izquierdo, L. (1988). C18 solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices. *Journal of Chromatographic Science*, 26(9), 443–448. (Cit. on p. 36).

Shetty, K. & Wahlqvist, M. (2004). A model for the role of the proline-linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(1). (Cit. on p. 31).

Siddiqi, S. F., Titchener-Hooker, N. J., & Shamlou, P. A. (1997). High pressure disruption of yeast cells: the use of scale down operations for the prediction of protein release and cell debris size distribution. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(4), 642–649. (Cit. on p. 22).

Skrede, G., Wrolstad, R., & Durst, R. (2000). Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) *Journal of Food Science*, 65(2), 357–364. (Cit. on pp. 15, 16, 65, 83).

Skupień, K. (2006). Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.) *Folia Horticulturae*, 18(2), 47–56. (Cit. on p. 13).

Slade, L. & Levine, H. (2004). The food polymer science approach to understanding glass transitions in foods. In *Presented at the 42nd Fred W. Tanner Award Lecture, Chicago IFT Section, Illinois*. (pages). (Cit. on p. 116).

- Slavin, J. & Green, H. (2007). Dietary fibre and satiety. *Nutrition Bulletin*, 32, 32–42. (Cit. on p. 27).
- Sloan, A. E. (2012). Top 10 functional food trends. *Food Technology*, 66(4), 23–40. (Cit. on p. 35).
- Smith, J. & Hardacre, A. (2011). Development of an extruded snack product from the legume *Vicia faba minor*. *Procedia Food Science*, 1(Icef 11), 1573–1580. (Cit. on p. 26).
- So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., Moussa, M., & Carroll, K. K. (1996). Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer*, 26(2), 167–181. PMID: 8875554. (Cit. on p. 35).
- Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4–S6. (Cit. on p. 36).
- Sreeramulu, D. & Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in india. *Food Research International*, 43(4), 1017–1020. (Cit. on p. 70).
- Srivastava, A., Akoh, C. C., Yi, W., Fischer, J., & Krewer, G. (2007). Effect of Storage Conditions on the Biological Activity of Phenolic Compounds of Blueberry Extract Packed in Glass Bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2705–2713. (Cit. on pp. 15, 83).
- Stalmach, A., Troufflard, S., Serafini, M., & Crozier, A. (2009). Absorption, metabolism and excretion of choladi green tea flavan-3-ols by humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S1), S44–S53. (Cit. on p. 13).
- Stang, M., Schuchmann, H., & Schubert, H. (2001). Emulsification in high-pressure homogenizers. *Engineering in Life Sciences*, 1(4), 151–157. (Cit. on p. 21).

- Steinhart, H. (2006). Novel foods and novel processing techniques as threats and challenges to a hypersensitive world. In L. Gilissen, H. Wichers, H. Savelkoul, & R. Bogers (Eds.), *Allergy matters: new approaches to allergy prevention and management* (Chap. 8, Vol. 10, pp. 65–77). Wageningen UR Frontis Series. Springer. (Cit. on p. 35).
- Stojanovic, J. & Silva, J. L. (2007). Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, colour and chemical properties of rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, 101(3), 898–906. (Cit. on pp. 101, 118).
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kuban, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 607–616. (Cit. on p. 71).
- Suarez Valles, B., Santamaria Victorero, J., Mangas Alonso, J. J., & Blanco Gomis, D. (1994). High-performance liquid chromatography of the neutral phenolic compounds of low molecular weight in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(12), 2732–2736. (Cit. on p. 12).
- Sun-Waterhouse, D., Farr, J., Wibisono, R., & Saleh, Z. (2008). Fruit-based functional foods i: production of food-grade apple fibre ingredients. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), 2113–2122. (Cit. on p. 28).
- Sun-Waterhouse, D., Melton, L. D., O'Connor, C. J., Kilmartin, P. A., & Smith, B. G. (2008). Effect of apple cell walls and their extracts on the activity of dietary antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(1), 289–295. (Cit. on p. 28).
- Sun-Waterhouse, D., Smith, B. G., O'Connor, C. J., & Melton, L. D. (2008). Effect of raw and cooked onion dietary fibre on the antioxidant activity of ascorbic acid and quercetin. *Food Chemistry*, 111(3), 580–585. (Cit. on p. 28).

- Tanaka, T. & Hatanaka, K. (1992). Application of hydrostatic pressure to yoghurt to prevent its after-acidification. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 39, 173–177. (Cit. on p. 20).
- Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., ... Ogawa, H. (1997). Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*, 18(5), 957–965. (Cit. on p. 35).
- Thiebaud, M., Dumay, 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(6), 427–439. (Cit. on pp. 21, 22, 99).
- Thomas, C., McLean, L., Parker, R., & Ohlweiler, D. (1992). Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids*, 27(7), 543–550. (Cit. on p. 31).
- Timson, W. & Short, A. (1965). Resistance of microorganisms to hydrostatic pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, 7(1), 139–159. (Cit. on p. 20).
- Tomás-Barberán, F. A., Gil-Izquierdo, A., & Moreno, D. A. (2009). Bioavailability and metabolism of phenolic compounds and glucosinolates. In E. A. McClements D. J.; Decker (Ed.), *Designing functional foods: measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption* (Chap. 19, pp. 194–229). Woodhead Publishing Ltd. (Cit. on p. 14).
- Tsanova-Savova, S., Ribarova, F., & Gerova, M. (2005). Catechin and epicatechin in bulgarian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(7), 691–698. (Cit. on p. 12).
- Türkyilmaz, M., Yemiş, O., & Ozkan, M. (2012). Clarification and pasteurisation effects on monomeric anthocyanins and percent polymeric colour

- of black carrot (*Daucus carota* L.) juice. *Food Chemistry*, 134(2), 1052–8. (Cit. on p. 79).
- Vaillant, F., Millan, P., O'Brien, G., Dornier, M., Decloux, M., & Reynes, M. (1999). Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 42(4), 215–224. (Cit. on p. 15).
- Van Amelsvoort, J. M. M., Van Het Hof, K. H., Mathot, J. N. J. J., Mulder, T. P. J., Wiersma, A., & Tijburg, L. B. M. (2001). Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica*, 31(12), 891–901. PMID: 11780763. (Cit. on p. 12).
- Vargas, A., Perez, J., Zoffoli, J. P., & Perez, A. (2000). Evolucion de la textura de bayas de uva del cv. Thompson seedless. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 27(2), 117–126. (Cit. on p. 119).
- Verbeke, W. (2006). Functional foods: consumer willingness to compromise on taste for health. *Food Quality and Preference*, 17(1–2), 126–131. The First European Conference on Sensory Science of Food and Beverages: “A Sense of Identity”. (Cit. on p. 35).
- Villata, M. L. (2010). Blueberries. u.s. highbush blueberry council. Retrieved from [www.blueberry.org](http://www.blueberry.org). (Cit. on pp. 4, 5)
- Vinson, J. a., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., & Proch, J. (2005). Dried Fruits: Excellent in Vitro and in Vivo Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(1), 44–50. (Cit. on p. 113).
- Waterhouse, A. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1–8. (Cit. on pp. 53, 80).
- Wellmann, F., Griesser, M., Schwab, W., Martens, S., Eisenreich, W., Matern, U., & Lukacin, R. (2006). Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin. *FEBS Letters*, 580(6), 1642–8. (Cit. on p. 114).

- Whyte, A. & Williams, C. (2011, October). The effect on memory of an acute blueberry flavonoid intervention with 8–9 year old children. *Appetite*, 57(2), 567. (Cit. on p. 28).
- Williamson, G., Day, A. J., Plumb, G. W., & Couteau, D. (2000). Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions*, 28(2), 16–21. (Cit. on p. 25).
- Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A. W., & Kleinjans, J. C. S. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research*, 582(1-2), 155–162. (Cit. on p. 28).
- Wilson, D. (1974). High pressure sterilization. In *34th annual meeting of the institute of food technologists. new orleans, la. may* (pp. 12–15). (Cit. on p. 20).
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6520–6530. (Cit. on p. 13).
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44, 117–121. (Cit. on pp. 86, 88).
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224. (Cit. on p. 71).
- Yang, M., Tanaka, T., Hirose, Y., Deguchi, T., Mori, H., & Kawada, Y. (1997). Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on n-butyl-n-(4-hydroxy butyl) nitrosamine - induced urinary - bladder carcinoge-

nesis in male icr mice. *International Journal of Cancer*, 73(5), 719–724. (Cit. on p. 35).

Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7320–7329. (Cit. on p. 28).



Parte VII

Anexos



---

## Definiciones y legislaciones aplicables a la elaboración y venta de zumos

### En España

Los zumos de frutas y bebidas elaboradas a base de frutas deben adecuarse a las normativas alimentarias propias de cada región y país. En España, deben responder al Boletín Oficial del Estado (BOE) número 245 del 12 de octubre de 2013, que regula la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. En el Anexo I.A de esta norma se definen los siguientes productos:

1. Zumo de frutas: el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede. Se podrán reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta. Se autoriza la mezcla de zumos de frutas y de puré de frutas en la producción del zumo de frutas.
2. Zumo de frutas concentrado: El producto obtenido a partir de zumo de una o varias especies de fruta por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, la eliminación de agua será de al menos un 50%. Se podrán reincorporar al zumo de frutas concentrado el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.
3. Zumo de frutas a partir de concentrado: el producto obtenido al reconstituir zumo de frutas concentrado definido en el punto tres con agua potable que cumpla los criterios establecidos en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. El nivel mínimo de grados Brix del zumo reconstituido corresponderá al nivel de

---

grados Brix del zumo extraído de la fruta utilizada para elaborar el concentrado. Se podrán reincorporar al zumo de frutas a partir de concentrado el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta. El zumo de frutas a partir de concentrado se preparará según procesos de fabricación apropiados que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de un tipo medio de zumo de la fruta de la que procede. La mezcla de zumos de frutas y/o de zumos de frutas concentrados y de puré de frutas y/o de puré de frutas concentrado está autorizada para la producción de zumo de frutas a partir de concentrado.

4. Néctar de frutas: el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado que se obtenga por adición de agua con o sin adición de azúcares y/o de miel a los productos definidos en los puntos 1 a 3, al puré de frutas, y/o al puré de frutas concentrado, y/o a una mezcla de estos productos, y posea un contenido mínimo de zumo y/o de puré del 40 % del volumen de producto acabado para el arándano o mirtilo y del 30 % para el arándano rojo.

A los distintos zumos definidos anteriormente se le pueden adicionar los siguientes ingredientes:

- a) Vitaminas y minerales autorizados por el Reglamento (CE) N° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos.
- b) Aditivos alimentarios autorizados por el Reglamento (CE) N° 1333/2008, de 16 de diciembre.
- c) A los zumos de frutas, los zumos de frutas a partir de concentrado y los zumos de frutas concentrados: los aromas, las pulpas y las células restituidos.
- d) A los néctares de fruta: aromas, pulpas y células restituidos; azúcares y/o miel en una cantidad no superior al 20 % en peso respecto al peso total de los productos acabados, y/o edulcorantes.

---

Solamente podrá declararse que no se han añadido azúcares a un néctar de frutas, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si no se ha añadido al producto ningún monosacárido ni disacárido, ni ningún alimento utilizado por sus propiedades edulcorantes, incluidos los edulcorantes definidos en el Reglamento (CE) N° 1333/2008, de 16 de diciembre. Si los azúcares están naturalmente presentes en los néctares de frutas, en el etiquetado deberá figurar asimismo la siguiente indicación: “contiene azúcares naturalmente presentes”.

- e) Con el fin de corregir el sabor ácido: zumo de limón y/o de zumo de lima y/o de zumo concentrado de limón y/o de zumo concentrado de lima, en una cantidad no superior a 3 gramos por litro de zumo, expresada en ácido cítrico anhidro. Por otro lado, la elaboración de bebidas refrescantes se rige por una norma diferente a la de los zumos. Los requisitos se exponen en el BOE N°119 del 19 de mayo de 2011. Por bebida refrescante se entiende las bebidas analcohólicas, carbonatadas o no, preparadas con agua de consumo humano, aguas preparadas, agua mineral natural o de manantial (en lo sucesivo agua), que contengan uno o más de los siguientes ingredientes: anhídrido carbónico, azúcares, zumos, purés, disgregados de frutas y/o vegetales, extractos vegetales, vitaminas y minerales, aromas, aditivos autorizados u otros ingredientes alimenticios. En las bebidas refrescantes de zumo de frutas deberá señalarse además el porcentaje de zumo que contienen.

## **En Argentina**

En Argentina, la elaboración de productos alimenticios está regulada por el Código Alimentario Argentino (C.A.A.). En el capítulo XII de este código se expone todo lo relativo a “Jugos Vegetales”. A continuación se presenta un extracto de los artículos que se aplican a los zumos y néctares de frutas.

Art. 1040 - (Res 2067, 11.10.88) Se entiende por Jugos o Zumos Vegetales, los obtenidos por medios mecánicos de las frutas u hortalizas comestibles,

---

sanas, limpias y maduras. Podrán presentarse turbios debido a la presencia de sólidos insolubles propios de la fruta u hortaliza de la cual proceden. Deberán cumplir las siguientes exigencias:

1. Estarán libres de toda parte no comestible de la fruta u hortaliza de la cual proceden.
2. No contendrán más de 0.5 % v/v de alcohol etílico y no se hallarán en estado de fermentación.
3. Cumplirán con las tolerancias residuales para plaguicidas y otros agentes de tratamiento agrícola establecidas por las leyes vigentes.
4. Deberán presentarse conservados por alguno de los siguientes sistemas:
  - a) Por los métodos físicos según los Artículos. 160 a 166 del presente Código con declaración en el rotulado principal del método empleado con caracteres de buen tamaño, realce y visibilidad.
  - b) Mediante los siguientes conservadores químicos:
    - 1) Ácido benzoico (o su equivalente en sales de sodio) máx. 1.00 g/kg o
    - 2) Ácido sórbico (o su equivalente en sorbato de sodio) máx. 1.00 g/kg, o 1 g/kg de la mezcla expresada como ácidos, con la inserción en el rotulado principal con caracteres de buen realce y visibilidad y 2 mm de altura como mínimo de la leyenda “Con conservadores autorizados”.
5. Se expendrán en envases bromatológicamente aptos en los cuales el producto deberá ocupar como mínimo el 90 % v/v de su capacidad de agua.
6. Responderán a las normas individuales para cada jugo que establece el presente Código.

Quedan permitidas las siguientes operaciones:

- 
1. La sulfitación de los jugos. El contenido de dióxido de azufre total no será mayor de 60 mg/kg, debiendo indicarse en el rotulado “Con dióxido de azufre como antioxidante” o indicación equivalente, con caracteres de buen tamaño, realce y visibilidad.
  2. El agregado de ácido levo-ascórbico como antioxidante en la cantidad tecnológicamente adecuada, sin declaración en el rotulado.
  3. La carbonatación con dióxido de carbono con declaración en el rotulado.

Art. 1041 - (Res 2067, 11.10.88) Se entiende por Jugos o Zumos Vegetales a base (u obtenidos) de concentrados, los obtenidos por agregado de agua potable a jugo concentrado, que respondan a las exigencias del presente Código. Se admite la restitución de los componentes naturales volátiles perdidos en el proceso de concentración del jugo original o de la misma especie de fruta. Deberá responder a las exigencias del Artículo 1040.

Art 1043 - (Res 2067, 11.10.88) Se entiende por Jugo o Zumo endulzado..., y por Jugo endulzado de... a base (u obtenido) de concentrado (con la indicación en el espacio en blanco del nombre de la fruta u hortaliza de la cual procede) a los obtenidos a partir de los jugos definidos en los Artículos. 1040, 1041, respectivamente adicionados como máximo de 10 % p/v de azúcares nutritivos sólidos. No podrán ser adicionados de agentes aromatizantes, saborizantes, sustancias colorantes ni acidulantes.

Art 1045 - (Res 2067, 11.10.88) Se entiende por Jugo o Zumo mezcla de ... (con la indicación en el espacio en blanco del nombre de las frutas u hortalizas de las que proceden) al producto obtenido por la mezcla de hasta tres clases de jugos definidos en los Artículos. 1041 o 1042 que respondan a las exigencias del Artículo 1040.

Art 1065bis - (Dec 9005, 20.12.72) Con la denominación de Néctar de ... (damasco, ciruela, durazno, manzana, pera), se entiende el producto no fermentado pero fermentable, constituido exclusivamente por: No menos del 50 % en volumen del jugo y pulpa en las proporciones que existan normalmente en la fruta correspondiente; adicionado de una solución de edulcorantes nutritivos (azúcar blanco, dextrosa, azúcar invertido o sus mezclas,

---

o miel, con o sin el agregado de ácidos orgánicos: cítrico, tártrico, málico o sus mezclas. Envasado en un recipiente bromatológicamente apto, cerrado herméticamente y sometido a tratamiento térmico adecuado que asegure su conservación. Las frutas empleadas deberán ser maduras, sanas y limpias. La pulpa de la fruta deberá ser finamente dividida, tamizada y homogeneizada. El producto terminado deberá estar libre de fragmentos de hojas, piel, semillas o huesos, pedúnculos u otras sustancias extrañas. Tendrán el color, sabor y aroma propios de la fruta madura y no presentarán alteraciones producidas por microorganismos u otros agentes físicos, químicos o biológicos. No deberá contener residuos de plaguicidas. No podrán ser adicionados de sustancias espesantes o estabilizantes. Podrán ser adicionados de ácido l-ascórbico en cantidad tecnológicamente adecuada en función de antioxidante, pero no deberá ser mencionado en el rótulo ni como agregado, ni como antioxidante.

El equivalente a bebidas refrescantes en la legislación argentina está regulado por el siguiente artículo:

Art 996 - (Res Conjunta SPyRS N° 009 y SAGPyA N° 106 del 6.03.00)  
Se entiende por Bebidas sin Alcohol o Bebidas Analcohólicas, las bebidas gasificadas o no, listas para consumir, preparadas a base de uno o más de los siguientes componentes: Jugo, Jugo y Pulpa, Jugos Concentrados de frutas u Hortalizas, Leche, Extractos, Infusiones, Maceraciones, Percolaciones de sustancias vegetales contempladas en el presente Código, así como Aromatizantes/Saborizantes autorizados. El agua empleada, en su elaboración deberá responder a las exigencias del Artículo 982 o 985. Deberán presentar color, olor y sabor normales de acuerdo a su composición. No deberán contener alcohol etílico en cantidad superior a 0.5 % en volumen. Podrán ser adicionadas de:

1. Edulcorantes nutritivos autorizados por el presente Código.
2. Dióxido de carbono que cumpla con las exigencias del Artículo 1066 a una presión no menor de 1.5 atmósferas medida a 20°C.
3. Acidulantes, colorantes, conservadores, estabilizantes, emulsionantes, espesantes, exaltadores de sabor, espumantes, humectantes, reguladores de acidez, antioxidantes, aromatizantes-saborizantes, antiespu-



---

mantes y secuestrantes consignados en la Resolución (ex MSyAS) N° 587/97 y en las condiciones de uso que se señalan en la misma.

4. Cuando se adicione ácido ascórbico como antioxidante se hará sin declarar en el rótulo: “Contiene Vitamina C”.
5. En las bebidas no gasificadas se admitirá la adición de Hexametafosfato de Sodio con la función de agente secuestrante con un límite máximo de 0.1 g/100 ml (1000 ppm).
6. Se podrán emplear cremogenados que cumplan con las exigencias del Artículo 1051 del presente Código en cantidad no superior al 3% p/v, por cada 10% v/v de jugo, con declaración en el rótulo. En ningún caso puede computarse como jugo.