

EFECTO DEL TRATAMIENTO DE UN SISTEMA EN CONTINUO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDO POR ULTRASONIDOS SOBRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD Y LA INACTIVACIÓN DE LA FLORA NATURAL DEL ZUMO DE NARANJA

Hoyas A., Benedito J. ¹

RESUMEN

El zumo de naranja es uno de los zumos procesados más consumidos a nivel mundial. Sin embargo, para su conservación se requiere de un tratamiento mediante calor, el cual provoca grandes cambios organolépticos y nutricionales. En el presente trabajo se realizó un tratamiento alternativo mediante CO₂ supercrítico asistido por ultrasonidos (SC-CO₂+HPU) en continuo con el fin de comprobar la viabilidad de su uso como método de conservación de zumo de naranja, evaluando la posible reducción de los inconvenientes atribuidos a la pasteurización térmica. Los resultados experimentales mostraron que el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU consiguió la completa inactivación de la población inicial de *E.coli* y aerobios mesófilos totales, sin embargo, la población de *S.cerevisiae* no se inactivó totalmente, aunque se alcanzaron reducciones de más del 99%. Además, tras comparar la tecnología de SC-CO₂+HPU con el tratamiento convencional de pasteurización se observaron cambios inferiores al 1% en el pH y °Brix del zumo, así como cambios del 4% en la acidez. Por otra parte, con la tecnología de SC-CO₂+HPU se obtuvo un mayor índice browning (211%), mayores cambios en el color, así como un aumento de la actividad enzimática de la ascorbato oxidasa. Sin embargo, se consiguió mejorar la nube del zumo en un 173%, así como también se obtuvo una menor reducción de compuestos fenólicos (6.5%) y ácido ascórbico (5.5%) con respecto al zumo pasteurizado. Asimismo, se obtuvo un aumento de la capacidad antioxidante (12%) con respecto al zumo natural. Por tanto, la tecnología propuesta permite reducir algunos de los efectos negativos en los parámetros de calidad del zumo atribuidos a la tecnología térmica convencional, por lo que su aplicación a nivel industrial puede representar una alternativa a la misma.

PALABRAS CLAVE: Fluidos supercríticos, ultrasonidos, zumo de naranja, flora natural, parámetros de calidad.

RESUM

El suc de taronja és un dels sucs processats més consumits a nivell mundial. No obstant això, per a la seua conservació es requereix d'un tractament per mitjà de calor, el qual provoca grans canvis organolèptics i nutricionals. En el present treball es va realitzar un tractament alternatiu per

¹ Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, C/ Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

mitjà de CO₂ supercrític assistit per ultrasons (SC-CO₂+HPU) en continu a fi de comprovar la viabilitat del seu ús com a mètode de conservació de suc de taronja, avaluant la possible reducció dels inconvenients atribuïts a la pasteurització tèrmica. Els resultats experimentals van mostrar que el tractament per mitjà de SC-CO₂+HPU va aconseguir la completa inactivació de la població inicial de *E.coli* i aerobis mesòfils totals, no obstant això, la població de *S.cerevisiae* no es va inactivar totalment, encara que es van aconseguir reduccions de més del 99%. A més, després de comparar la tecnologia de SC-CO₂+HPU amb el tractament convencional de pasteurització es van observar canvis inferiors al 1% en el pH i °Brix del suc, així como canvis del 4% en l'acidesa. D'altra banda, amb la tecnologia de SC-CO₂+HPU es va obtenir un major índex browning (211%), majors canvis en el color, així com un augment de l'activitat enzimàtica de l'ascorbato oxidasa. No obstant això, es va aconseguir millorar el núvol del suc en un 173%, així com també es va obtenir una menor reducció de compostos fenòlics (6.5%) i àcid ascòrbic (5.5%) respecte al suc pasteuritzat. Així mateix, es va obtenir un augment de la capacitat antioxidant (12%) respecte al suc natural. Per tant, la tecnologia proposada permet reduir alguns dels efectes negatius en els paràmetres de qualitat del suc atribuïts a la tecnologia tèrmica convencional, per la qual cosa la seua aplicació a nivell industrial pot representar una alternativa a aquesta.

PARAULES CLAU: Fluids supercrítics, ultrasons, suc de taronja, flora natural, paràmetres de qualitat.

ABSTRACT

Orange juice is one of the most worldwide consumed processed juices. However, it requires heat treatments for its preservation, which causes organoleptic and nutritional changes. In this paper an alternative treatment was assessed by using a continuous system of supercritical CO₂ assisted by ultrasound (SC-CO₂+HPU) in order to test the feasibility of its use as a method of preserving orange juice, evaluating the possible reduction of the disadvantages attributed to heat pasteurization. The experimental results showed that treatment with SC-CO₂+HPU got the complete inactivation of the initial population of *E. coli* and total aerobic bacteria, however, the population of *S. cerevisiae* was not completely inactivated, although reductions were achieved over 99%. Moreover, after comparing the technology of SC-CO₂+HPU with conventional pasteurization, changes less than 1% were obtained in pH and °Brix of juice and changes of 4% in acidity. Furthermore, with the technology of SC-CO₂+HPU was obtained a higher browning index (211%), greater changes in color as well as increasing the enzymatic activity of ascorbate oxidase. However, it was possible to improve the cloud juice by 173%, and also yielded a lower reduction of phenolic compounds (6.5%) and ascorbic acid (5.5%) respect to the pasteurized juice. Moreover, the antioxidant capacity (12%) was increased with respect to the natural juice. Therefore, the proposed technology can reduce some negative effects on juice's quality parameters attributed to conventional thermal technology; therefore, its application to industrial scale can be an alternative to it.

KEYWORDS: Supercritical fluids, ultrasound, orange juice, natural microorganisms, quality parameters.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, mientras el consumo de cítricos frescos ha disminuido en los países desarrollados, el consumo de zumos de fruta procesados ha aumentado (Tiwari et al., 2009a). Entre éstos, el zumo de naranja es, a nivel mundial, uno de los zumos procesados predominantes en la industria de las bebidas, debido a su alto valor nutricional, sus componentes bioactivos (compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina C), así como a sus buenas propiedades organolépticas (Ortuño et al., 2014).

A pesar de su bajo pH, este zumo requiere ser procesado, ya que posee una estabilidad limitada debido al crecimiento microbiano y a la actividad enzimática, que pueden dar lugar a cambios organolépticos indeseables o a la degradación de compuestos de interés durante el almacenamiento (Fabroni et al., 2010; Ferrentino et al., 2009; Liu et al., 2010).

Aunque la pasteurización sigue siendo el método de conservación más empleado para la conservación de zumos, existe un creciente interés en el desarrollo de técnicas alternativas que reduzcan al mínimo tanto los cambios en sus propiedades nutricionales, como los cambios organolépticos, obteniendo de esta forma alimentos más frescos y naturales que con la tecnología térmica tradicional. Entre estas técnicas, destaca el procesamiento por altas presiones hidrostáticas (HHP) y los campos eléctricos pulsados (PEF), las cuales dan lugar a una mejor retención de la calidad y a una vida útil adecuada; sin embargo, no son suficientes para inactivar enzimas como la pectinmetilesterasa (PME), lo que da lugar a un zumo inestable durante el almacenamiento, a menos que estas técnicas no-térmicas se combinen con temperaturas elevadas. Además, estas nuevas tecnologías suponen un alto coste, lo que representa un obstáculo importante para su aplicación industrial (Niu et al., 2010; Tiwari et al., 2009b; Vervoort et al., 2011). Por otra parte, el procesamiento por HHP consiste actualmente en un proceso por lotes, lo cual limita su uso debido a la baja capacidad de procesamiento (Damar & Balaban, 2006).

Es por ello, que para grandes volúmenes como es el caso del procesamiento del zumo de naranja, es más deseable un proceso continuo. El procesamiento en continuo puede conseguirse mediante la aplicación de fluidos supercríticos, una técnica de conservación no-térmica alternativa, donde el fluido supercrítico y el producto se bombean a través del sistema y se mezclan a la presión requerida para su correcto procesamiento (Fabroni et al., 2010).

Los fluidos supercríticos empleados habitualmente en procesos de extracción, difieren de los solventes ordinarios al tener un poder de solubilización similar al de un líquido (densidad similar), así como también propiedades de un gas, como una alta difusividad y una baja viscosidad; y por tanto, buenas propiedades de transporte. Estas propiedades pueden ser controladas mediante cambios de temperatura y presión (Calix et al., 2008; Niu et al., 2010; Wimmer & Zarevúcka, 2010).

Entre los fluidos supercríticos, el CO₂ (SC-CO₂) se considera una buena alternativa debido a su naturaleza no tóxica ni inflamable, así como a su presión y temperatura críticas relativamente bajas (7.36 MPa, 31.0°C), lo que permite la conservación de compuestos térmicamente inestables. Además, el SC-CO₂ es de bajo costo debido a que el CO₂ empleado es un

subproducto de los procesos industriales, aparte de ser más económico el procesamiento en sí, al consumir menor energía.

Por otra parte, el SC-CO₂ posee un efecto letal sobre las bacterias, siendo este efecto directamente proporcional a la presión, temperatura y tiempo de exposición aplicado. El SC-CO₂ actúa de la forma siguiente: en primer lugar, se produce su solubilización en la fase líquida externa, lo que provoca la formación de ácido carbónico (el cual se disocia en bicarbonato y un ión de hidrógeno), y por tanto, un aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana celular, aumentando así la difusión de CO₂ en la célula y provocando una disminución del pH intracelular. De esta manera, se produce la inactivación/inhibición del metabolismo celular de enzimas clave para los microorganismos. Con todo ello, se produce un desorden en el equilibrio de los electrolitos intracelulares y la eliminación de constituyentes de vital importancia de las células y las membranas celulares (Fabroni et al., 2010; Kincal et al., 2005; Ortuño et al., 2013).

A pesar de todas las ventajas expuestas anteriormente, incluso en los sistemas continuos, son necesarios largos tiempos de tratamiento con SC-CO₂, e incluso, altas presiones o temperaturas para garantizar la seguridad y la estabilidad del alimento, lo que limita la eficiencia de los procesos de inactivación, afectando de esta forma a la calidad del alimento, así como también incrementando el coste del proceso. En este sentido, cada vez hay más interés científico en la intensificación de procesos. Una de las técnicas sinérgicas que mejoran los mecanismos de inactivación del SC-CO₂ es la tecnología de ultrasonidos de alta potencia (HPU), la cual acelera y mejora los procesos de transferencia de masa (Ortuño et al., 2013, 2014).

Con el fin de comprender dicha sinergia, cabe sumarle a las ventajas comentadas anteriormente ofrecidas por el SC-CO₂, las producidas por la propagación de los HPU. Éstos, provocan en un líquido el fenómeno de cavitación debido a la compresión y dilatación cíclica producida por los HPU al desplazarse por el medio, produciéndose de esta forma microburbujas que colapsan violentamente con el material, aumentando así la temperatura y la presión de forma localizada, además de provocar efectos de cizalladura. En consecuencia, se produce un efecto de pasteurización sin causar un aumento significativo de la temperatura, reduciendo a su vez el tiempo de procesamiento, así como su consumo energético (Abid et al., 2013; Tiwari et al., 2008a, 2009a). Por tanto, con el empleo de SC-CO₂+HPU, se produce una aceleración de la velocidad de solubilización del SC-CO₂ en el líquido, así como un aumento de la transferencia de masa debido a la agitación vigorosa producida por el campo ultrasónico, permitiendo de esta forma la rápida saturación de CO₂ en el medio, y acelerando así los mecanismos de inactivación. Además, la cavitación y agitación producidas por los HPU provocan daños en la pared celular, aumentando la penetración de SC-CO₂, la extracción de compuestos intracelulares y la muerte de las células microbianas. Asimismo, los efectos térmicos, químicos y mecánicos inducidos por la cavitación generada por los HPU contribuyen a la inactivación enzimática a partir de cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de las mismas (Tiwari et al., 2008a).

Un estudio realizado por Ortuño et al. (2012) sobre la aplicación de SC-CO₂ en discontinuo al zumo de naranja (350 bar, 36°C) demuestra que son necesarios largos tiempos de tratamiento (25 minutos) para lograr la reducción de únicamente 1 ciclo logarítmico de *E.coli* DH1. Sin embargo,

Kincal et al. (2005) lograron una reducción de 5 ciclos logarítmicos de patógenos (*E.coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*) en apenas 10 minutos tras el tratamiento de zumo de naranja mediante SC-CO₂ en un proceso en continuo (210 bar, 34.5°C). De esta forma, se concluye que en los sistemas continuos, el tiempo de tratamiento es reducido drásticamente en comparación con los sistemas por lotes, incluso empleando condiciones de proceso más suaves. Por otra parte, existen pocos estudios sobre la aplicación de SC-CO₂+HPU en discontinuo; dos de ellos demuestran la completa inactivación de la población de *E. coli* y *S. cerevisiae* en el zumo de naranja tras 1.5 min (225 bar, 36°C) y 5 min (350 bar, 36°C) de tratamiento, respectivamente, no observándose dicha reducción microbiana bajo las mismas condiciones de proceso (presión, temperatura y tiempo) empleando únicamente SC-CO₂ (Ortuño et al., 2012, 2013). Sin embargo, la aplicación de estas nuevas técnicas sinérgicas en discontinuo posee una baja capacidad de procesamiento, haciendo inviable su aplicación industrial. Es por ello que existe un creciente interés científico en su aplicación a procesamientos en continuo, no encontrándose referencias bibliográficas al respecto. Asimismo, resulta interesante conocer el efecto de la técnica de SC-CO₂+HPU en un proceso en continuo sobre la calidad del alimento procesado en vistas a su implementación industrial. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto del tratamiento mediante SC-CO₂+HPU en continuo sobre los parámetros de calidad y la inactivación de la flora natural del zumo de naranja, y compararlo con un tratamiento térmico convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zumo de naranja

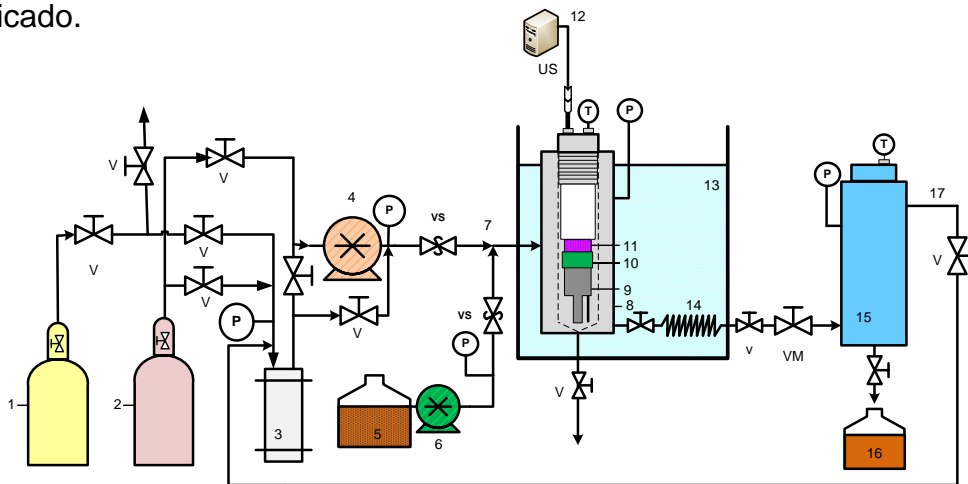
Para la preparación del zumo de naranja se partió de fruta fresca. Las naranjas (*Citrus sinensis*), de la variedad Navelate, se adquirieron en un mercado local y se mantuvieron a 4°C durante dos días como máximo. Previo a la elaboración del zumo, las naranjas fueron atemperadas (~25°C) y posteriormente peladas, troceadas y exprimidas mediante un extractor de laboratorio (Ultra Juicer, Robot Coupe J80, USA). La extracción del zumo se llevó a cabo justo en el momento previo a la aplicación del tratamiento; por lo que cada experiencia requirió una nueva extracción. En cada una de las experiencias se extrajo alrededor de 1.5 L de zumo, de los cuales 1 L fue destinado a su procesamiento, tanto en el caso del SC-CO₂+ HPU, como en el de la pasteurización térmica convencional; y los 0.5 L restantes sirvieron de control.

Procesamiento mediante SC-CO₂ + HPU

Las experiencias realizadas con SC-CO₂+HPU se llevaron a cabo en una planta de fluidos supercríticos a escala piloto, la cual lleva incorporado un equipo de ultrasonidos (Figura 1). En primer lugar, se abrió la bala de CO₂ (2) llenando el depósito de reserva de CO₂ o pulmón (3). Seguidamente, se abrió la bala de N₂ (1) con el fin de presurizar el CO₂ contenido en el pulmón, el cual se encontraba en una cámara de congelación a -18°C. A

continuación, se procedió al llenado de las bombas mediante la absorción de CO₂ procedente de dicho pulmón. Una vez alcanzada la presión deseada en el sistema, así como la temperatura esperada en el baño termostático (ambas controladas automáticamente), se procedió a la preparación de la muestra. Tras ello, se conectó el equipo de ultrasonidos (12), y se cargó la muestra en el depósito del líquido a tratar (5), donde fue impulsada por una bomba (6) (previamente estandarizada para conseguir el caudal deseado), hasta el punto de mezcla (7), donde el CO₂ entró en contacto con el zumo, mezclándose a lo largo de todo el sistema (8,14) hasta llegar a la sección final. En dicha sección se procedió a la despresurización y separación del zumo y el CO₂ mediante un separador (15). Seguidamente, el CO₂ se recirculó al depósito de reserva para volver a ser empleado (17). Las muestras tratadas se extrajeron por un tubo situado en la parte inferior del depósito de separación, tras la limpieza y desinfección del mismo con etanol. Al finalizar cada una de las experiencias, la planta de fluidos supercríticos se limpió y desinfectó con solución desinfectante, alcohol y agua.

El procesamiento mediante SC-CO₂+HPU en continuo se realizó a 1 L de zumo de naranja a 100 bar y a distintas temperaturas (31, 36 y 41°C) con el fin de determinar el efecto de la temperatura sobre los parámetros de calidad y la inactivación de la flora natural del zumo de naranja. La velocidad de flujo del zumo fue de 25 ml/min y el tiempo de residencia de 1.72 min. Las condiciones del proceso se eligieron a partir de experiencias previas que demostraron que esas condiciones eran suficientes para alcanzar niveles aceptables de inactivación. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.



- | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1- Bala N ₂ | 12- Generador US |
| 2- Bala CO ₂ | 13- Baño termostático |
| 3- Reserva CO ₂ | 14- Serpentín |
| 4- Bomba inyectora CO ₂ | 15- Depósito de separación |
| 5- Depósito líquido a tratar | 16- Líquido tratado |
| 6- Bomba dosificadora de líquido | 17- Recirculación de CO ₂ |
| 7- Punto de mezcla | V- Válvula |
| 8- Reactor de tratamiento | VS- Válvulas anti-retorno |
| 9- Transductor de US | VM- Válvula micrométrica |
| 10- Sistema de aislamiento | P- Manómetro |
| 11- Cerámicas | T- Sensor de temperatura |

FIGURA 1. Esquema del equipo de fluidos supercríticos asistido por ultrasonidos en continuo

Procesamiento térmico

Para evaluar el efecto sobre los parámetros de calidad y la inactivación de la flora natural del zumo de naranja mediante la tecnología térmica convencional, se realizó un tratamiento térmico tradicional en un pasteurizador (Pasc Computer Controlled Laboratory Pasteuriser, Edibon, Spain) a 90°C durante 1 minuto. Para ello, el zumo se colocó en un tanque de alimentación, donde fue impulsado por una bomba a un intercambiador de calor, en el que se calentó rápidamente a la temperatura deseada, trasladándose hasta el tubo de mantenimiento donde permaneció el tiempo de procesado. Tras el tratamiento, el zumo se llevó de inmediato a un baño de agua fría (4°C). De esta forma, fue posible comparar los resultados (calidad y microbiología) del procesamiento mediante SC-CO₂+HPU con el tratamiento térmico convencional.

Análisis microbiológicos del zumo de naranja

FLORA NATURAL

Para determinar el efecto tanto del tratamiento mediante SC-CO₂+HPU en continuo como de la pasteurización térmica convencional sobre la flora natural del zumo de naranja, se llevaron a cabo recuentos de *E. coli*, aerobios mesófilos totales y *S.cerevisiae*, mediante el método de recuento en placa. Para ello se realizaron diluciones seriadas del zumo tratado y el control con agua destilada esterilizada. 100 µL de la dilución apropiada (10⁻¹ y 10⁻²) se sembraron por triplicado en placas de agar LB, PCA, e YPD, para *E.coli*, aerobios mesófilos totales, y *S.cerevisiae*, respectivamente; y se incubaron durante 24 h a 37, 35 y 30°C, respectivamente, procediendo posteriormente a su conteo. Los resultados se expresaron como log₁₀ (N/N₀), donde N₀ es el número inicial de células en la muestra de control y N es el número de células en la muestra después de los diferentes tratamientos.

Análisis físico-químicos del zumo de naranja

pH y °BRIX

El pH de las muestras se midió a partir un medidor digital de pH (Crison pH 25, Spain). Las mediciones de pH se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente para cada muestra.

Para la determinación de los grados Brix se empleó un refractómetro digital (Digital Hand-held Pocket Refractometer, Atago, Japan). Las mediciones se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente. El resultado obtenido se expresó como °Brix (g de sólidos solubles/100 ml zumo).

ACIDEZ TITULABLE

La acidez titulable se determinó según la metodología descrita por Kincal et al. (2006), valorando el zumo con NaOH 0.1 N. Los resultados se obtuvieron por triplicado y se expresaron como gramos de ácido crítico por cada 100 ml de zumo mediante la Ecuación 1.

$$\text{Acidez titulable (g ácido/ 100 ml)} = \frac{V_1 \cdot N \cdot F \cdot 100}{V_2} \quad (1)$$

donde: N = normalidad de NaOH; V₁ = volumen de NaOH empleado en la titulación; V₂ = volumen de muestra tomada (ml zumo); y F = peso equivalente/1000 (ácido cítrico= 0.064).

COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método descrito por Gao et al. (2000), aplicando un factor de dilución 1:3 a las muestras. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó con respecto a una curva estándar de ácido gálico con puntos entre 110.4 y 552 ppm. Los resultados se expresaron como equivalentes o ppm de ácido gálico.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (FRAP)

La capacidad antioxidante se determinó a partir del método descrito por Pulido et al. (2000) tras la aplicación de un factor de dilución 1:20 a las muestras. Para obtener los resultados, se realizó una curva de calibrado de Trolox con puntos entre 50 y 750 μM, representando la concentración del patrón frente a la absorbancia a los 30 minutos. De esta manera, el FRAP de una muestra a los 30 minutos se expresa como concentración equivalente de Trolox a los 30 minutos.

ÍNDICE BROWNING

Mediante el índice browning se evaluó el efecto del tratamiento sobre el pardeamiento del zumo. Para ello, se empleó un método espectrofotométrico tras el centrifugado y filtrado de las muestras. Este método es el descrito por Xu et al. (2011), aunque en este caso, el tiempo empleado para la centrifugación fue de 10 minutos y las revoluciones aplicadas fueron 12600 rpm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

COLOR

El color se midió a partir de un colorímetro (Spectrophotometer CM-2500d, Konica Minolta, Japan) basado en las coordenadas de color (L*, a*, y b*). Los valores de color se expresan como L* (blancura o brillo/ oscuridad), a* (eje verde/rojo) y b* (eje azul/amarillo) (Ferrentino et al., 2009; Kincal et al., 2006). Las mediciones se realizaron por triplicado.

La diferencia total de color (ΔE) se determinó a partir de la Ecuación 2, que indica la magnitud del cambio de color después del tratamiento.

$$\Delta E = [(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2]^{1/2} \quad (2)$$

donde: los valores L, a y b sin subíndice corresponden a las muestras tratadas y aquellos con subíndice 0 a las muestras sin tratar. Las diferencias de color perceptibles se califican como muy grandes (ΔE > 3), grandes (ΔE < 3) y pequeñas diferencias (ΔE < 1.5) (Tiwari et al., 2008b).

NUBE

Para evaluar la pérdida de nube o clarificación del zumo producida tras el tratamiento, se empleó un método espectrofotométrico tras el centrifugado de las muestras. Este método es descrito por Ferrentino et al. (2009). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

A partir del valor de la absorbancia obtenida, y mediante la Ecuación 3, se obtuvo el porcentaje de nube.

$$\text{Porcentaje de nube: } \frac{\text{valor nube final}-\text{valor nube inicial}}{\text{valor nube inicial}} \cdot 100 \quad (3)$$

ÁCIDO ASCÓRBICO

El contenido en ácido ascórbico se determinó por su acción reductora mediante su valoración con el colorante azul 2,6-diclorofenolindofenol, a partir del método descrito por la AOAC (AOAC, 967.21). Las mediciones se realizaron por triplicado.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ASCORBATO OXIDASA (AOX)

La actividad enzimática de AOX (o degradación del ácido ascórbico) se evaluó siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Hagerman & Austin (1986). Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado. La interpretación de los resultados se realizó mediante los valores de absorbancia del zumo natural y tratado obtenidos en función del tiempo, representándolos en gráficas independientes por cada réplica. A partir de las pendientes de las rectas ajustadas en dichas gráficas se determinó la actividad de AOX de los zumos, dividiendo dicho valor por el volumen de muestra empleado en el análisis. El resultado se expresó como UI/ml min, donde UI son unidades internacionales, ya que los resultados se expresan en relación a la absorbancia obtenida. A partir de las actividades enzimáticas se pudo determinar la actividad relativa (Ecuación 4) para conocer la variación de dicha actividad con respecto al zumo natural (control).

$$\text{Actividad relativa (\%)} = \frac{\text{actividad muestra tratada}}{\text{actividad muestra control}} \cdot 100 \quad (4)$$

Análisis estadístico

Para la interpretación de los resultados se empleó el análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y los intervalos LSD (Least Significant Difference) ($p < 0.05$) con el fin de evaluar la significación de la influencia de los tratamientos. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete Statgraphics Centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Flora natural

La inactivación de la flora natural del zumo de naranja se muestra en la Tabla 1. Al aplicar el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU se alcanzó la inactivación total de la población inicial de *E.coli* y aerobios mesófilos totales a las distintas temperaturas empleadas. Sin embargo, la población inicial de *S.cerevisiae* no pudo ser inactivada totalmente, obteniendo niveles de inactivación de 2.61, 2.24 y 2.19 ciclos logarítmicos a 31, 36 y 41°C, respectivamente, lo que se corresponde con reducciones medias del 99.7, 99.4 y 99.3%, respectivamente. Por tanto, la reducción fue menor a medida que aumentó la temperatura de tratamiento, aunque no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las distintas temperaturas empleadas. La inactivación incompleta de *S. cerevisiae* puede estar relacionada con el mayor espesor de su pared celular, el cual es de 124.8 nm, en comparación con el de *E.coli* que es de 17.7 nm (Ortuño, 2014). Este mayor espesor de la pared, por tanto, podría frenar los mecanismos de inactivación, tales como la modificación química de la doble capa lipídica de la membrana celular, el aumento de la permeabilidad celular y la penetración de SC-CO₂ en las células. De forma similar a los resultados obtenidos, Ortuño et al. (2014), tras el tratamiento de zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU (225 bar; 31°C; 6 min) obtuvieron una reducción de 7 y 4 ciclos logarítmicos de *E.coli* y *S.cerevisiae*, respectivamente, partiendo de una misma concentración inicial de células. Estos resultados apoyan la relación entre el espesor de la pared celular y la resistencia a la inactivación. Por otra parte, el tratamiento de pasteurización aplicado consiguió la inactivación total de la flora natural investigada.

TABLA 1. Inactivación de la flora natural del zumo de naranja

Tratamiento / condiciones	<i>E.coli</i> *			<i>S.cerevisiae</i> *			Aerobios mesófilos totales*		
	N ₀	N	log N/N ₀	N ₀	N	log N/N ₀	N ₀	N	log N/N ₀
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 31°C	5.75E+03	0.00E+00	-3.47±0.61	1.20E+05	2.00E+02	-2.61±0.40	1.22E+03	0.00E+00	-2.95±0.43
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 36°C	1.24E+04	0.00E+00	-3.80±0.63	4.53E+04	2.55E+02	-2.24±0.21	3.66E+03	0.00E+00	-3.50±0.31
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 41°C	1.35E+04	0.00E+00	-3.84±0.79	1.58E+05	1.04E+03	-2.19±0.02	9.65E+03	0.00E+00	-3.95±0.23
Pasteurización / 90° C, 1 min	9.11E+02	0.00E+00	-2.82±0.43	6.16E+03	0.00E+00	-3.54±0.54	1.03E+03	0.00E+00	-2.88±0.48

pH, °Brix, acidez titulable

Los resultados de pH, °Brix y acidez titulable se muestran en la Tabla 2. El tratamiento del zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU en continuo causó un aumento significativo ($p<0.05$) en el pH, así como una significativa

($p < 0.05$) pero leve reducción de los °Brix del mismo con respecto al zumo natural. Uno de los motivos por los que el pH se mantuvo y no fue reducido, como era de esperar debido a la acción del CO_2 , puede atribuirse al escaso tiempo de tratamiento, además de a un pH más bajo del zumo de partida, ya que a pH 3.7-3.8 se dificulta la disociación del ácido carbónico, formado por la disolución del CO_2 en el zumo, en iones de hidrógeno, debido a que las constantes de disociación del ácido carbónico y del bicarbonato son $\text{pK}_a=6.57$ y $\text{pK}_a=10.62$, respectivamente (Zhou et al., 2009). Por otra parte, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el pH del zumo entre las distintas temperaturas empleadas en el procesamiento mediante SC- CO_2 +HPU, siendo mayor el cambio producido a 36°C (1.10%), seguido de 31°C (0.56%) y 41°C (0.36%). La misma tendencia fue observada por Kincal et al. (2006) al aplicar un tratamiento de SC- CO_2 en continuo al zumo de naranja (38, 72, 107 MPa; 0.40-1.18 ratio CO_2 /zumo; 40°C ; 10 min), obteniendo porcentajes de cambio de pH comprendidos entre 0.14-0.54%. Asimismo, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento mediante SC- CO_2 +HPU y el zumo pasteurizado, siendo mayor el cambio en este primero, excepto en el caso del tratamiento mediante SC- CO_2 +HPU a 41°C , donde no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al zumo pasteurizado. Fabroni et al. (2010) obtuvieron un porcentaje de cambio en el pH del zumo de naranja del 1.47% tras su tratamiento mediante SC- CO_2 en continuo (230 bar; 5.08 L/h zumo; 3.91 L/h CO_2 ; 36°C ; 15 min), así como un porcentaje del 1.18% tras la pasteurización del mismo (90°C , 30 seg). En el caso de los °Brix, no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ninguno de los tratamientos empleados, obteniendo reducciones del 1.25-1.83%. Esta misma tendencia fue observada por Gasperi et al. (2009) tras el tratamiento de zumo de naranja mediante SC- CO_2 (100 bar; 36°C ; 10 min), donde el porcentaje de reducción fue de apenas el 0.85%. Kincal et al. (2006), tras el tratamiento de zumo de naranja mediante SC- CO_2 en continuo (38 MPa; 0.40 ratio CO_2 /zumo; 40°C ; 10 min) obtuvieron reducciones del 1.80%.

Asimismo, se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en los valores de acidez del zumo de naranja tratado por SC- CO_2 +HPU con respecto al zumo natural, no observándose diferencias en los valores de acidez entre las distintas temperaturas empleadas, pero sí entre éstas y el zumo pasteurizado, siendo las reducciones del 5.01, 5.42, y 5.42% a 31, 36 y 41°C , respectivamente, y del 1.10% en el caso del zumo pasteurizado. La mayor reducción producida por el tratamiento de SC- CO_2 +HPU podría ser atribuida al efecto del CO_2 , debido a que como se ha comentado anteriormente, a un pH tan bajo como el de la naranja, se dificulta la disociación del mismo en ácido carbónico, impidiendo de esta forma el aumento de la acidez; además, el escaso tiempo de tratamiento también podría ser otra de las causas del impedimento de su disociación. Kincal et al. (2006), tras el procesamiento de zumo de naranja mediante SC- CO_2 en continuo (72 MPa; 0.64 ratio CO_2 /zumo; 40°C ; 10 min), así como Tiwari et al. (2008a), mediante el procesado ultrasónico del mismo (8.61-22.79 W/cm^2 ; 2-10 min), obtuvieron porcentajes de cambio del 0%.

TABLA 2. Valores de pH, °Brix y acidez titulable del zumo de naranja

Tratamiento / condiciones	pH			°Brix			Acidez titulable (g ác. cítrico/100ml)*		
	Control	Tratado	% cambio	Control	Tratado	% cambio	Control	Tratado	% cambio
SC-CO₂+HPU / 100 bar, 31°C	3.60±0.05 ¹	3.62±0.05 ²	0.56±0.01% ^a	12.30±0.22 ¹	12.11±0.16 ²	-1.34±0.62% ^a	0.865±0.033 ¹	0.849±0.004 ²	-5.01±0.41% ^a
SC-CO₂+HPU / 100 bar, 36°C	3.63±0.03 ¹	3.67±0.03 ²	1.10±0.14% ^b	11.45±0.06 ¹	11.24±0.05 ²	-1.83±0.48% ^a	0.742±0.056 ¹	0.751±0.004 ²	-5.42±0.39% ^a
SC-CO₂+HPU / 100 bar, 41°C	3.68±0.09 ¹	3.69±0.09 ²	0.36±0.11% ^c	12.14±0.15 ¹	12.00±0.11 ²	-1.33±0.32% ^a	0.742±0.056 ¹	0.726±0.049 ²	-5.42±0.52% ^a
Pasteurización / 90° C, 1 min	3.61±0.08 ¹	3.63±0.07 ²	0.31±0.09% ^c	12.00±0.11 ¹	11.85±0.05 ²	-1.25±0.45% ^a	0.903±0.086 ¹	0.896±0.086 ²	-1.10±0.11% ^b

* media ± desviación estándar; n= 3.

Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05)

Diferentes números dentro de una fila indican diferencias significativas entre control y tratado (p<0.05)

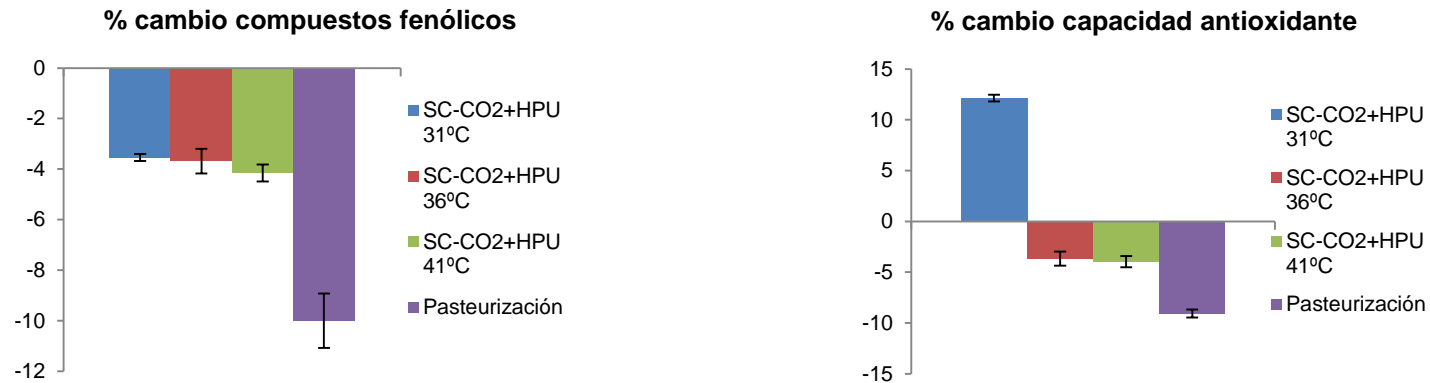


FIGURA 2. Porcentaje de cambio en compuestos fenólicos y capacidad antioxidante tras los tratamientos

Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

El tratamiento del zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU en continuo produjo una disminución significativa ($p < 0.05$) de los compuestos fenólicos con respecto al zumo natural en todas las condiciones de temperatura estudiadas, obteniendo reducciones del 3.54, 3.68, y 4.15% a 31, 36 y 41°C, respectivamente (Figura 2). Por otra parte, se observó una ligera pero no significativa reducción de los compuestos fenólicos a medida que aumentó la temperatura de tratamiento ($p > 0.05$). La mayor reducción de los compuestos fenólicos con el aumento de temperatura ya fue observada por Rawson et al. (2011a) tras el tratamiento de zumo de sandía mediante HPU (24.1-60 μm ; 25-45°C; 2-10 min). Asimismo, existió una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU y la pasteurización, siendo mayor la pérdida de compuestos fenólicos en el caso de este último (-10%), debida probablemente a la mayor degradación de hidratos de carbono y ácidos orgánicos durante el procesamiento térmico, lo que da lugar a furfural y otros compuestos carbonilo, que pueden formar productos de condensación con los polifenoles (Fabroni et al., 2010). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fabroni et al. (2010), tras el tratamiento mediante SC-CO₂ en continuo de zumo de naranja (130 bar; 5.08 L/h zumo; 1.96 L/h CO₂; 36°C; 15 min), donde se observaron reducciones del 5.27%, frente a reducciones del 9.99% tras la pasteurización del mismo (90°C, 30 seg). Por otra parte, se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en la capacidad antioxidante del zumo tratado mediante SC-CO₂+HPU con respecto al zumo natural (Figura 2), excepto en el caso del tratamiento a 31°C, en el que se produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) de la misma (12.13%). Por tanto, existieron diferencias entre el tratamiento a 31°C con respecto a las otras dos temperaturas aplicadas (36 y 41°C), entre las que no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$), dando lugar a reducciones del 3.68 y 3.96%, respectivamente. Por tanto, en este caso, el aumento de temperatura también dio lugar a una mayor reducción. Además, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dicho tratamiento y el zumo pasteurizado, resultando en una mayor reducción de la capacidad antioxidante para este último (-9.07%). Sin embargo, cabe destacar que el análisis de la capacidad antioxidante es problemático debido a que los resultados son fuertemente dependientes del método empleado para su evaluación, ya que en función de éste se medirán unos compuestos antioxidantes u otros (Rigo et al., 2000). Resultados similares obtuvieron Fabroni et al. (2010) tras el tratamiento en continuo de zumo de naranja mediante SC-CO₂ (130-230 bar; 5.08 L/h zumo; 3.91 L/h CO₂; 36°C; 15 min), donde los porcentajes de reducción oscilaron entre 1.39% y 2.53%, frente al 5.50-10.89% del zumo pasteurizado.

Índice browning y color

Los resultados de browning y color se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. El tratamiento del zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU en continuo produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) en el índice browning con respecto al zumo natural en todas las condiciones de temperatura estudiadas, por lo que el tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el pardeamiento del zumo. Se observaron además diferencias

significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento a 31°C con respecto a las otras dos temperaturas aplicadas, siendo mayor el aumento a medida que incrementó la temperatura de tratamiento. Las diferencias obtenidas con respecto al zumo natural fueron del 216.4, 228.1, y 233.5%, a 31, 36 y 41°C, respectivamente, por lo que las muestras se oscurecieron paulatinamente con el incremento de la temperatura. Los resultados del aumento del índice browning con respecto al zumo natural son acordes a los obtenidos por Tiwari et al. (2008b) al emplear un tratamiento ultrasónico al zumo de naranja (amplitud 40-100%; 2-10 min), obteniendo valores comprendidos entre el 373.7-636.8%. Estos autores atribuyen la causa de dicho pardeamiento a la destrucción de pigmentos producida por los HPU, fundamentalmente carotenoides. Asimismo, uno de los principales factores que contribuye al pardeamiento del zumo de naranja, es la oxidación del ácido ascórbico, la cual proporciona grupos carbonilo reactivos, como el furfural y el 5-hidroximetilfurfural, que pueden ser precursores del pardeamiento no enzimático (Bharate et al., 2012; Bull et al., 2004; Yeom et al., 2000). Además, también puede influir en éste la descomposición de azúcares o caramelización (Vervoort et al., 2011), así como las reacciones de Maillard entre azúcares reductores y grupos amino libres, dando lugar a la formación de melanoidinas, que son compuestos oscuros causantes de dicho pardeamiento. Por tanto, los componentes que mayoritariamente se ven involucrados en el pardeamiento del zumo son los azúcares reductores, aminoácidos, polifenoles y ácidos orgánicos (Ibarz-Martínez et al., 2010). Vervoort et al. (2011) indicaron que el pardeamiento no enzimático se acelera por la temperatura y el tiempo de procesamiento, lo cual explica lo ocurrido tras el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU en función de la temperatura aplicada; sin embargo, no explica la mayor diferencia significativa ($p < 0.05$) observada en el caso del tratamiento mediante SC-CO₂+HPU con respecto a la pasteurización.

Por otra parte, el pardeamiento no enzimático producido tras el tratamiento del zumo mediante SC-CO₂+HPU también fue observado a partir de los resultados obtenidos tras el análisis del color del mismo (Tabla 4). En todos los casos se obtuvo una reducción de los valores L*, a* y b*. La disminución en el valor L* indicó la pérdida de luminosidad u oscurecimiento del zumo, el cual está asociado con el pardeamiento (Tiwari et al., 2008b; Yeom et al., 2000), además de presentar una cierta relación con la nube debido a que la luz reflejada se ve afectada por ésta en el modo de reflectancia (Liu et al., 2012). Asimismo, la disminución de los valores a* y b* indicaron el cambio de color a tonalidades menos rojas y menos amarillas. La diferente concentración de carotenoides entre el suero y la pulpa, así como la modificación del tamaño de la pulpa tras los tratamientos pudo ser uno de los motivos de la modificación del color (Niu et al., 2010). Teniendo en cuenta los parámetros de ΔE , se pudo observar el cambio de color producido tras los tratamientos aplicados, siendo mayor la diferencia de color en el caso del tratamiento mediante SC-CO₂+HPU a 36°C, seguido del mismo tratamiento a 41 y 31°C, correspondiendo la menor diferencia de color al zumo pasteurizado. Como puede observarse, estos valores no mostraron una tendencia en función de la temperatura. Aun así, los valores ΔE de todos los zumos tratados fueron mayores de 3, lo que indicó que todos ellos causaron un cambio perceptible en el color del zumo, calificándose dichas diferencias como muy grandes en todos los casos.

Estos resultados son acordes a los reportados por Fabroni et al. (2010) tras el tratamiento de zumo de naranja en continuo mediante SC-CO₂ (130 bar; 5.08 L/h zumo; 1.96-3.91 L/h CO₂; 36°C; 15 min), donde también se observaron reducciones en los tres valores de color en ambos tratamientos, obteniendo valores de ΔE comprendidos entre 7.87-11.89, en comparación con el zumo pasteurizado, cuyos valores de ΔE oscilaron entre 2.88-6.23. Los cambios de color producidos tras el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU pueden ser producidos por la cavitación generada por los HPU, la cual regula diversas reacciones físicas, químicas y biológicas, entre ellas la degradación de carotenoides producida por reacciones de oxidación promovidas por la interacción de éstos con los radicales libres formados durante dicho tratamiento (Abid et al., 2013; Tiwari et al., 2008a).

TABLA 3. Valores de índice browning del zumo de naranja

Tratamiento / condiciones	Índice browning (A _{420 nm})*		
	Control	Tratado	% cambio
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 31°C	0.21±0.00 ¹	0.66±0.02 ²	216.40±7.85% ^a
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 36°C	0.23±0.01 ¹	0.75±0.01 ²	228.13±4.49% ^b
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 41°C	0.22±0.00 ¹	0.72±0.01 ²	233.49±4.03% ^b
Pasteurización / 90° C, 1 min	0.21±0.01 ¹	0.22±0.01 ²	5.38±0.19% ^c

* media ± desviación estándar; n= 3.

Diferentes letras dentro de una columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05)

Diferentes números dentro de una fila indican diferencias significativas entre control y tratado (p<0.05)

TABLA 4. Valores de color del zumo de naranja

Tratamiento / condiciones	Color*						ΔE
	Control			Tratado			
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 31°C	33.86±2.04	4.61±1.11	56.75±3.57	29.76±2.88	0.805±1.59	49.73±4.84	8.85±0.60
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 36°C	40.52±0.96	5.54±0.35	64.30±2.45	33.86±1.73	0.98±0.73	55.79±2.47	11.74±1.25
SC-CO ₂ +HPU / 100 bar, 41°C	33.96±1.39	6.37±0.93	56.65±2.03	30.21±0.67	1.44±0.23	50.54±1.01	8.70±1.86
Pasteurización / 90° C, 1 min	35.00±0.25	8.25±1.20	58.74±0.26	32.42±0.13	4.52±0.28	54.47±0.18	6.27±0.87

* media ± desviación estándar; n= 3.

Nube

La nube está relacionada con la suspensión de partículas compuesta por una mezcla compleja de proteínas, pectina, lípidos, hemicelulosa, celulosa, y otros componentes minoritarios (Niu et al., 2010; Tiwari et al., 2009b). Éste es un atributo deseable que afecta positivamente a la turbidez, el sabor, el aroma y el color característico del zumo de naranja. Su pérdida se atribuye principalmente a la actividad enzimática de la PME, la cual produce la separación de fases en el zumo al desesterificar la pectina de la pared celular vegetal y catalizar la desmetilación de la misma, lo que da lugar a la formación de complejos con iones de calcio, produciendo así la precipitación de la pectina y la consiguiente pérdida de nube (Bull et al., 2004; Polydera et al., 2004). El tratamiento del zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU en continuo produjo un aumento significativo ($p < 0.05$) en los valores de nube con respecto al zumo natural en todas las condiciones de temperatura estudiadas (Figura 3), observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos a 31 y 36°C con respecto al de 41°C. Las diferencias promedio con respecto al zumo natural al aplicar dichos tratamientos fueron del 195.0, 198.4, y 270.6%, a 31, 36 y 41°C, respectivamente, por lo que el valor de nube incrementó a medida que aumentó la temperatura de tratamiento. Esta misma tendencia fue observada por Niu et al. (2010) tras la aplicación del tratamiento mediante SC-CO₂ al zumo de naranja (40 MPa; 55°C; 10-60 min), donde se obtuvieron porcentajes de cambio de nube del 91.33-115.48%. De igual forma, Tiwari et al. (2008a), tras la aplicación de un tratamiento ultrasónico al zumo de naranja (8.61-22.79 W/cm²; 2-10 min) obtuvieron aumentos del 63-222%. De esta forma, tras el procesamiento del zumo mediante SC-CO₂+HPU, la nube no sólo fue preservada, sino también mejorada. Este fenómeno se debe principalmente a la reducción de la actividad enzimática de la PME, así como a la despresurización del sistema, la cual homogeneiza el zumo, causando la ruptura o reducción de las partículas del sistema coloidal del mismo (Kincal et al., 2006; Liu et al., 2012). Otro factor que contribuye al aumento de nube es el efecto de los HPU, los cuales producen la ruptura de la molécula lineal de pectina, reduciendo su peso molecular (Tiwari et al., 2009b). Por otra parte, los valores de nube obtenidos tras la pasteurización fueron significativamente ($p < 0.05$) menores que los obtenidos tras el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU, lo cual puede ser debido a la coagulación y precipitación de proteínas inducida por el calor tras la pasteurización (Zhou et al., 2009).

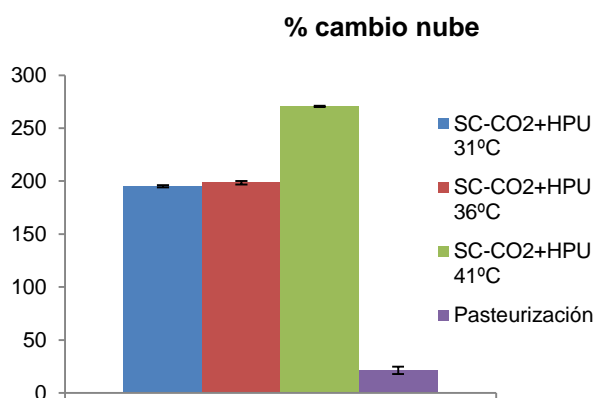


FIGURA 3. Porcentaje de cambio en la nube tras los tratamientos

Ácido ascórbico y actividad enzimática AOX

El tratamiento del zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU en continuo produjo una reducción significativa ($p < 0.05$) de ácido ascórbico con respecto al zumo natural en todas las condiciones de temperatura estudiadas (Figura 4). Aun así, el ácido ascórbico fue retenido en gran medida tras dicho tratamiento, observándose únicamente reducciones del 4.55, 5.85, y 6.50%, a 31, 36, y 41°C, respectivamente. Como puede observarse, estas reducciones fueron mayores a medida que aumentó la temperatura de tratamiento, aunque a pesar de ello, sólo existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento a 31 y 41°C. Esta ligera degradación puede ser debida a la formación de radicales libres producidos por el efecto de la cavitación generada por los HPU, lo que da lugar a la oxidación de compuestos orgánicos polares, como el ácido ascórbico y los fenoles totales; así como también puede ser debida a la termólisis producida en el interior de las burbujas y la posterior activación de la reacción de Maillard (Rawson et al., 2011b; Tiwari et al., 2009a). Por otra parte, tras el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU aplicado, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad relativa de la ascorbato oxidasa (AOX) (Figura 4), la cual cataliza la oxidación del ácido ascórbico, resultando en un menor aumento a medida que incrementó la temperatura de tratamiento. Los porcentajes de actividad relativa obtenidos fueron del 173.81, 139.86, y 133.77%, a 31, 36 y 41°C, respectivamente, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento a 31°C con respecto al de 36 y 41°C. El aumento de la actividad enzimática provocada por el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU puede ser explicado por el efecto de la cavitación generada por los HPU, la cual provoca la formación de peróxidos, estimulando así la actividad enzimática de dicha enzima (Costa et al., 2013). Asimismo, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de ácido ascórbico del zumo entre el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU y la pasteurización, siendo mayor la pérdida de ácido ascórbico en el caso de este último (-10.05%), a pesar de que mediante dicho tratamiento se obtuvo una significativa ($p < 0.05$) reducción de la actividad enzimática relativa de AOX (-19.51%). Por tanto, la mayor reducción de ácido ascórbico en este último caso puede ser explicada por la aplicación de una mayor temperatura de tratamiento, tal como indican Sánchez-Moreno et al. (2005), ya que el ácido ascórbico es un nutriente termolábil y altamente sensible a diversas condiciones de procesamiento. De igual forma, la temperatura afectaría a la actividad enzimática de AOX, resultando en una menor actividad. La misma tendencia fue observada por Fabroni et al. (2010), tras el procesamiento en continuo mediante SC-CO₂ de zumo de naranja (130 bar; 5.08 L/h zumo; 1.96 L/h CO₂; 36°C; 15 min), donde se obtuvieron reducciones de ácido ascórbico del 0.05%, así como porcentajes de reducción del 3.35% en el caso del zumo pasteurizado. Asimismo, Tiwari et al. (2009a), obtuvieron reducciones del 1.46-5.17% de ácido ascórbico tras la aplicación de un tratamiento ultrasónico al zumo de naranja (0.33-0.88 W/ml; 2-10 min), así como una reducción del 7.14% tras la pasteurización del mismo. Aun así, sería necesario realizar pruebas de almacenamiento al zumo tratado mediante SC-CO₂+HPU para comprobar

que el ácido ascórbico no es reducido con el tiempo debido al incremento de la actividad de la AOX.

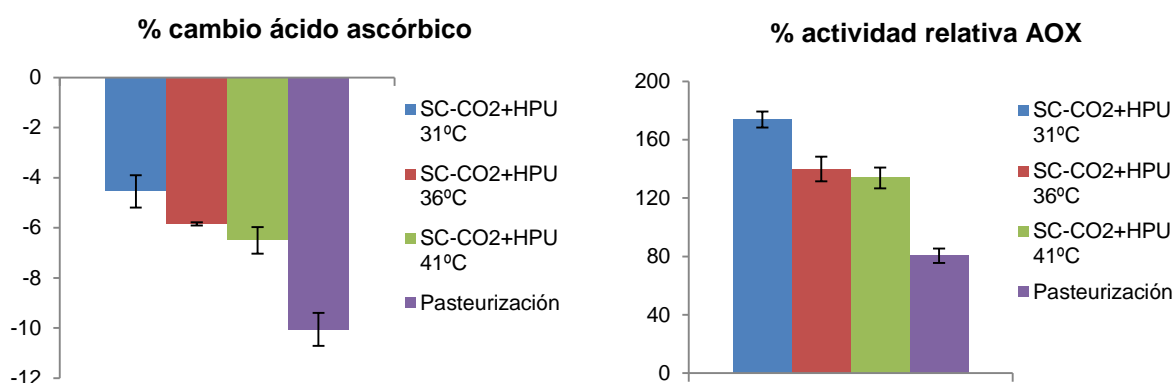


FIGURA 4. Porcentaje de cambio en ácido ascórbico y porcentaje de actividad enzimática relativa de AOX tras los tratamientos

CONCLUSIONES

Tras el tratamiento del zumo de naranja mediante SC-CO₂+HPU en continuo se obtuvo la total inactivación de la población inicial de *E.coli* y aerobios mesófilos totales, así como una reducción de más del 99% de la población inicial de *S.cerevisiae*. Por otra parte, el pH, °Brix y la acidez titulable mostraron cambios mínimos en el zumo tratado mediante SC-CO₂+HPU comparado con el tratamiento de pasteurización. Asimismo, los valores de cambio con respecto al zumo natural del índice browning y el color fueron mayores para el zumo tratado mediante SC-CO₂+HPU, además de obtenerse un aumento de la actividad enzimática de la AOX mediante esta tecnología. Sin embargo, el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU produjo un mayor aumento de la nube, así como una menor reducción de compuestos fenólicos y ácido ascórbico con respecto al zumo pasteurizado. Además, dio lugar a un aumento de la capacidad antioxidante con respecto al zumo natural.

La nueva tecnología aplicada es, por tanto, una técnica de conservación que podría representar una alternativa al tratamiento térmico convencional con el fin de evitar el deterioro del zumo y prolongar su vida útil, ya que a pesar de no alcanzar la completa inactivación de la población inicial de *S.cerevisiae*, se lograron niveles aceptables de inactivación.

Se puede concluir que las condiciones de procesamiento idóneas para dicho tratamiento son 100 bar, 25 ml zumo/min, 1.72 min de tiempo de retención, y 31°C, ya que a dicha temperatura se consiguió la mínima reducción e incluso el aumento en los valores de los parámetros de calidad del zumo natural con respecto a la tecnología térmica convencional. Sin embargo, es necesaria la realización de pruebas de almacenamiento para garantizar la estabilidad de los parámetros estudiados tras su procesado durante la vida útil del producto.

REFERENCIAS

- Abid, M.; Jabbar, S.; Wu, T.; Hashim, M.M.; Hu, B.; Lei, S.; Zhang, X.; Zeng, X. 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5):1182-1187.
- AOAC International. 2007. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists international. 18th edition, 2nd revision.
- Bharate, S.S. & Bharate, S.B. 2012. Non-enzymatic browning in citrus juice: chemical markers, their detection and ways to improve product quality. *Journal of Food Science and Technology*, 1-18.
- Bull, M.K.; Zerdin, K.; Howe, E.; Goicoechea, D.; Paramanandhan, P.; Stockman, R.; Sellahewa, J.; Szabo, E.A.; Johnson, R.L.; Stewart, C.M. 2004. The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(2):135-149.
- Calix, T.F.; Ferrentino, G.; Balaban, M.O. 2008. Measurement of high-pressure carbon dioxide solubility in orange juice, apple juice, and model liquid foods. *Journal of Food Science*, 73(9):439-445.
- Costa, M.G.M.; Fonteles, T.V.; de Jesus, A.L.T.; Almeida, F.D.L.; de Miranda, M.R.A.; Fernandes, F.A.N.; Rodrigues, S. 2013. High-intensity ultrasound processing of pineapple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4):997-1006.
- Damar, S. & Balaban, M.O. 2006. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science*, 71(1):1-11.
- Fabroni, S.; Amenta, M.; Timpanaro, N.; Rapisarda, P. 2010. Supercritical carbon dioxide-treated blood orange juice as a new product in the fresh fruit juice market. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3):477-484.
- Ferrentino, G.; Plaza, M.L.; Ramirez-Rodrigues, M.; Ferrari, G.; Balaban, M.O. 2009. Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 74(6):333-341.
- Gao, X.; Ohlander, M.; Jeppsson, N.; Björk, L.; Trajkovski, V. 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5):1485-1490.
- Gasperi, F.; Aprea, E.; Biasioli, F.; Carlin, S.; Endrizzi, I.; Pirretti, G.; Spilimbergo, S. 2009. Effects of supercritical CO₂ and N₂O pasteurisation on the quality of fresh apple juice. *Food chemistry*, 115(1):129-136.
- Hagerman, A.E. & Austin, P.J. 1986. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(3):440-444.
- Ibarz-Martínez, R.; Pagán, J.; Garza, S.; Ibarz, A. 2010. Browning of clarified lemon juices treated at high temperatures. *Scientia Agropecuaria*, 1(1):7-20.
- Kincal, D.; Hill, W.S.; Balaban, M.O.; Portier, K.M.; Wei, C.I.; Marshall, M.R. 2005. A continuous high pressure carbon dioxide system for microbial reduction in orange juice. *Journal of Food Science*, 70(5):249-254.
- Kincal, D.; Hill, W.S.; Balaban, M.; Portier, K.M.; Sims, C.A.; Wei, C.I.; Marshall, M.R. 2006. A continuous high-pressure carbon dioxide system for cloud and quality retention in orange juice. *Journal of Food Science*, 71(6):338-344.
- Liu, X.; Gao, Y.; Xu, H.; Hao, Q.; Liu, G.; Wang, Q. 2010. Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry*, 119(1):108-113.
- Liu, Y.; Hu, X.; Zhao, X.; Song, H. 2012. Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13:112-119.
- Niu, L.; Hu, X.; Wu, J.; Liao, X.; Chen, F.; Zhao, G.; Wang, Z. 2010. Effect of dense phase carbon dioxide process on physicochemical properties and flavor compounds of orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(2):530-548.
- Ortuño, C.; Martínez-Pastor, M.T.; Mulet, A.; Benedito, J. 2012. An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15:31-37.

Ortuño, C.; Martínez-Pastor, M.T.; Mulet, A.; Benedito, J. 2013. Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51(2):474-481.

Ortuño, C. 2014. Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Ortuño, C.; Balaban, M.; Benedito, J. 2014. Modelling of the inactivation kinetics of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and pectin methylesterase in orange juice treated with ultrasonic-assisted supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 90:18-26.

Polydera, A.C.; Galanou, E.; Stoforos, N.G.; Taoukis, P.S. 2004. Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions. *Journal of Food Engineering*, 62(3):291-298.

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8):3396-3402.

Rawson, A.; Tiwari, B.K.; Patras, A.; Brunton, N.; Brennan, C.; Cullen, P.J.; O'Donnell, C. 2011a. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, 44(5):1168-1173.

Rawson, A.; Patras, A.; Tiwari, B.K.; Noci, F.; Koutchma, T.; Brunton, N. 2011b. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7):1875-1887.

Rigo, A.; Vianello, F.; Clementi, G.; Rossetto, M.; Scarpa, M.; Vrhovšek, U.; Mattivi, F. 2000. Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6):1996-2002.

Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Elez-Martínez, P.; De Ancos, B.; Martín-Belloso, O.; Cano, M.P. 2005. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11):4403-4409.

Tiwari, B.K.; Muthukumarappan, K.; O'Donnell, C.P.; Cullen, P.J. 2008a. Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7):2423-2428.

Tiwari, B.K.; Muthukumarappan, K.; O'donnell, C.P.; Cullen, P.J. 2008b. Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10):1876-1883.

Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P.; Muthukumarappan, K.; Cullen, P.J. 2009a. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3):700-704.

Tiwari, B.K.; Muthukumarappan, K.; O'donnell, C.P.; Cullen, P.J. 2009b. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2):166-171.

Vervoort, L.; Van der Plancken, I.; Grauwet, T.; Timmermans, R.A.H.; Mastwijk, H.C.; Matser, A.M.; Hendrickx, M.E.; Van Loey, A. 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(4):466-477.

Wimmer, Z. & Zarevúcka, M. 2010. A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1):233-253.

Xu, Z.; Zhang, L.; Wang, Y.; Bi, X.; Buckow, R.; Liao, X. 2011. Effects of high pressure CO₂ treatments on microflora, enzymes and some quality attributes of apple juice. *Journal of Food Engineering*, 104(4):577-584.

Yeom, H.W.; Streaker, C.B.; Zhang, Q.H.; Min, D.B. 2000. Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10):4597-4605.

Zhou, L.; Wang, Y.; Hu, X.; Wu, J.; Liao, X. 2009. Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3):321-327.