



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Calidad y Estabilidad de Smoothies de
Fruta y/o Verdura Procesados mediante
Altas Presiones Hidrostáticas

D^a Adriana Hurtado Gómez

2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

CALIDAD Y ESTABILIDAD DE SMOOTHIES DE
FRUTA Y/O VERDURA PROCESADOS MEDIANTE
ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS

D^a. Adriana Hurtado Gómez
2015

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación de España, vinculada al Proyecto de Investigación FRUITECH (INIA RTA2011- 00038-C02-01).



Agradecimientos

Llegó el momento, el fin de una etapa y una meta lograda. Queda agradecer a todo aquel que ha sido partícipe, de una manera u otra, en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Jose María Ros la oportunidad que me ha dado de iniciarme en la investigación, por contar conmigo cuando apareció este proyecto, permitiéndome realizar la tesis doctoral, y por su preocupación por mantenerme contratada.

En segundo lugar agradecer al Dr. Sancho Bañón el abrimme sus puertas hace más de 5 años, puesto que me ha traído al punto en el que me encuentro hoy. Estoy muy agradecida por el esfuerzo realizado en este proyecto, por ayudarme, guiarme y enseñarme.

También mostrar mi agradecimiento a la codirectora de tesis la Dra. Dolors Guàrdia, al Dr. Pierre Picouet y demás personal del IRTA implicado en este proyecto, por haber hecho posible esta tesis, por el trabajo realizado, disponibilidad y amabilidad en todo momento.

A los profesores del departamento de Tecnología de Alimentos y personal técnico, en especial a Ana Belén Bautista, por estar dispuesta siempre a ayudarme y aconsejarme.

A Pilar Hellín del IMIDA por sacarme varias veces de apuros y haber sido tan generosa.

A todos mis compañeros del despachito-bodega-zulo, los que están y los que se fueron, porque habéis hecho que venga a trabajar feliz todos los días. Gracias por los momentos vividos, en especial al zulo que ha "soportado" mi día a día.

A nivel personal agradecer a los amigos y amigas que en algún momento se han interesado por la tesis y por mi continuidad en la universidad, gracias por el apoyo.

A Fer, por haber sufrido esta tesis, por aprender de ti cada día y hacerme mejor persona. Por muchas metas más.

Por último, el mayor apoyo y el pilar de mi vida, mi familia. A mi madre y mi hermana, por hacerme ver lo peor y lo mejor de mí, por quererme y apoyarme incondicionalmente y por ser un ejemplo de esfuerzo, constancia y trabajo. Os quiero.

A mi madre

“Por aguantar mis malos ratos y manías
Por enseñarme a ver el cielo más azul
Por ser mi compañera y darme tu alegría
No cabe en una vida mi gratitud”

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	15
1.1. ANTECEDENTES.	17
1.2. OBJETIVOS.....	19
2. INTRODUCCIÓN.	21
2.1. SMOOTHIE.	23
2.1.1. <i>Definición de smoothie.</i>	23
2.1.2. <i>Normativa aplicable.</i>	23
2.1.3. <i>Comercialización y consumo de zumos y smoothies.</i> ...	26
2.1.4. <i>Proceso de elaboración de un smoothie de fruta.</i>	30
2.2. NUEVAS TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN.	34
2.3. ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.	38
2.3.1. <i>Fundamentos de las altas presiones.</i>	38
2.3.2. <i>Procesos y equipos.</i>	39
2.3.3. <i>Aplicación de las altas presiones en los alimentos.</i>	43
2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD.	47
2.4.1. <i>Atributos de Calidad.</i>	47
2.4.2. <i>Factores que afectan a la calidad.</i>	61
2.4.3. <i>Métodos para evaluar la calidad.</i>	70
2.5. EFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES EN DERIVADOS DE FRUTAS Y VERDURAS.....	79
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	87
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	89

3.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.	90
3.3. APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES Y TRATAMIENTO TÉRMICO.	91
3.4. ELABORACIÓN DE SMOOTHIES.	93
3.4.1. <i>Elaboración de smoothie de frutas.</i>	93
3.4.2. <i>Elaboración de smoothie de frutos rojos.</i>	94
3.4.3. <i>Elaboración del smoothie de verduras.</i>	95
3.5. PLAN DE TRABAJO.	97
3.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.	98
3.6.1. <i>Análisis Físico-Químico.</i>	99
3.6.2. <i>Análisis nutricional.</i>	102
3.6.3. <i>Análisis de la capacidad antioxidante.</i>	104
3.6.4. <i>Análisis Enzimático.</i>	106
3.6.5. <i>Análisis Microbiológico.</i>	108
3.6.6. <i>Análisis sensorial.</i>	109
3.6.7. <i>Análisis estadístico.</i>	113
 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	 115
4.1. ENSAYO I: APLICACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DE PRESURIZACIÓN PARA OBTENER SMOOTHIES DE FRUTA CON CARACTERÍSTICAS “FRESH-LIKE”.	 117
4.1.1. <i>Efecto de las condiciones de presurización sobre el flavor.</i>	 118
4.1.2. <i>Efecto de las condiciones de presurización sobre la inactivación de enzimas oxidasas y pécticas.</i>	121
4.1.3. <i>Efecto de las condiciones de presurización sobre la clarificación y color.</i>	123
4.1.4. <i>Efecto de las condiciones presurización sobre la capacidad antioxidante.</i>	128
4.1.5. <i>Efecto de las condiciones de presurización sobre las características nutricionales.</i>	130

4.1.6. Calidad microbiológica evaluada a los 30 días de almacenamiento.	133
4.2. ENSAYO II: VIDA COMERCIAL DE LOS SMOOTHIES DE FRUTA TRATADOS POR ALTA PRESIÓN Y POR CALOR.	137
4.2.1. Calidad microbiológica.	138
4.2.2. Actividad enzimática residual.	140
4.2.3. Características físico químicas.	142
4.2.4. Capacidad antioxidante.	147
4.2.5. Contenido nutricional.	148
4.2.6. Atributos sensoriales.	153
4.3. ENSAYO III: VIDA COMERCIAL DE LOS SMOOTHIES DE FRUTOS ROJOS TRATADOS POR ALTA PRESIÓN Y CALOR.	159
4.3.1. Calidad microbiológica.	160
4.3.2. Actividad enzimática residual.	162
4.3.3. Características físico-químicas.	166
4.3.4. Parámetros relacionados con la clarificación.	170
4.3.6. Capacidad antioxidante.	172
4.3.6. Contenido nutricional.	175
4.3.8. Atributos sensoriales.	179
4.4. ENSAYO IV: VIDA COMERCIAL DE LOS SMOOTHIES DE VERDURA TRATADOS POR ALTA PRESIÓN Y CALOR.	187
4.4.1. Calidad microbiológica.	188
4.4.2. Actividad enzimática residual.	191
4.4.3. Características físico-químicas.	194
4.4.4. Contenido nutricional.	202
4.4.5. Atributos sensoriales.	208
5. CONCLUSIONES.	213
6. RESUMEN / SUMMARY.	217
7. REFERENCIAS.	221
8. ANEXOS.	257

Índice de tablas.

Tabla 1a. Consumo mundial de zumos de frutas y néctares en litros en 2014.....	27
Tabla 1b. Tendencias en el consumo de zumo de frutas en Europa.....	27
Tabla 2. Nuevas tecnologías para el procesado de alimentos.....	34
Tabla 3. Principales componentes de algunas frutas y verduras.....	48
Tabla 4. Principales vitaminas de algunas frutas y verduras.....	51
Tabla 5. Principales minerales de algunas frutas y verduras.....	52
Tabla 6. Temporada de algunas frutas y verduras.....	63
Tabla 7. Distribución del trabajo realizado en el tiempo.....	97
Tabla 8. Descriptores usados en el análisis sensorial del smoothie de frutas.....	110
Tabla 9. Descriptores usados en el análisis sensorial del smoothie de frutos rojos.....	111
Tabla 10. Descriptores usados en el análisis sensorial del smoothie de verduras.....	112
Tabla 11. Porcentaje de respuestas correctas en el test triangular del flavor de los smoothies de fruta.....	120
Tabla 12. Actividad enzimática residual de los smoothies de fruta...	123
Tabla 13. Características físicas relacionadas con la clarificación de los smoothies de fruta.....	126
Tabla 14. Parámetros de color de los smoothies de fruta.....	128
Tabla 15. Capacidad antioxidante de los smoothies de fruta.....	129
Tabla 16. Contenido de vitamina C y otros antioxidantes.....	131
Tabla 17. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad microbiológica ($\log \text{ ufc g}^{-1}$) de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C.....	140
Tabla 18. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la actividad enzimática relativa de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C.....	142

Tabla 19. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características físico-químicas de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C	146
Tabla 20. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la capacidad antioxidante de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C	148
Tabla 21. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad nutricional de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C.....	151
Tabla 22. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C	157
Tabla 23. . Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad microbiológica de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.	162
Tabla 24. . Efecto de los tratamientos de conservación sobre la actividad enzimática de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.....	166
Tabla 25. Efecto de los tratamientos de conservación sobre los parámetros físico-químicos de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C	169
Tabla 26. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la clarificación de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C	172
Tabla 27. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la capacidad antioxidante de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4°C	174
Tabla 28. Efecto de los tratamientos de conservación sobre el contenido nutricional de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.....	179
Tabla 29. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.....	185
Tabla 30. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad microbiológica de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C	190
Tabla 31. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la actividad enzimática de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C	194

Tabla 32. . Efecto de los tratamientos de conservación sobre características físico-químicas y parámetros de color de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C	200
Tabla 33. Efecto de los tratamientos de conservación sobre características relacionadas con la clarificación de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C	201
Tabla 34. Efecto de los tratamientos de conservación sobre el contenido de vitamina C y otros antioxidantes de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C	206
Tabla 35. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C	211

Índice de Figuras.

Figura 1. Consumo en España de zumo de frutas y néctares por sabores.....	29
Figura 2. Diagrama de flujos del proceso de elaboración.....	30
Figura 3. Esquema del equipo utilizado en la aplicación de ozono.....	36
Figura 4. Aplicación de altas presiones en alimentos.....	40
Figura 5. Presurización mediante compresión indirecta.....	41
Figura 6. Presurización mediante compresión directa.....	42
Figura 7. Aplicación de HPP en los sectores de la industria alimentaria, a nivel mundial, a finales del 2013.....	44
Figura 8. Clasificación de los antioxidantes en frutas y verduras.....	54
Figura 9. Letalidad de los microorganismos tras presurizar a 300 MPa/5 °C/30 min.....	65
Figura 10. Diagrama de flujos del proceso de elaboración de smoothie de frutas (Ensayo I y II).....	93
Figura 11. Diagrama de flujos del proceso de elaboración de smoothie de frutos rojos (Ensayo III).....	94
Figura 12. Diagrama de flujos del proceso de elaboración de smoothie de verduras (Ensayo IV).....	95
Figura 13. Contenido en sacarosa, glucosa y fructosa en los smoothies de frutas tras diferentes métodos de conservación.....	133
Figura 14. Efecto del tratamiento de conservación en la carga microbiana	135
Figura 15. Evolución del color de los smoothies de frutas tratados por HPP y TP, a lo largo del almacenamiento, mediante la medida de la coordenada Hue.....	145
Figura 16. Efecto del tratamiento de conservación sobre el contenido de azúcar (sacarosa, glucosa y fructosa) de los smoothies de frutas almacenados 21 días a 4 °C.....	152
Figura 17. Contenido en sacarosa, glucosa y fructosa en smoothies de verdura HPP (i) y TP (ii) a lo largo del almacenamiento.....	207

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados.
µg	Microgramo.
a*	Coordenada a*. Rojo-verde.
AA	Ácido ascórbico.
ABTS	2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).
AESA	Agencia Española de Seguridad Alimentaria.
AIJN	European Fruit Juice Association.
ANOVA	Análisis de varianza.
Aw	Actividad de agua.
b*	Coordenada b*. Azul-amarillo.
β	Beta.
BEDCA	Base de Datos Española de Composición de Alimentos.
C*	Índice de saturación o Chroma.
cP	Centipoise.
DAD	Detector Diodo Array.
DHAA	Ácido Dehidroascórbico.
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
DW	Peso en seco.
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético.
FAO	Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
FDA	Food and Drug Administration.
FIAB	Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas.
FRAP	Capacidad de reducción del ión férrico.
FW	Peso en fresco.

g	Gramos.
GAE	Equivalentes de ácido gálico.
h	Hora.
H*	Tono o ángulo Hue.
HAT	Hydrogen atom transfer.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
HPP	Procesado por alta presión.
IDR	Ingesta diaria recomendada.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria máxima media.
I.P.	Índice de Pardeamiento.
ISO	Organización Internacional de Normalización.
L*	Coordenada L*. Luminosidad.
M	Molar.
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
mg	Miligramo.
min	Minutos.
MPa	Megapascal.
MS	Detector de Masas.
N	Normalidad.
nm	Nanometros.
NTU	Unidades Nefelometricas de turbidez.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPDA	Orto fenilendiamina.
Pa	Pascal.
PEF	Pulsed electric fields.

PET	Tereftalato de polietileno.
PG	Poligalacturonasa.
PME	Pectin metil esterasa.
POD	Peroxidasa.
ppm	Partes por millón.
PPO	Polifenoloxidasa.
Psi	Pounds per square inch (libra por pulgada cuadrada).
PVC	Policloruro de vinilo.
QDA	Análisis descriptivocuantitativo.
QE	Quercetina.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
RTE	Ready to eat (Listo para consumir).
s	Segundo.
SET	Single electron transfer.
S.I.	Sólidos Insolubles.
<i>Spp.</i>	Especie.
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de Trolox.
TP	Tratamiento de pasteurización.
ufc	Unidades formadoras de colonias.
UV-vis	Detector ultravioleta-visible.

1. Antecedentes y Objetivos.

1.1. Antecedentes.

En los últimos años hay una demanda creciente, por parte de los consumidores, de alimentos frescos mínimamente transformados, libres de aditivos y con una vida útil larga. Al mismo tiempo, el conocimiento sobre el papel que desempeñan frutas y verduras en el mantenimiento de la salud y reducción de enfermedades hace que su demanda esté en aumento. Un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) recomienda un consumo mínimo de 400g de fruta y verdura al día para prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad, ocasionadas en parte por deficiencias en micronutrientes. Debido a esa demanda de los consumidores y al consumo recomendado de frutas y verduras surge la aparición de nuevos productos que cumplan las expectativas.

Los smoothies son zumos con más densidad, ya que contienen la pulpa, de las frutas o verduras. En los últimos años, los smoothies a base de frutas han ganado popularidad en todo el mundo, y son en la actualidad uno de los principales segmentos del mercado de bebidas. Esto se debe principalmente al aumento de la conciencia de la salud entre el público, la conveniencia, el sabor y la naturalidad ofrecido por los smoothies. Son productos altamente valorados por su aporte en vitaminas y antioxidantes, pero son propensos al deterioro. Los principales cambios en estos zumos de frutas son, deterioro microbiológico, cambios sensoriales (aparición de sabores indeseables),

físicos (pardeamiento y pérdida de turbidez del zumo) y cambios en su composición (pérdida de propiedades nutricionales como vitaminas y antioxidantes). Por lo anterior es necesario aplicar un tratamiento de conservación que garantice la seguridad y estabilidad del alimento. La pasteurización es el tratamiento térmico que se aplica en la conservación de zumos. Es un proceso agresivo para los alimentos debido a que se le aplica una temperatura elevada ($>80^{\circ}\text{C}$). La pasteurización elimina los microorganismos alargando la vida útil del zumo, pero afecta negativamente a los atributos sensoriales y nutricionales.

La aplicación de altas presiones es un método de conservación de alimentos dónde el producto está sujeto a elevadas presiones con la finalidad de obtener un alimento estable, que mantenga las propiedades nutricionales y atributos deseables para el consumidor asociados al "fresh-like". Como han mencionado varios autores (Keenan *et al.*, 2010; Landl *et al.*, 2010; Knockaert *et al.*, 2011; Vervoort *et al.*, 2012), HPP se ha propuesto como una alternativa al tratamiento térmico. La mayor ventaja de aplicar altas presiones es que el producto es microbiológicamente seguro sin añadir aditivos, mientras que el flavor, las vitaminas, el color y otras propiedades de los alimentos no se ven afectadas o se afectan en una pequeña medida (Hendrickx *et al.*, 1998). Estas propiedades, además de no verse afectadas por el tratamiento, deben ser estables durante el almacenamiento. La presencia de diferentes frutas o verduras en un zumo, con diferentes características y comportamiento, dificulta el establecimiento de una tendencia en su comportamiento durante la vida útil.

1.2. Objetivos.

Objetivo general:

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue explorar el uso de altas presiones hidrostáticas para obtener smoothies de fruta o verdura con propiedades sensoriales similares a las de un producto no tratado y con una vida comercial parecida a la de un producto pasteurizado térmicamente.

Objetivos parciales:

- Establecer las condiciones óptimas de presurización de los smoothies en base a diversas características microbiológicas, enzimáticas, físico-químicas, sensoriales y nutricionales, en comparación con smoothies pasteurizados mediante un tratamiento térmico convencional.
- Evaluar el efecto de los tratamientos de presurización optimizados sobre las características anteriormente citadas en tres tipos de smoothies, basados en fórmulas comerciales y elaborados con frutas, verduras o frutos rojos.
- Establecer la vida útil de los smoothies elaborados con frutas, verduras o frutos rojos, durante su almacenamiento en condiciones de venta al por menor (refrigeración e iluminación con luz blanca fluorescente).

2. Introducción.

1. Smoothie.

2.1.1. Definición de smoothie.

Los smoothies son elaborados a base de zumos y trozos de frutas y verduras naturales. Su consumo suele ser mezclado con hielo, lácteos o trozos de fruta fresca. Debido a la presencia de la pulpa de la fruta o verdura tiene una consistencia más densa que los zumos convencionales. Es por esto su nombre, "smoothie", haciendo referencia a su cremosidad. Los smoothies son una manera práctica de consumir fruta o verdura.

2.1.2. Normativa aplicable.

La legislación de los zumos y néctares se manifiesta en tres niveles o ámbitos distintos, que se citan más adelante:

- A nivel internacional a través de la Norma para zumos del Codex Alimentarius.
- A nivel europeo a través de la Directiva comunitaria de zumos.
- A nivel nacional a través de la Reglamentación Técnico Sanitaria de zumos.

La FAO y la OMS crearon en 1962 el Codex Alimentarius para facilitar el comercio internacional de alimentos y garantizar a los consumidores su calidad, seguridad e inocuidad. Según el Codex Alimentarius se entiende por zumo de fruta el líquido sin fermentar, pero fermentable, que se

obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha de conformidad con las disposiciones pertinentes de la Comisión del Codex Alimentarius (Codex Stan 247-2005).

Por puré de fruta se entiende el producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido mediante procedimientos idóneos, por ejemplo tamizando, triturando o desmenuzando la parte comestible de la fruta entera o pelada sin eliminar el zumo (jugo). La fruta deberá estar en buen estado, debidamente madura y fresca, o conservada por procedimientos físicos o por tratamientos aplicados de conformidad con las disposiciones pertinentes de la Comisión del Codex Alimentarius.

Los zumos y néctares de frutas deberán tener el color, aroma y sabor característicos del zumo del mismo tipo de fruta de la que proceden.

La legislación de zumos vigente en la actualidad en la Unión Europea y en España está regulada por:

Disposición Comunitaria de directa aplicación:

- **Directiva 2001/112/CE** objeto de transposición del Consejo, de 20 de diciembre, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Modificada por:

Directiva 2009/106/CE, que se dictó teniendo en cuenta la evolución de las normas internacionales pertinentes, en particular, la Norma General del Codex para Zumos y Néctares de Frutas (Codex Stan 247-2005).

Directiva 2010/33/UE, que corrige la versión española de la Directiva 2001/112/CE del Consejo, de 20 de diciembre.

Directiva 2012/12/UE, se dictó con los objetivos de adaptar al progreso técnico las normas sobre elaboración, composición y etiquetado de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.

Disposiciones Nacionales:

- **Real Decreto 462/2011** de 1 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana. Mediante el presente real decreto se incorpora la Directiva 2009/106/CE de la Comisión, de 14 de agosto de 2009, al ordenamiento interno, así como la Directiva 2010/33/UE de la Comisión, de 21 de mayo de 2010.
- **Real Decreto 176/2013**, de 8 de marzo, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios: Derogación parcial de la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de zumos de frutas y de otros vegetales y de

sus derivados aprobada por el Real Decreto 667/1983, de 2 de marzo.

- **Real Decreto 781/2013** de 11 de octubre de 2013, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (Deroga el Real Decreto 1050/2003). Tiene el objetivo de trasponer la Directiva 2012/12/UE.
- **Real Decreto 1518/2007**, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables.

2.1.3. Comercialización y consumo de zumos y smoothies.

Las condiciones comerciales en 2013 y 2014 fueron difíciles en un clima de constante inestabilidad económica. El aumento de los precios en materia prima y logística ha empujado hacia arriba los precios medios, llevando a muchos consumidores a disminuir su consumo.

El consumo en zumos de frutas y néctares en la Unión Europea fue, en 2014, de 10.000 millones de litros, frente a los casi 40.000 millones de litros del consumo mundial (**Tabla 1a**). En general, el consumo de zumos de frutas en Europa, en litros, cayó un 4.1 % en 2014 (**Tabla 1b**). A pesar de este descenso, aumentó el consumo de zumos elaborados a partir de no concentrados. Esto indica la demanda por parte de los consumidores de alimentos naturales.

Tabla 1. (a) Consumo mundial de zumos de frutas y néctares en litros en 2014. **(b)** Tendencias en el consumo de zumos de frutas en Europa (European Fruit Juice Association [AIJN], 2015).

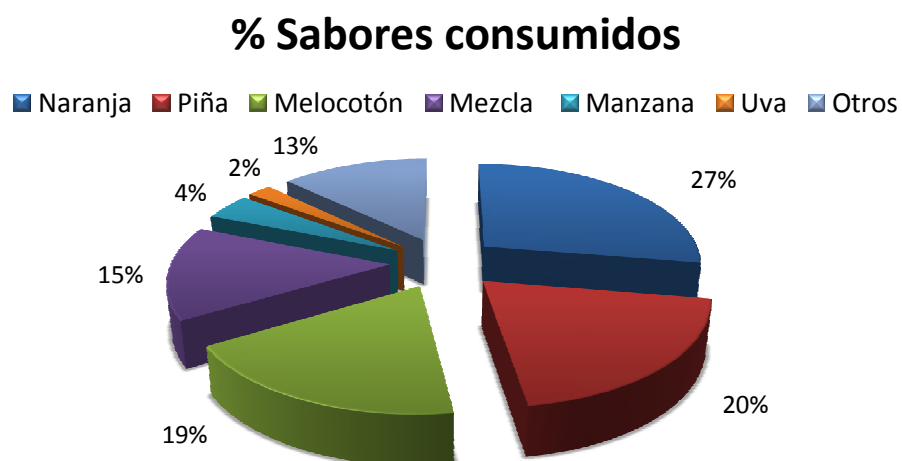
a		b						
Región	Millones de Litros	Tipo de zumo/ Millones de litros	2010	2011	2012	2013	2014	%cambio
América del Norte	9.480							
Oeste de Europa	8.793	Zumo de frutas total	7.191	7.024	6.786	6.478	6.215	-4.1%
Este de Asia	8.330							
Este de Europa	4.794	Refrigerado	1.323	1.360	1.403	1.407	1.393	-1.0%
América del Sur	3.631							
África y Oeste de Asia	3.625	No Refrigerado	5.868	5.665	5.383	5.071	4.822	-4.9%
Total	38.653	Concentrado	5.585	5.300	4.995	4.647	6.367	-6.0%
EU 28	9.702	No Concentrado	1.606	1.725	1.791	1.830	1.848	1.0%

El mercado de zumos de frutas y néctares también ha caído en España un 2.5 % de volumen en 2013, y un 1.8 % de volumen en 2014, lo que supone un volumen de producción total de 985 y 968 millones de litros de zumos de frutas y néctares respectivamente (AIJN, 2015). La industria de alimentación y bebidas de nuestro país ocupa el primer lugar como sector industrial en términos de facturación. Según el informe económico de la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB, 2015), entre las principales economías europeas, las exportaciones de la industria de alimentación y bebidas española han sido las que más han crecido en 2014, un 5.9 %, siendo el 10 % del total de exportaciones de bienes de España.

Según el informe del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2015), entre los sabores que más se consumen en España destaca el zumo de naranja con casi el 30 %, seguido del zumo de piña con un 20 % y melocotón con un 18 % (**Figura 1**). El perfil del consumidor de zumo y néctar corresponde normalmente a hogares situados en poblaciones medianas (2.000 a 100.000 habitantes), formados por 3 ó 4 personas, con presencia de hijos, cuyo responsable de la compra no supera los 49 años. Los hogares formados por jóvenes independientes superan un 76 % el consumo medio.

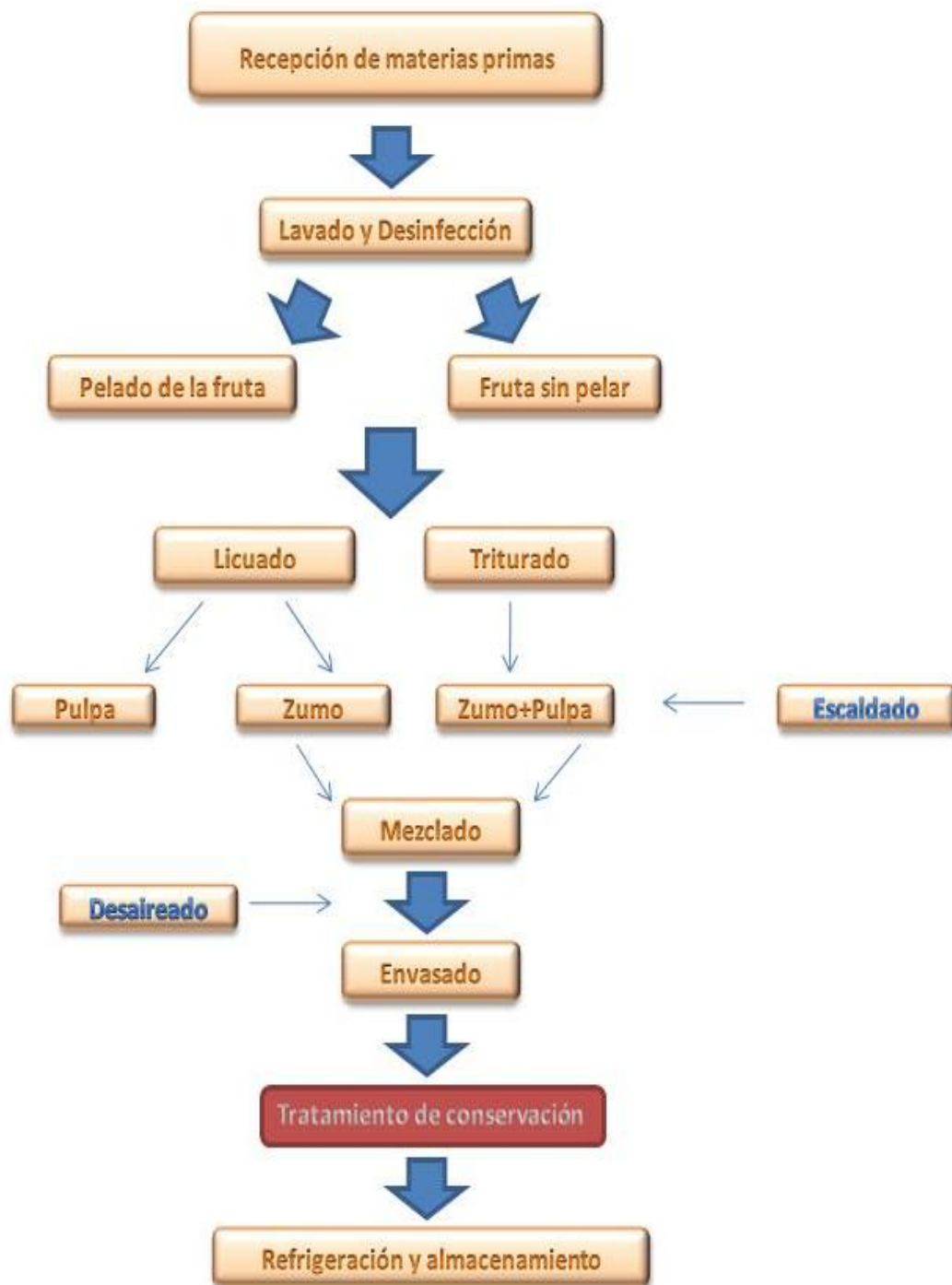
Una tendencia clave en los principales mercados de frutas y zumos es que ha habido un cambio en consumir menos cantidad, pero mejor calidad. Muchos consumidores parecen estar dispuestos a pagar por naturalidad y funcionalidad de un zumo de alta calidad, ya sea por razones de salud o por placer. La creciente demanda de calidad sobre la cantidad está impulsando a muchos productores a invertir en el desarrollo de alimentos funcionales con alto valor añadido. La aparición en el mercado de nuevos productos, como los smoothies, puede cubrir las nuevas demandas y necesidades de los consumidores e impulsar la industria productora de zumos.

Figura 1. Consumo en España de zumo de frutas y néctares por sabores (MAGRAMA, 2015).



2.1.4. Proceso de elaboración de un smoothie de fruta.

Figura 2. Diagrama de flujos del procesado de elaboración.



Recepción de la materia prima.

La materia prima cuando llega a la industria es recepcionada, pesada y seleccionada, eliminando así posibles restos de hojas, ramas y desechando el producto en mal estado. Cada tipo de producto pasará por una cinta transportadora hacia la zona de lavado. El producto puede ser elaborado con frutas o verduras, solas o mezcla de varias.

Frutas: Son las partes carnosas de órganos florales que han alcanzado el grado de madurez adecuado y son aptas para el consumo.

Hortalizas: Aquellas partes de los vegetales en estado fresco, que bien crudas, conservadas o preparadas de diversas formas se utilizan directamente para consumo humano.

Verduras: Son hortalizas que la parte comestible son los órganos verdes de la planta, como los tallos o las hojas.

Lavado y desinfección de la fruta.

La fruta pasa por una solución de agua clorada dónde se elimina la suciedad, restos de pesticidas y microorganismos superficiales.

Cortado/Pelado.

Dependiendo del tipo de fruta se procede a la extracción del zumo. Las frutas con piel que no se utiliza en la elaboración del smoothie, como la naranja o el plátano, son peladas antes de exprimir. En cambio, hay frutas que se utilizan enteras, como son las bayas (fresa, mora, uva,...) y otras, como la manzana, se pueden utilizar enteras o peladas.

Extracción del jugo y pulpa.

El smoothie se caracteriza por estar compuesto del zumo y pulpa de la fruta. La fruta triturada es utilizada entera, aportará la pulpa y densidad al smoothie. Las frutas exprimidas o licuadas pueden incorporar sólo el zumo o añadirle también la pulpa.

Escaldado (opcional).

Algunas frutas o vegetales pueden ser escaldados antes de ser procesados. La aplicación de un tratamiento térmico fuerte durante un corto periodo de tiempo, algunos segundos, puede mejorar la textura, el sabor y favorecer la inactivación de enzimas.

Mezclado.

Para elaborar el smoothie se mezclan las diferentes proporciones de zumo o zumo y pulpa de cada fruta.

Desaireado.

Se elimina el aire ocluido en el zumo para evitar reacciones de oxidación y la proliferación microbiológica.

Envasado.

El envase a utilizar debe ser adecuado para el tipo de producto y para el tipo de tratamiento que va a recibir. Para los zumos, normalmente se utilizan botellas de vidrio, envases de cartón (Tetra brik) o envases plásticos (PVC).

Tratamiento de conservación.

Tiene dos objetivos: inactivación de enzimas y eliminación de microorganismos.

Los tratamientos por calor (pasteurización y esterilización) son los que se han aplicado en mayor medida en zumos de frutas y verduras. Para minimizar los cambios producidos por la aplicación de calor surgen los métodos de conservación no térmicos.

El tratamiento puede aplicarse sobre el producto antes o después de ser envasado. En este último caso se evita el riesgo de una contaminación posterior.

Refrigeración.

Los smoothies o zumos con un tratamiento térmico a altas temperaturas aseguran la inocuidad del alimento durante mucho tiempo y pueden ser almacenados a temperatura ambiente. Los que han sido tratados mediante procesos no térmicos o térmicos a baja temperatura, su vida útil es más corta y deben ser almacenados, hasta su consumo, en refrigeración.

2.2. Nuevas tecnologías de conservación.

Tabla 2. Nuevas tecnologías para el procesado de alimentos (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2010).

Tecnologías no térmicas	Tecnologías térmicas
Altas presiones hidrostáticas*	Microondas
Pulsos eléctricos	Radio frecuencia
Irradiación*	Calentamiento óhmico
Ultravioleta*	Calor inductivo
Ultrasonidos	
Ozono*	
Dióxido de carbono	

*Actualmente en uso comercial.

Los tratamientos de conservación convencionales se basan en la aplicación de calor para conseguir productos seguros y estables mediante la inactivación microbiana y enzimática. Estos tratamientos térmicos tienen efectos negativos sobre propiedades sensoriales y nutricionales, desarrollando off flavors y degradando vitaminas y antioxidantes. Es por esto que surge el interés y el estudio de nuevas tecnologías que, minimicen dichos efectos sobre el alimento. (**Tabla 2**).

Entre ellas se encuentran las altas presiones (High Pressure Processing, HPP) donde se aplica presión (100-1000 MPa) al alimento de manera isostática para eliminar microorganismos.

Otro tratamiento son los pulsos eléctricos de alta intensidad (Pulsed Electric Field, PEF). Los campos eléctricos generados en un rango de 5-50 kV/cm por la aplicación de pulsos eléctricos durante microsegundos (μ s), ocasiona cambios en las funciones de la membrana celular, así como la ruptura de la célula microbiana (Qin *et al.*, 1996). La electroporación tiene como objetivo ofrecer a los consumidores alimentos de alta calidad. La tecnología PEF se considera superior a la tecnología térmica tradicional, ya que evita o reduce en gran medida los cambios sensoriales y físicos indeseables (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1999). Los zumos de manzana y naranja son, entre otros, los que se han tratado con mayor frecuencia mediante PEF (Mohamed *et al.*, 2012).

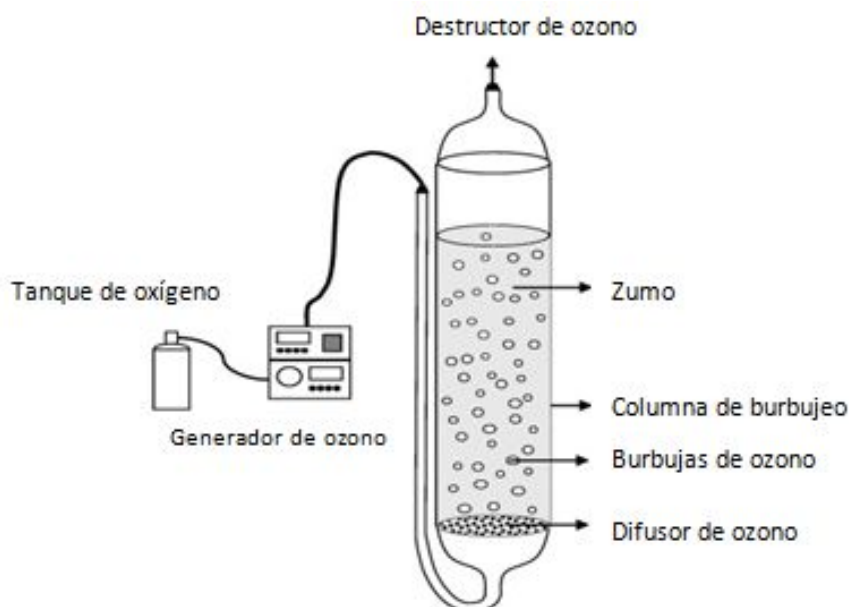
Entre los métodos no térmicos también se encuentran las radiaciones Gamma o como son referidas, radiaciones ionizantes y las radiaciones Ultravioletas. Durante la irradiación, los alimentos se exponen brevemente a una fuente de energía radiante (rayos gamma, rayos X o electrones acelerados) dentro de una instalación protectora. El daño en el material genético tiene lugar como resultado de una colisión directa de la energía radiante en dicho material o como resultado de la ionización de una molécula adyacente, habitualmente agua (Grecz *et al.*, 1983), que interacciona con el material genético. La aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos a dosis inferiores a 10 kGy consigue alcanzar perfectamente el objetivo de seguridad alimentaria en

relación con las bacterias patógenas no esporuladas (Agencia Española de Seguridad Alimentaria [AESA], 2004).

Los ultrasonidos son un método no térmico donde se aplican intensidades mayores de 1 W/cm^2 y frecuencias entre 20 kHz y 100 kHz. El efecto biocida de los ultrasonidos se ha atribuido principalmente a factores físicos (cavitación, efectos mecánicos) y/o químicos (formación de radicales libres). El uso de los ultrasonidos como técnica de conservación de los alimentos se encuentra todavía en consideración y su eficacia debe ser evaluada para su aplicación comercial (Ercan y Soysal, 2013).

La aprobación por parte de la Food and Drug Administration (FDA) del empleo del ozono como aditivo directo a los alimentos en 2001 desencadenó el interés por la aplicación del ozono en la industria alimentaria. Productores de zumos de EE.UU. y Europa han comenzado a emplear ozono para la pasteurización, lo que ha resultado en la creación de unas directrices por la FDA. Son suficientes cantidades relativamente pequeñas de ozono y tiempos de contacto cortos para el efecto antimicrobiano deseado (**Figura 3**). El ozono tiene un alto potencial de oxidación y se descompone rápidamente en oxígeno sin dejar residuos tóxicos. Esto hace que sea una opción atractiva para la industria alimentaria (Tiwari *et al.*, 2009).

Figura 3. Esquema del equipo utilizado en la aplicación de ozono (Tiwari *et al.*, 2009).



El uso de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) es una técnica en la que se aplica CO₂ por encima de su temperatura y presión crítica (T_c=31.1 °C, P_c=7.38 MPa) para la eliminación de microorganismos. Tiene la habilidad única de difusión a través de un sólido como un gas, y disolverse en materiales como un líquido. El sistema SC-CO₂ tiene otras ventajas: no es tóxico, no es inflamable, es químicamente inerte, y fisiológicamente seguro (Lin *et al.*, 1991). El mecanismo de destrucción de microorganismos puede ser resumido en los siguientes pasos: solubilización de CO₂ presurizado en la fase líquida, la modificación de la membrana celular, disminución del pH intracelular, inactivación enzimática / inhibición del metabolismo celular debido a la reducción del pH, trastorno del equilibrio de electrolitos intracelulares, y la separación de constituyentes vitales de las células y las membranas celulares (García-González *et al.*, 2007).

2.3. Altas presiones hidrostáticas.

2.3.1. Fundamentos de las altas presiones.

Las altas presiones son conocidas como HPP (High Pressure Processing) o HHP (High Hydrostatic Pressure). Es un método de procesado no térmico en el que los alimentos son sometidos a presiones entre 100- 800 MPa durante 1-30 minutos. La presión atmosférica media es de 101.325 pascales ($1 \text{ Pa} = 10^{-6} \text{ MPa}$), a nivel del mar. La aplicación de presión al alimento se trata del mismo efecto que conseguiríamos sumergiendo el producto a 60 Km por debajo del nivel del mar. Es un método de conservación poco invasivo que produce alimentos de alta calidad nutricional. Los alimentos son seguros, puesto que elimina microorganismos y mantienen los atributos de un zumo fresco. No destruye esporas por lo que es efectivo sólo para alimentos ácidos. Para una vida útil larga, en el resto de alimentos no ácidos es necesaria la aplicación de temperatura junto con presión.

HPP se basa en dos principios:

- Principio Le Chatelier: Si en un sistema en equilibrio se modifica algún factor (presión, temperatura, concentración,...) el sistema evoluciona en el sentido que tienda a oponerse a dicha modificación. El aumento de presión provoca una disminución del volumen del producto afectando a estructuras biológicas, reacciones y procesos. El volumen de agua disminuye un 4 % a 100 MPa y un 15 % a 600 MPa (Cheftel, 1995).

- Principio Isostático: Establece que la presión es instantánea y uniformemente transmitida al producto, ya sea que la muestra permanezca en contacto directo con el medio de presurización o en un envase sellado herméticamente que transmita la presión, independientemente del tamaño o la geometría del producto (Knorr, 1993).

2.3.2. Procesos y equipos.

El proceso consta de tres partes (**Figura 4**):

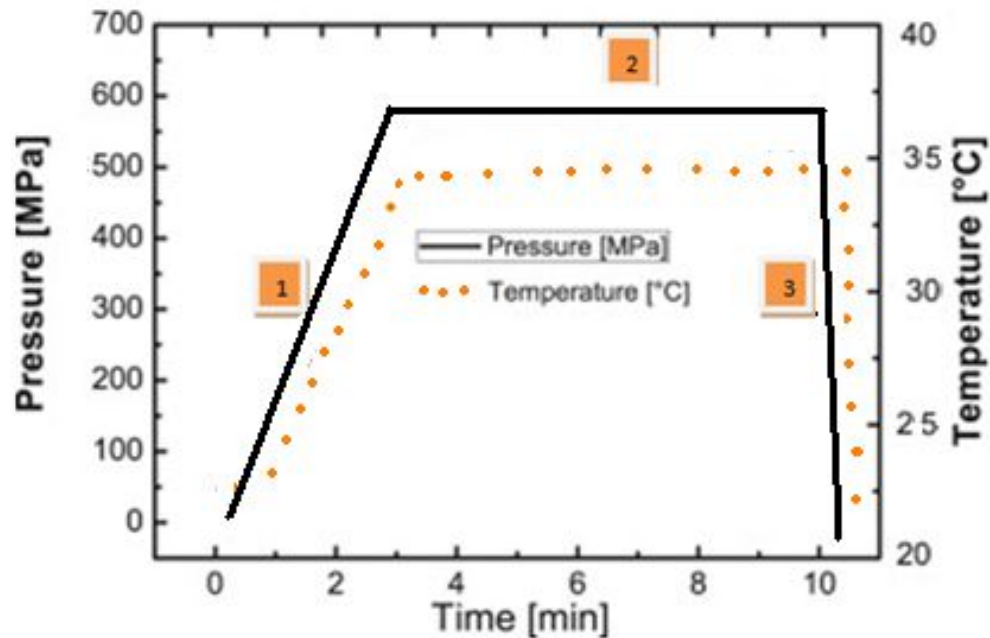
1.-Rampa de presión: Es el tiempo requerido en incrementar la presión de la muestra a partir de la presión atmosférica. El tiempo depende del ratio de compresión, la transmisión de presión del fluido y la potencia de la bomba.

2.-Holding time: Es el intervalo desde que se alcanza la presión hasta que comienza la descompresión. Tiene un efecto económico importante. Un proceso menor de 5 min maximiza la productividad y económicamente justifica el uso de esta tecnología (Balasubramaniam *et al.*, 2007).

3.-Descompresión: El tiempo que transcurre hasta volver a la presión atmosférica inicial.

La presurización puede llevarse a cabo a temperatura ambiente o se puede aplicar temperatura junto con la presión ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dicha temperatura influirá en el efecto de las altas presiones sobre el alimento. La compresión adiabática del agua causa un aumento de $2\text{--}3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cada 100 MPa , aumento que depende de la temperatura inicial del agua y de la velocidad de compresión (Cheftel y Culioli, 1997). Los aspectos del proceso a tener en cuenta y que pueden modificar el efecto de la presión en el producto son: el número de ciclos, tiempo de cada ciclo, presión aplicada, temperatura y matriz del producto.

Figura 4. Aplicación de altas presiones en alimentos.



Hay dos tipos de equipos en función de la compresión, indirecta y directa. En la compresión indirecta (**Figura 5**) los productos son tratados ya envasados en materiales flexibles. El producto es cargado en el equipo. Una vez realizada la carga, un par de bombas, inyectan agua al interior hasta alcanzar la presión adecuada. Esa sobrepresión es la que se transmite al alimento envasado durante el tiempo estimado. Por último, para la descompresión, se vacía el equipo de agua (medio transmisor de la presión) mediante la apertura de una válvula. El producto estaría listo para consumir o almacenar/refrigerar. Con este tipo de equipos se evita una posible recontaminación del alimento, ya que ha sido tratado envasado. Se pueden procesar alimentos líquidos y sólidos.

Figura 5. Presurización mediante compresión indirecta.

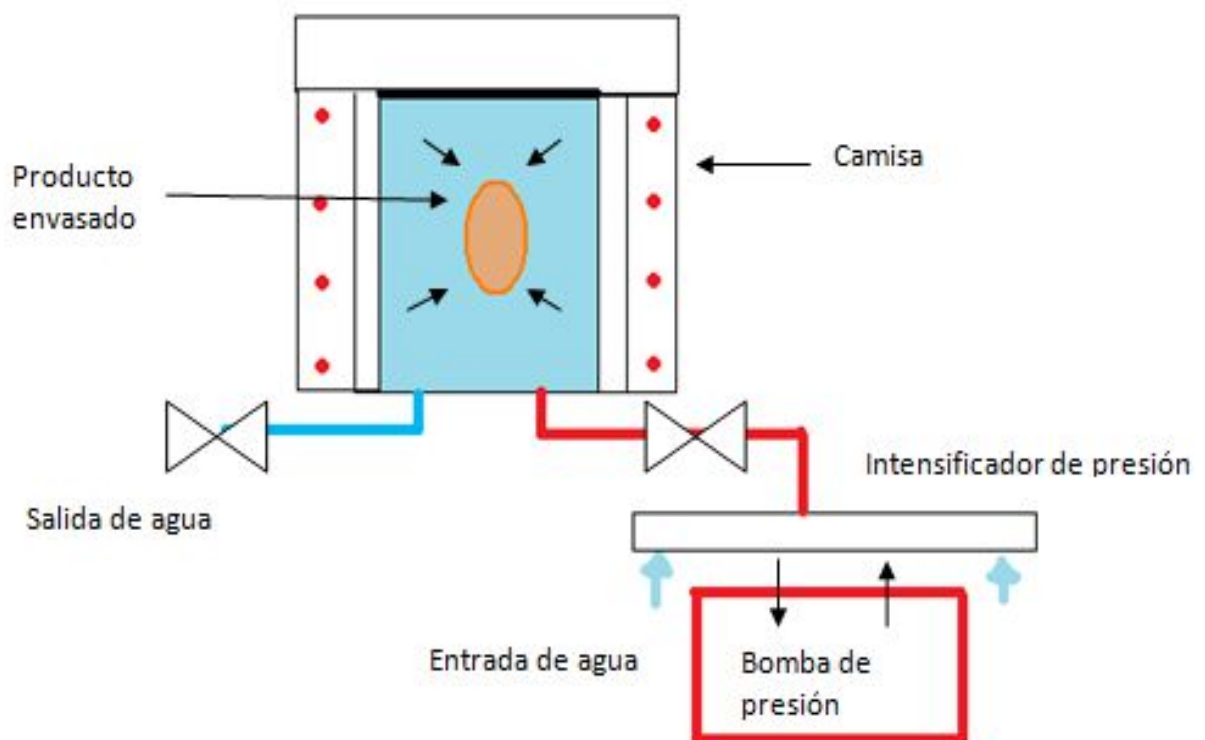
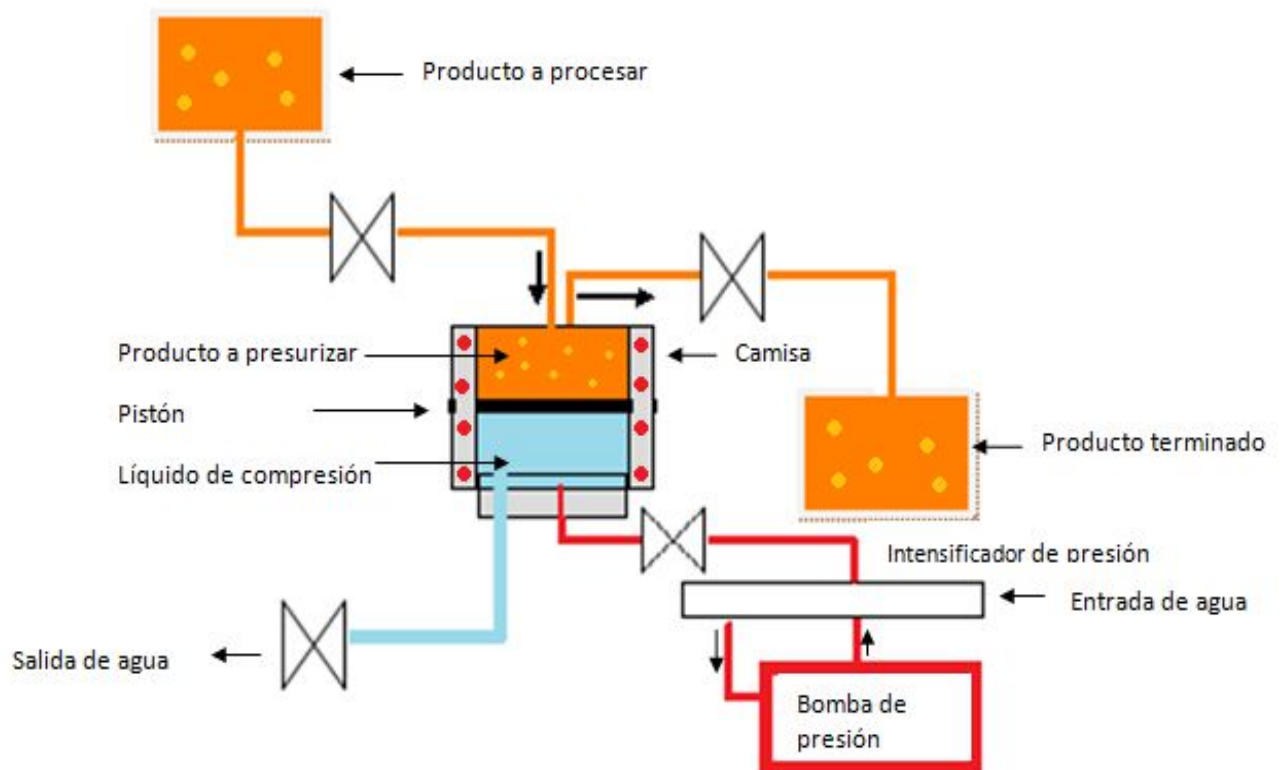


Figura 6. Presurización mediante compresión directa.

En la compresión directa (**Figura 6**), los alimentos líquidos están en contacto con el acero. El equipo se carga con el producto a tratar. Una bomba introduce agua, la cual empuja un pistón que ejerce la presión al producto. Una vez realizado el tratamiento, el producto saldría por otro conducto estéril y se procedería al envasado.

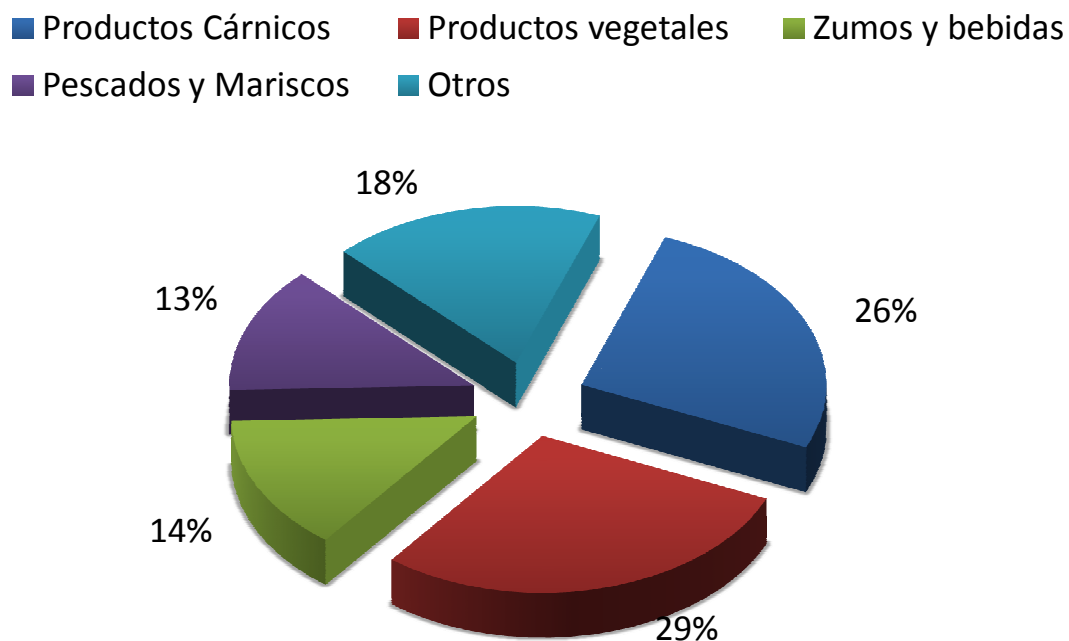
La presurización es un proceso sostenible que no genera residuos ya que sólo utiliza agua, que se recicla, y electricidad. El gasto energético al presurizar a 400 MPa es el mismo que el necesario para calentar 1 litro de agua a 30 °C, aunque los equipos requieren una alta inversión inicial. El coste de una máquina está entre 500.000-2.000.000 € dependiendo de

la capacidad del equipo, por lo que, la amortización de la máquina es la responsable del 60 % del precio del producto. La sustitución de piezas representa el 36 % del coste, la energía menos de un 4 % y el consumo de agua insignificante. Los productos RTE tratados con un sistema de compresión indirecta, con un holding time de 3 min a 600 MPa y una eficiencia volumétrica del 60 %, el coste de procesamiento es de entre 0,066 hasta 0,127 € por kg, dependiendo del tamaño del equipo HPP (Purroy Balda *et al.*, 2012).

2.3.3. Aplicación de las altas presiones en los alimentos.

La primera aplicación de las altas presiones en un alimento fue realizada por Hite (1899), el cual intentó esterilizar la leche y demostró la reducción de la población microbiana tras la presurización. Posteriormente estudió el efecto en frutas durante 5 años tras aplicar presiones entre 400-800 MPa (Farr, 1990). Brigman (1914) comprobó la desnaturalización proteica en la clara de huevo en presiones superiores a 300 MPa (Hoover *et al.*, 1989). Otros autores centran sus estudios en el diseño de los equipos de generación de altas presiones (Crossland, 1983). En 1990, la compañía japonesa Meidi-Ya Food Co. introduce al mercado los primeros productos presurizados: mermeladas de fresa, frambuesa, kiwi y manzana (Askar, 1998). Hoy en día existen, a nivel internacional y nacional, numerosas compañías productoras de alimentos presurizados.

Figura 7. Aplicación de HPP en los sectores de la industria alimentaria, a nivel mundial, a finales del 2013 (Nunes, 2014).



Productos cárnicos

Las presiones que se aplican para la pasteurización de la carne rondan los 400-600 MPa, durante tiempos cortos de 3-7 min a temperatura ambiente (Bajovic *et al.*, 2012). Entre sus mejoras están, la estabilidad del producto durante su vida útil, la reducción de sal y aditivos y, además, surgen nuevos productos en el mercado ready to eat (RTE). Sin embargo, HPP puede afectar al color, textura y flavor de los productos cárnicos (Cheftel y Culioli, 1997), lo cual no es siempre aceptado por los consumidores. La pérdida del color rojo característico de la carne fresca se produce a presiones mayores de 300 MPa, necesarias

para la inactivación de células vegetativas, debido a la desnaturalización de la mioglobina.

Los productos cárnicos presurizados en el mercado son jamón curado entero o loncheado, jamón cocido, mortadela, salchichas, beicon, chorizo y platos preparados como pollo cocido o asado. Algunos países productores de estos productos son España, Japón, Estados Unidos, Canadá e Italia.

Pescados y mariscos

La HPP en pescados asegura la higienización del producto. Para la eliminación de *Anisakis* en salmón y halibut son necesarias condiciones de 276 MPa/90-180 s o 414 MPa/30-60 s (Molina García y Sanz Martínez, 2002). Además, el procesado por altas presiones tiene el potencial de alargar la vida útil. Tratamientos en dorada de 600 MPa/25 °C/5 min supone un aumento de la vida útil de 7 a 27 días (Tsironi *et al.*, 2015). Estas mejoras dan lugar a la introducción en el mercado de nuevos productos RTE a base de pescado, como platos preparados de merluza, bacalao, dorada, salmón o atún.

Las ventajas de HPP sobre el tratamiento térmico han sido demostradas en varios estudios sobre marisco (Murchie *et al.*, 2005). Para la extracción de carne cruda del caparazón de los crustáceos se han utilizado presiones en torno 200-350 MPa, evitando así la cocción y aumentando el rendimiento, al aprovechar carne de patas y antenas. En moluscos, durante la presurización, el músculo aductor se separa de la concha facilitando la apertura y pelado. Algunos productos donde se

aplica son ostras, almejas, mejillones, bogavantes, cangrejos, langostas y gambas. El tratamiento HPP se utiliza cada vez más en la producción de surimi, producto a base de carne picada de pescado, debido a la calidad superior de geles inducidos por HPP (Ashie *et al.*, 1996).

Lácteos

Los productos lácteos presurizados que podemos encontrar son: leche, queso, yogur, salsas y bebidas.

El tratamiento con presiones a 400 MPa puede producir leche con una vida útil similar a la leche pasteurizada. La disminución de la carga microbiana podría favorecer la utilización de leche cruda en la elaboración de quesos (Huppertz *et al.*, 2002). Además, la aplicación de HPP en queso reduce el tiempo de maduración necesario, lo que supone una reducción de costes. Los quesos presurizados desarrollan mejores texturas y sabores. Esto favorece la aparición de nuevos productos en el mercado.

Frutas y verduras

En la industria de derivados de frutas, como los zumos de fruta o verdura, está en continuo estudio el tratamiento de conservación por medio de la presión. Supone un avance porque genera productos con una alta calidad sensorial, similar al producto fresco, por lo que tienen un alto valor añadido. El tratamiento aumenta la vida útil, puesto que es efectivo en la destrucción de microorganismos. Las presiones utilizadas en este

tipo de productos, según la bibliografía, son muy variables debido a las diferencias de la matriz del producto a tratar.

Con este método de conservación surgen nuevos productos orgánicos, funcionales y 100 % naturales, como smoothies o zumos de verduras. Podemos encontrar productos presurizados como guacamole, mermeladas, salsa de tomate y alimentos RTE.

2.4. Determinación de la Calidad.

Los atributos más importantes que determinan la calidad de un producto son: el valor nutricional, las propiedades organolépticas (sabor, olor, textura y apariencia), seguridad microbiológica (ausencia de patógenos y toxinas), vida útil, comodidad y propiedades saludables (Esteve y Frígola, 2007).

2.4.1. Atributos de Calidad.

2.4.1.1. Valor nutricional.

Las frutas y verduras tienen un efecto beneficioso en la salud y está altamente recomendado su consumo. Las frutas y verduras están compuestas mayoritariamente de agua, seguido de carbohidratos, proteínas, lípidos ($<1 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), fibra, vitaminas, minerales, antioxidantes y pigmentos, entre otros.

Macronutrientes.

Tabla 3. Principales componentes de algunas frutas y verduras (Base de Datos Española de Composición de Alimentos [BEDCA]).

	Agua (%)	Calorías	Proteínas	HC	Fibra
	%	KCal	g 100 g ⁻¹	g 100 g ⁻¹	g 100 g ⁻¹
Fresa	89.6	36	0.7	7	2.2
Manzana	85.7	50	0.3	12	2
Naranja	88.6	38	0.8	8.6	2
Plátano	75.1	89	1.2	20	3.4
Uva blanca	82.4	68	0.6	16.1	0.9
Grosella	82.8	27	1.1	5	8.2
Calabaza	89.4	32	1.2	5.6	2.4
Calabacín	94.6	17	1.8	2	1.0
Zanahoria	87.8	34	0.8	7	2.6

El componente mayoritario en frutas y verduras es el agua (>80%) (**Tabla 3**), que puede variar del 68 % en aguacate al 94 % en tomate o sandía. Debido a este alto porcentaje en agua, el contenido calórico de la fruta es bajo.

Los hidratos de carbono oscilan entre el 20 % del plátano al 2 % en verduras como el calabacín. La mayoría de las frutas tienen alrededor de un 10 % de carbohidratos (HC) y corresponden a los monosacáridos (glucosa y fructosa), disacáridos (sacarosa) y polisacáridos (fibra) presentes en la fruta. La cantidad en la que se encuentran los azúcares varía de unas frutas a otras, y dentro de las mismas frutas, en función de la madurez. La relación de sacarosa:glucosa:fructosa en la mayoría de las frutas es 2:1:1. Esta proporción varía en algunas frutas, por ejemplo, el plátano y la piña tienen mayor contenido de sacarosa, mientras que en la manzana, fresa y uva la proporción de fructosa y glucosa es mayor que sacarosa. (Vicente *et al.*, 2009).

La fibra insoluble está compuesta por sustancias como celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón resistente, que predominan, en general, en todos los cereales y algunas verduras. Las frutas contienen fibra soluble como inulina, pectinas, gomas y fructooligosacáridos. Actúan captando agua, forman geles viscosos que facilitan el tránsito intestinal. El consumo de fibra ralentiza la absorción de azúcares y grasas, por lo que controla los niveles de azúcar en sangre (Turgeon y Rioux, 2011). El consumo diario recomendado está entre 20-30 gramos (IDR).

Las proteínas de las frutas se encuentran en muy pequeña cantidad, el contenido varía de 0.1 % a 1.5 %. La composición de las proteínas consta de carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno además de otros elementos como azufre, hierro, fósforo y cinc. Los lípidos de las frutas se encuentran en la membrana celular como triglicéridos y fosfolípidos. El contenido en lípidos es menor al 1 %, a excepción del aguacate que tiene un 23 % de grasa, siendo la mayoría ácidos grasos monoinsaturados.

Micronutrientes

Las vitaminas son moléculas esenciales, no se sintetizan, por lo que tienen que ser obtenidas mediante la dieta. Las frutas y verduras son la principal fuente de vitaminas. Con una adecuada ingesta, cinco piezas de frutas y verduras crudas al día, se pueden prevenir enfermedades. Son necesarias para el normal funcionamiento del organismo ya que algunas participan en rutas metabólicas. Se dividen en vitaminas liposolubles (A, D, E, K) y vitaminas hidrosolubles (Grupo B y C). La tabla 4 muestra las principales vitaminas de algunas frutas y verduras.

Tabla 4. Principales vitaminas de algunas frutas y verduras (Base de Datos Española de Composición de Alimentos [BEDCA]).

Vitaminas	A μg	C mg	B ₁ mg	B ₂ mg	B ₃ mg	B ₆ mg	B ₉ μg
IDR ¹	0.7 μg	50-100mg	1-2mg	1-2mg	10-15mg	1-2mg	400 μg
Fresa	1	60	0.02	0.04	0.6	0.06	20
Manzana	4	3	0.03	0.04	0.2	0.04	1
Naranja	46	50	0.1	0.03	0.3	0.06	37
Plátano	18	10	0.06	0.07	0.8	0.51	22
Uva blanca	3	4	0.04	0.02	0.3	0.1	6
Grosella	3.5	40	0.04	0.06	0.3	0.05	40
Calabaza	34	12	-	0.07	0.1	0.1	25
Calabacín	4	20	0.05	0.04	0.56	0.11	50
Zanahoria	1346	7	0.1	0.05	0.6	0.2	30

¹IDR: Ingesta Diaria Recomendada. (Otten *et al.*, 2006). (Contenido de vitaminas en 100 g).

Los minerales se clasifican según la ingesta recomendada en: macrominerales (Calcio, Magnesio, Fósforo, Potasio, Sodio, Cloro) y microminerales (Cobre, Flúor, Yodo, Hierro, Manganeseo, Selenio, Zinc). Según Levander (1990), la contribución de frutas y verduras en la RDA de minerales es de alrededor de un 30 %. La tabla 5 muestra los principales minerales de algunas frutas y verduras.

Tabla 5. Principales minerales de algunas frutas y verduras (Base de Datos Española de Composición de Alimentos [BEDCA]).

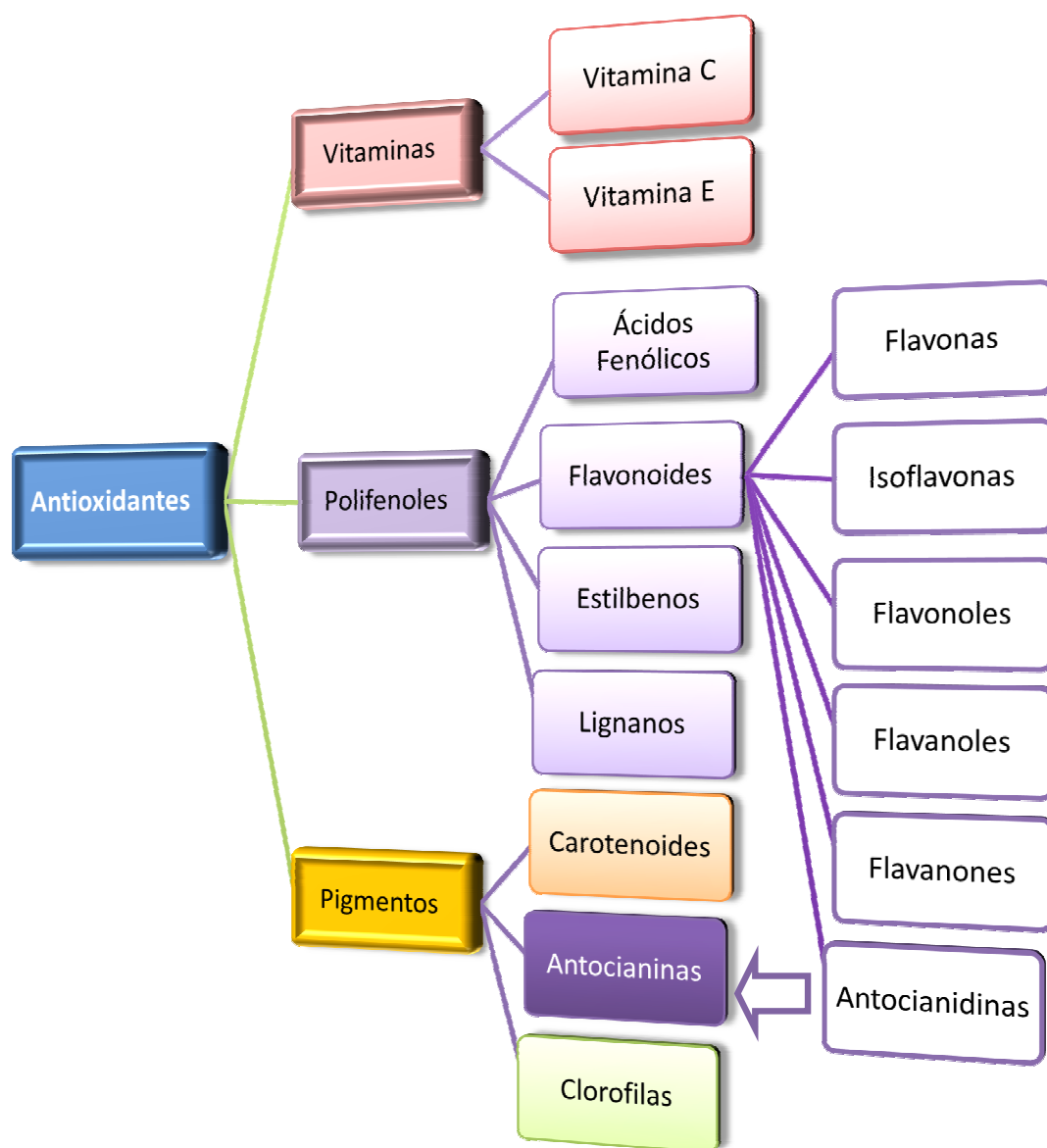
Minerales	Na mg	K mg	Mg mg	Ca mg	P mg	Fe mg
RDA ¹	1500 mg	470 mg	300-400 mg	1000 mg	700 mg	8 mg
Fresa	2	190	12	25	26	0.8
Manzana	2	99	5	6	9	0.4
Naranja	3	200	12	36	28	0.3
Plátano	1	350	38	9	28	0.6
Uva blanca	2	250	10	17	22	0.4
Grosella	3	280	13	36	30	1.2
Calabaza	1	450	10	18	30	0.4
Calabacín	3	230	18	19	31	0.4
Zanahoria	70	286	10	42	16	0.3

¹IDR: Ingesta Diaria Recomendada. (Otten *et al.*, 2006). (Contenido de minerales en 100 g).

Antioxidantes

Las especies reactivas al oxígeno (ROS) son generalmente moléculas muy pequeñas, como radicales libres o peróxidos, altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Hay circunstancias que aumentan la producción de radicales libres, como reacciones metabólicas o situaciones de estrés, favoreciendo las reacciones de oxidación. Estas reacciones producen alteraciones negativas en la célula que pueden favorecer el desarrollo de determinadas enfermedades.

Un antioxidante es considerado cualquier compuesto capaz de evitar la oxidación. Hay moléculas antioxidantes que ceden un electrón (SET) al radical libre, permitiendo que el radical libre pierda su condición, por apareamiento de su electrón desapareado. El antioxidante se oxida pero en una forma de baja reactividad en el medio. Otro mecanismo para evitar la oxidación es la cesión de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante (HAT). Ambos mecanismos son llevados a cabo mediante antioxidantes no enzimáticos, sintetizados en el cuerpo o aportados mediante la dieta. Están presentes en frutas y vegetales y los principales grupos son vitaminas, compuestos fenólicos y pigmentos (**Figura 8**).

Figura 8. Clasificación de los antioxidantes en frutas y verduras.

La vitamina C está altamente biodisponible, por tanto, es uno de los antioxidantes hidrosolubles más importantes. Se encuentra bajo dos formas químicas reversibles, el ácido ascórbico y su forma oxidada ácido dehidroascórbico. Ambas formas están en equilibrio en la célula y tienen actividad vitamínica (Blasa *et al.*, 2010).

Su mecanismo de acción es mediante la donación de electrones a especies oxidadas, neutralizando así su poder oxidativo. El ácido ascórbico se ha empleado para evitar el pardeamiento de frutas. En presencia de ácido ascórbico, las orto-quinonas se reducen a fenoles y no tiene lugar el pardeamiento (Maestro Durán y Borja Padilla, 1993). Se utiliza también como conservante, añadiendo vitamina C a alimentos propensos a la oxidación.

El ácido ascórbico aporta la capacidad antioxidante a los zumos cítricos. En cambio, en zumos de manzana o vegetales, donde la cantidad de ácido ascórbico es muy inferior, menos del 5 % de la actividad antioxidante es atribuido al ácido ascórbico (Gardner *et al.*, 2000).

La vitamina E natural incluye cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles. El término vitamina E se utiliza para todos los tocoferoles aunque sólo debería aplicarse al α -tocoferol que es el de mayor actividad biológica (Ramírez Tortosa y Quiles Morales, 2005). Es un potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo en membranas biológicas y tejidos. La vitamina E es una vitamina liposoluble, por lo que se encuentra en olivas, aguacates, almendras, su contenido en frutas y verduras es muy pequeño.

Los pigmentos de las frutas son los que confieren el color al zumo, como antocianinas, carotenoides y clorofilas. Las antocianinas son pigmentos de color azul, púrpura, rojo y matices intermedios de estas coloraciones, se encuentran presentes en numerosos alimentos, frutos, flores y verduras dando lugar a los colores de frutas rojas como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas y grosellas. Se caracterizan por su alta capacidad antioxidante. Químicamente son glucósidos de las antocianidinas, es decir, pertenecen al grupo de los flavonoides. De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. En general, el contenido total de antocianinas en frutas puede estar entre 20 y 1000 mg 100 g⁻¹ de fruta fresca, por ejemplo, la uva de vid (*Vitis vinífera*) tiene un contenido entre 30-750 mg 100 g⁻¹ (Birdle y Timberlake, 1997) y el arándano (*Vaccinium myrtillus*) 300-600 mg 100 g⁻¹ (Kähkönen *et al.*, 2003).

Los carotenoides son pigmentos liposolubles responsables del color amarillo, naranja y rojo de frutas y verduras. El mecanismo de acción de los carotenoides en la salud humana no se ha definido claramente. Una posible hipótesis es que los carotenoides, incluyendo pero no limitándose al β -caroteno, sirven como un supresor de superóxido O₂⁻ (forma altamente reactiva) y como antioxidante en la prevención del daño de ROS a compuestos celulares críticos (Carranco Jáuregui *et al.*, 2011). Se han identificado más de 600 carotenoides, de los cuales, 20 están presentes en el cuerpo humano tras la ingesta de frutas y verduras. En

las verduras el contenido de carotenoides, de mayor a menor cantidad es luteína, β -caroteno, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, β -criptoxantina y anteraxantina. β -Caroteno es usado como ácido retinoico y retinal, que es la forma activa de la vitamina A. Espinacas, tomates y zanahorias tienen un alto contenido en carotenos, teniendo estas últimas un 45-80 % de β -caroteno respecto al contenido total de carotenoides, lo que supone un contenido de 6300 $\mu\text{g}/100\text{ g FW}$ (Kalt, 2005).

Las clorofilas son pigmentos de color verde, presentes en organismos que contienen cloroplastos en sus células, lo que incluye a las plantas y a los diversos grupos de protistas, responsables de realizar la fotosíntesis, proceso que permite a las plantas absorber energía a partir de la luz solar. La mayor parte de las plantas incluyen clorofila a y clorofila b, en un ratio aproximado de 3:1. La clorofila y sus derivados han mostrado importantes funciones promotoras de la salud, tales como actividad antimutagénica, anticancerígena y antiinflamatoria. Se encuentran principalmente en vegetales de hoja verde como espinacas, acelgas o lechuga, entre otros, en un rango de 8 g DW 100 g⁻¹ en pimiento verde a 100 g DW 100 g⁻¹ en espinaca (Ferruzzi y Blakeslee, 2007).

2.4.1.2. Propiedades sensoriales.

Entre las propiedades sensoriales que se evalúan en un alimento están el sabor, olor, textura y apariencia (Abbott, 1999; Bett, 2002). En los zumos se valora como atributo de alta calidad que tengan

características asociadas al “fresh-like”, para ello, se buscan alimentos mínimamente transformados. Se valoran características sensoriales como: sabor a fruta fresca, dulzor, olor propio de cada fruta, presencia de pulpa en suspensión y un color vivo, que recuerde a los componentes del zumo.

Los tratamientos de conservación convencionales como la pasteurización provocan cambios indeseables en el alimento, es por esto que surgen nuevas técnicas de conservación no térmicas que minimicen el efecto del tratamiento sobre características sensoriales. Además, estos atributos pueden verse alterados durante el almacenamiento por reacciones de oxidación, que dan lugar a sabores y olores extraños. Los volátiles del zumo responsables del flavor disminuyen y/o aparecen otros.

La pulpa de la fruta le confiere la turbidez y viscosidad al zumo. La apariencia del zumo también se puede alterar debido a la clarificación. Sensorialmente disminuye la presencia de pulpa en boca y la viscosidad.

2.4.1.3. Nuevos productos.

En Europa, y concretamente en España, es preciso subrayar el progresivo envejecimiento de la población. Estas tendencias poblacionales internacionales y nacionales implicarán serios ajustes, tanto en lo relativo a las necesidades y demandas de los consumidores, como a la oferta de la industria (FIAB). Es por esto, que ha aumentado la demanda de productos cómodos “ready to eat” (RTE), mínimamente

transformados y naturales, sin aditivos. Los consumidores son cada vez más conscientes de la importancia de la dieta y del consumo de alimentos sanos. Para satisfacer las necesidades de los consumidores surgen nuevas tecnologías como las altas presiones, calentamiento óhmico, pulsos eléctricos, microondas, irradiación gamma y ultrasonidos, entre otros. Aseguran la inocuidad del producto y proporcionan los nuevos atributos de calidad demandados (Castro y Saraiva, 2014). A pesar de las conocidas mejoras que suponen, es necesaria una actitud positiva de los consumidores hacia dichas tecnologías. Los europeos y estadounidenses tienen una percepción positiva hacia nuevas tecnologías como las altas presiones. Las razones por las que aceptan las innovaciones tecnológicas son la mejora de la seguridad y calidad del producto y los beneficios medioambientales (Lee *et al.*, 2015). En cambio, los consumidores tienen una asociación negativa hacia los pulsos eléctricos (Pulsed Electric Fields), probablemente debido al nombre que genera temores, ya que asocian la tecnología a radiaciones (Nielsen *et al.*, 2009).

El estudio y diseño de envases es importante para la creación de nuevos productos más cómodos, ya que el envase es el primer contacto con el consumidor. Entre sus funciones, protege el alimento, permite alargar la vida útil y le proporciona información al consumidor. Los envases inteligentes son aquéllos que incorporan algún sistema que monitoriza y comunica información útil de las propiedades y/o estado del alimento envasado.

Otros aspectos como materias primas ecológicas, productos locales y respetuosos con el medio ambiente son atributos valorados por el consumidor. El 54 % de los consumidores señalan la sostenibilidad y el respeto al medio ambiente como uno de los atributos que más valora a la hora de tomar una decisión de compra (FIAB).

2.4.2. Factores que afectan a la calidad.

2.4.2.1. Materia prima.

Durante la maduración se producen cambios en la apariencia, textura y composición de las frutas. Generalmente pierden el color verde y aumentan los colores rojo y amarillo. Se producen cambios en el sabor y el aroma, volviéndose más dulce a medida que el almidón es convertido en azúcar y con la producción de compuestos volátiles frecuentemente aromáticos (FAO). En distintas variedades de fresa se observó que el contenido en ácido ascórbico aumentó desde prácticamente nulo en la fruta verde e inmadura hasta su máximo nivel cuando la fruta está plenamente madura (Maas *et al.*, 1995). Por lo que, el estado de madurez de la fruta utilizada en la elaboración del smoothie determinará, en parte, sus características.

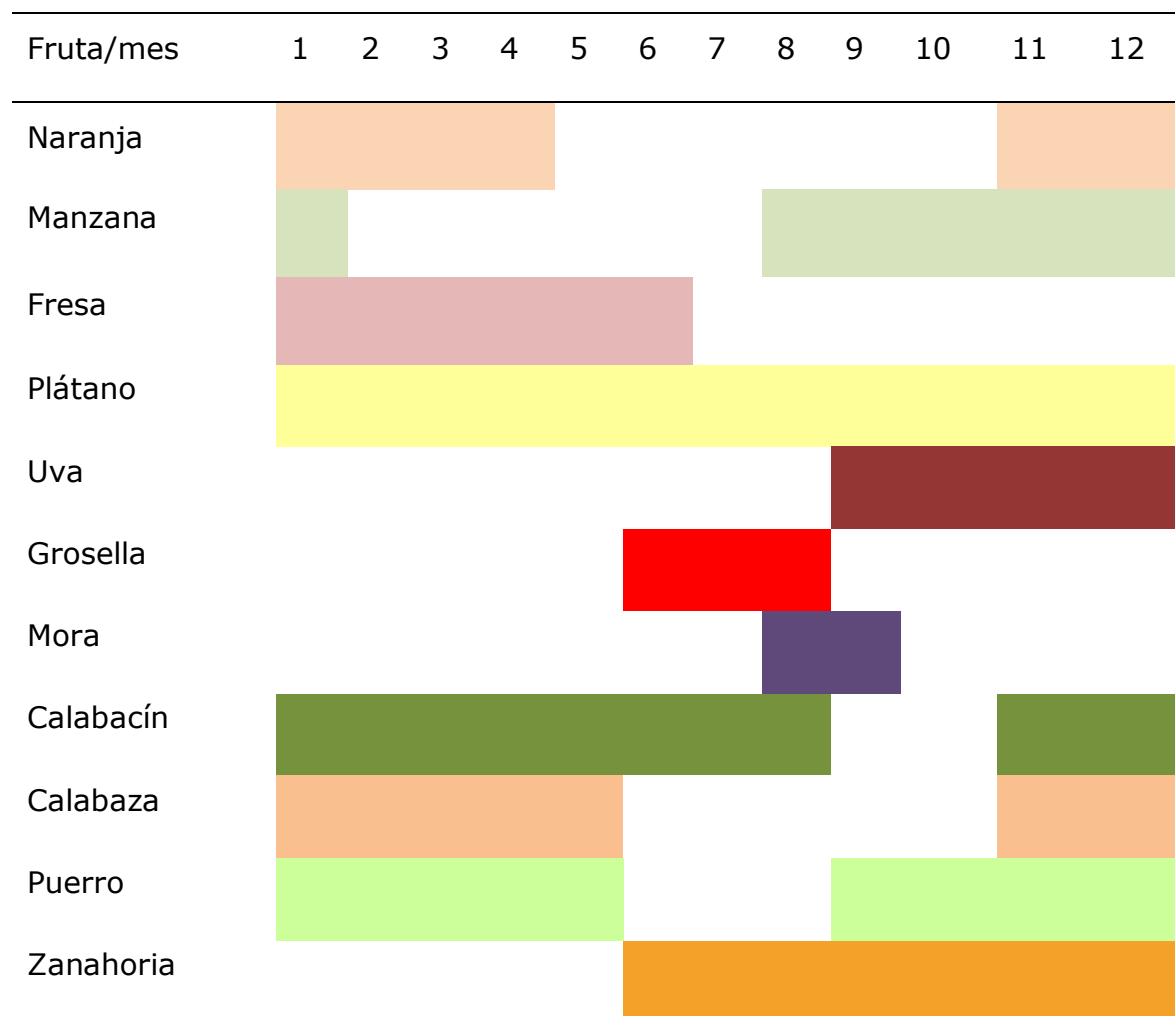
En el trabajo de Bull *et al.*, (2004) se estudiaron características físico-químicas y nutricionales de dos variedades de naranja, Navel y Valencia y, además, se tuvieron en cuenta cuatro etapas de maduración.

La variedad y maduración influyeron en medidas como pH, acidez, viscosidad y actividad microbiológica. El contenido nutricional, como el ácido ascórbico y β -caroteno, también varió entre los dos tipos de naranja. Esto mismo ocurrió en 308 variedades de fresa, donde el ácido ascórbico se encontró en un amplio rango de 32-99 mg/100 g FW (Kalt, 2005).

Para obtener una cosecha, por ejemplo de bayas, de alta calidad, influirá la variedad, el aporte nutricional mineral adecuado y la meteorología (Kikas y Libek, 2005). Por lo anterior, la zona donde se cultive la fruta influirá, mediante el clima y el tipo de suelo, en las características finales del alimento.

La temporada de cada fruta y verdura (**Tabla 6**) depende de las condiciones óptimas necesarias para su desarrollo. Así, cosechas que se producen en verano no encontramos en invierno. Cuando la fruta es cultivada y recolectada en su temporada, la maduración ocurre de manera natural y las frutas y verduras contienen los nutrientes propios y su sabor característico. En cambio, cuando se fuerza la maduración, fuera de su temporada, además de elevar los costes de producción por lo que encarece el producto, no desarrollan las mismas propiedades organolépticas y nutritivas.

Tabla 6. Temporada de algunas frutas y verduras ("Frutas y verduras de temporada en su mejor momento", 2008).



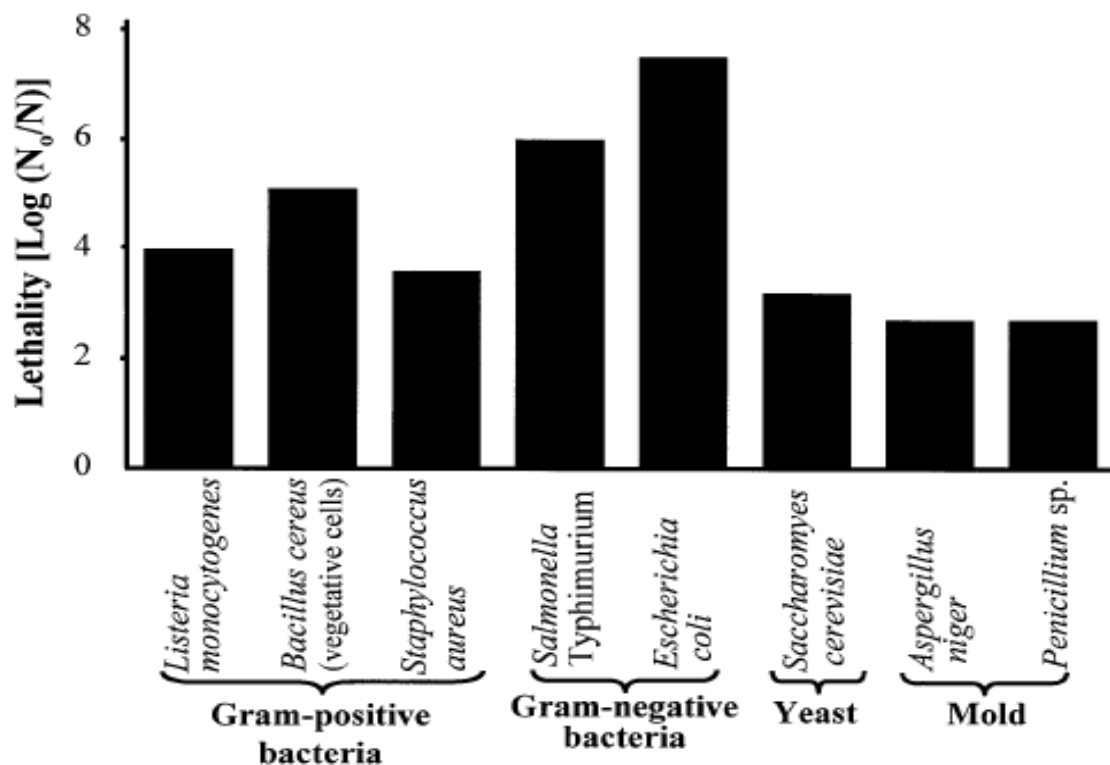
2.4.2.2. Tratamiento de conservación.

El objetivo del tratamiento térmico es conseguir la inocuidad del alimento minimizando los cambios indeseables. Los tratamientos térmicos, como pasteurización y esterilización, son los tratamientos convencionales en la elaboración de zumos de frutas. Dan lugar a alimentos seguros, pero las reacciones químicas que tienen lugar producen “off flavours”, destrucción de nutrientes y otras pérdidas de la calidad del producto (Di Nunzio *et al.*, 2014). El efecto de las altas presiones varía en función de las condiciones del proceso: presión, tiempo y temperatura. Las altas presiones no afectan a los enlaces covalentes de los productos presurizados, por lo que pequeñas moléculas que contribuyen al color o flavor no se ven afectadas, manteniendo así características asociadas al “fresh-like” (Knorr, 1993). HPP puede aumentar o disminuir reacciones enzimáticas y químicas, por tanto, pueden influir indirectamente en el contenido de algunos compuestos del flavor y como consecuencia, podría resultar en cambios sensoriales indeseables del producto (Oey *et al.*, 2008).

La presión ejercida sobre el alimento causa una disminución de volumen. Esto provoca un incremento en la permeabilidad de las membranas de las células, inhibe reacciones energéticas y desnaturaliza enzimas esenciales para el crecimiento y desarrollo de la célula microbiana (Calderón-Miranda *et al.*, 1998). Dentro de los microorganismos existen diferencias en cuanto al grado de destrucción logrado por medio de HPP (**Figura 9**). Las esporas son muy resistentes a las presiones seguidas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La complejidad de la membrana las hace más resistentes por lo que las bacterias Gram negativas son más susceptibles que las Gram positivas a la presión (Castro y Saraiva, 2014; Lado y Yousef, 2002). Otros factores como la naturaleza de la membrana, además del tipo y tamaño de la membrana celular, están envueltos en la resistencia de los microorganismos a la presión (Arroyo *et al.*, 1999).

Figura 9. Letalidad de los microorganismos tras presurizar a 300 MPa/5 °C/30 min (Lado *et al.*, 2002).



Algunos enzimas pueden ser inactivados a temperatura ambiente y baja presión, mientras que otros permanecen inalterados a 1000 MPa. Los efectos de HPP en enzimas dependen del tipo de enzima, naturaleza del sustrato, presión, temperatura y tiempo del proceso. La presión ejercida sobre el alimento causa un cambio conformacional del enzima, resultando en ocasiones reversible, en cambios que producen una mayor exposición del centro activo, o aparición de un segundo centro activo (Anese *et al.*, 1995). Esto supone la activación de enzimas latentes, aumentando la actividad respecto al zumo sin tratar. Aunque existe disparidad de resultados, se conoce bien que la presurización es efectiva destruyendo microorganismos, pero no enzimas. La actividad enzimática residual puede comprometer la vida útil del producto.

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de las altas presiones en las propiedades físico-químicas y nutricionales de los zumos. Puesto que HPP no afecta a los enlaces covalentes de compuestos de bajo peso molecular (Oey *et al.*, 2008), tras el tratamiento no varían parámetros físico químicos como el color (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004), o antioxidantes como las vitaminas (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009). Un zumo presurizado no se diferenció de un zumo fresco sin tratar en el contenido total de vitamina C, carotenoides, sacarosa y antioxidantes (Butz *et al.*, 2003; Fernández-García *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios indicaron un aumento de la capacidad antioxidante de los zumos de frutas o verduras, tras la presurización, debido a la ruptura de la célula y liberación de los compuestos antioxidantes (Di Nunzio *et al.*, 2014; Patras *et al.*, 2009; Suarez-Jacobo

et al., 2011; Vega-Gálvez *et al.*, 2014). HPP tiene diferente efecto sobre los antioxidantes dependiendo del tipo de matriz a tratar, por ejemplo fruta o vegetal (Keenan *et al.*, 2012b; Oey *et al.*, 2008).

A pesar que HPP afecta mínimamente a la calidad de los productos derivados de frutas y verduras, pueden sufrir cambios durante el almacenamiento. Los enzimas que no han sido completamente inactivados pueden producir reacciones de oxidación y reacciones bioquímicas (Oey *et al.*, 2008). Es necesaria la inactivación de enzimas durante el tratamiento de conservación, antes del almacenamiento.

2.4.2.3. Almacenamiento.

Los cambios que se producen en el producto durante el almacenamiento dependen, en gran medida, de las condiciones de temperatura, oxígeno y luz en las que se realiza.

La calidad y frescura de los zumos de frutas y verduras puede ser atribuida a aspectos físico-químicos o sensoriales, como el color, turbidez y flavor. El tratamiento de conservación puede inhibir o reducir la actividad enzimática, conservando, en este último caso, una actividad enzimática remanente. Por otro lado, el tratamiento puede activar enzimas latentes, aumentando así la actividad enzimática con respecto al producto sin tratar. Los enzimas provocarán cambios indeseables de sabor, color, pérdida de nutrientes durante el almacenamiento y condicionará la vida útil del producto.

Los enzimas que provocan cambios de color, flavor y compuestos nutricionales son polifenoloxidasa (PPO), peroxidasa (POD), β -glucosidasa y lipoxigenasa (Liavoga y Matella, 2012). El enzima PPO (EC 1.14.18.1), en presencia de oxígeno, cataliza la hidroxilación de monofenoles a difenoles y la oxidación de difenoles a orto-quinonas. Es altamente inestable y reacciona formando compuestos pardos. Las antocianinas no son buen sustrato de PPO, en cambio reacciona con las o-quinonas y favorece el oscurecimiento (Zhang *et al.*, 2005). POD (EC 1.11.1.7) cataliza la oxidación de compuestos fenólicos, en presencia de peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de pigmentos pardos. Se ha propuesto la existencia de un efecto sinérgico entre PPO y POD puesto que, el hidrógeno de peróxido, el cual utiliza la POD como sustrato para la oxidación, es producto de la oxidación de los fenoles mediante PPO (Tomas-Barberan y Espín, 2001). β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) cataliza la hidrólisis de glucósidos dando lugar a glucosas. Interviene en la liberación de muchos volátiles en frutas y verduras (Orruno *et al.*, 2001). En el flavor interviene también la fructofuranosidasa o invertasa (EC 3.2.1.26) hidrolizando la sacarosa en cantidades equimolares de fructosa y glucosa. El azúcar invertido (glucosa y fructosa) es más soluble y además la fructosa tiene mayor poder endulzante que la sacarosa.

Los zumos de frutas y vegetales son sistemas coloidales bifásicos constituidos por una fase líquida, llamada serum, y una fase más densa, llamada nube. La nube está compuesta por sustancias como las proteínas, pectinas, hemicelulosa y celulosa. Es estabilizada por

compuestos de alto peso molecular, como la pectina soluble del zumo (Balestrieri *et al.*, 1990), que aportaría lo que calificaríamos como turbidez del zumo, atributo valorable por los consumidores. Cuando la pectin metil esterasa (PME) (EC 3.1.1.11) no está inactivada, cataliza la hidrólisis de los enlaces metil ester del ácido poligalacturónico de la pectina. El resultado es metanol y pectina de bajo peso molecular, que forma agregados con cationes como el calcio y precipitan desestabilizando la nube turbia del zumo (Sila *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2003). La poligalacturonasa (PG) (EC 3.2.1.15) cataliza la despolimerización de los enlaces α -1,4-glicosídicos de la pectina de bajo peso molecular, producto de la acción de PME. Esta despolimerización da lugar a la clarificación del zumo, separándose en dos fases y a una drástica disminución de la viscosidad de zumos de frutas y verduras (Eisenmenger y Reyes de Corcuera, 2009).

Los compuestos antioxidantes como fenoles y vitamina C se degradan durante el almacenamiento, disminuyendo la capacidad antioxidante (Zhou *et al.*, 2014). Los fenoles disminuyen durante la vida útil del producto, ya que son el sustrato de enzimas como PPO y POD (Vega-Galvez *et al.*, 2014). Además, el oxígeno del espacio de cabeza del envase y el que se encuentra ocluido en el zumo puede favorecer reacciones de oxidación durante el almacenamiento, lo que podría afectar al contenido en antioxidantes (Keenan *et al.*, 2010). La concentración de vitamina C disminuye dependiendo de las condiciones de almacenamiento, temperatura, oxígeno, luz (Esteve y Frígola, 2007). Nagy (1980) explicó las dos principales maneras de degradación de la

vitamina C: mediante oxidación enzimática y mediante reacciones aerobias y anaerobias no enzimáticas. Al ser una vitamina termolábil es utilizada como un indicador de la pérdida de vitaminas.

Las características sensoriales son indicadores de frescura por lo que son importantes para la aceptabilidad del producto. Como se ha explicado anteriormente, HPP no afecta directamente a moléculas responsables del flavor en frutas o vegetales. Si bien, se debe tener en cuenta aspectos que indirectamente pueden alterar dichas características, como la actividad enzimática residual. Puede destruir compuestos volátiles o favorecer la aparición de otros resultando en cambios de flavor indeseables. Los parámetros visuales relativos a la estabilidad y color del zumo disminuyen durante el almacenamiento, debido a la acción de enzimas. Aunque estos cambios cromáticos pueden producirse por la actividad enzimática residual, hay otras reacciones no enzimáticas que pueden alterar la estabilidad del zumo, como son, la reacción de Maillard y oxidación del ácido ascórbico (Wang *et al.*, 2006).

2.4.3. Métodos para evaluar la calidad.

La norma general del Codex para zumos de fruta y néctares (CODEX STAN 247-2005) define los criterios de calidad: los zumos y néctares de frutas deberán tener el color, aroma y sabor del zumo de la misma clase de fruta de la que se hace. La fruta no deberá retener agua del lavado, del vapor u otras operaciones preparatorias que técnicamente son inevitables. El término de autenticidad se define como el

mantenimiento en el producto de las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales de la fruta de la que procede. El análisis de dichas características nos aportará información sobre la calidad y el estado del zumo.

2.4.3.1. Métodos Físicos.

Las características físicas del zumo son apreciables a simple vista, por lo tanto influirá en la percepción del consumidor sobre el producto.

- Color

El color del zumo corresponde a los pigmentos presentes en las frutas utilizadas en su elaboración. Puede verse afectado por el tratamiento de conservación o por reacciones enzimáticas o no enzimáticas que ocurren durante el almacenamiento. Se puede medir de forma objetiva mediante reflectancia utilizando un colorímetro. Mide tres coordenadas L^* (Lightness: blanco-negro), a^* (redness: rojo-verde), b^* (yellowness: amarillo-azul). Además, a partir de esas coordenadas se puede calcular la saturación del color (Chroma, C^*) y el tono del color (ángulo hue, H^*). Otra medida que nos sirve para evaluar el oscurecimiento del zumo es el índice de pardeamiento. Los pigmentos del zumo se extraen con metanol y se mide a 415 nm. La absorbancia comparada con un zumo control nos indicará el pardeamiento del zumo.

- Clarificación

La estabilidad del zumo es un parámetro físico indicador del estado y calidad del zumo. Por acción de PME, se forman agregados de pectina desesterificada, que precipita separando el zumo en dos fases. La medida de la turbidez puede llevarse a cabo mediante un turbidímetro (NTU). Espectrofotométricamente podemos medir el % de transmitancia del zumo, dónde 100 % sería agua. Ambas medidas nos dan información de la clarificación del zumo.

2.4.3.2. Métodos Químicos.

Los zumos son valorados por sus beneficios aportados por antioxidantes y vitaminas. Estos se pueden degradar durante el tratamiento de conservación, por lo que su estudio nos da información sobre la calidad del producto.

- Capacidad Antioxidante

Los múltiples métodos de análisis de la capacidad antioxidante indican la gran variedad de maneras en que los resultados pueden ser expresados. La medida de actividad antioxidante, especialmente de antioxidantes que son mezcla o están en un sistema multifase, no pueden ser evaluados satisfactoriamente con un simple test, debido a que hay variables que pueden influir en el resultado. Son necesarios varios métodos de análisis para evaluar la actividad antioxidante (Antolovich et

al., 2002). Dicha actividad no puede medirse directamente, sino más bien por los efectos del antioxidante para controlar la oxidación.

El radical DPPH absorbe a 517 nm y la actividad antioxidante es determinada monitorizando la disminución de absorbancia que indica la captación de radicales libres. Los resultados son expresados como IC₅₀, que es la cantidad de antioxidante contenido en nuestra muestra, necesario para disminuir un 50 % la concentración inicial del radical DPPH.

El método FRAP está basado en la reducción del complejo Fe (TPTZ)³⁺ a la forma coloreada azul Fe (TPTZ)²⁺, por antioxidantes en medio ácido. Los resultados son obtenidos por el aumento de absorbancia a 593 nm y expresados como equivalente μ molar Fe²⁺. Debido al bajo coste, velocidad y sencillez técnica, es una herramienta útil para estimar el poder reductor/antioxidante de extractos vegetales acuosos.

La determinación mediante TEAC se basa en la capacidad de los antioxidantes por captar el radical ABTS⁺. El potencial de Fe³⁺ (TPTZ) es comparable con el ABTS, los mismos compuestos reaccionan en el método TEAC y FRAP la diferencia es que TEAC se realiza a pH neutro y FRAP a pH ácido (Prior *et al.*, 2005).

- Compuestos antioxidantes.

Entre los métodos más usados comúnmente para determinar polifenoles en alimentos destaca el método Folin-Ciocalteu. Se basa en la medida a 765 nm de los compuestos violetas formados al reaccionar los

fenoles con el reactivo Folin. Hay controversia con este método utilizado en la medida de compuestos fenólicos totales, debido a la hipótesis que sobreestima el contenido, probablemente debido a la falta de sensibilidad del reactivo Folin-Ciocalteu, el cuál reacciona no sólo con los fenoles sino también con otros compuestos reductores, como los carotenoides, aminoácidos, azúcares y vitamina C (Prior *et al.*, 2005; Vinson *et al.*, 2001).

Un método más preciso para la determinación de fenoles es mediante HPLC. Permite la rápida y simultánea separación, identificación y cuantificación de los distintos compuestos fenólicos según sus propiedades espectrales y su orden de elución. Para la cuantificación de flavonoles, flavonas y flavononas en alimentos se ha empleado HPLC-DAD y HPLC-MS. En la primera técnica, las áreas del pico de cada uno de los compuestos a investigar se emplean para la cuantificación, mientras que el detector de masas se utiliza para confirmar, mediante su masa, el tipo de compuesto (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Para la identificación de antocianinas y carotenoides se usan las propiedades espectrales. La técnica más empleada es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) puesto que esta permite la separación simultánea, identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas, sin requerir pureza excesiva de los extractos (Escribano-Bailón *et al.*, 2004). De la misma manera que en la determinación de fenoles, la combinación HPLC-MS proporciona resultados más sensibles.

El ácido ascórbico (AA) es un componente importante de nuestra nutrición y se utiliza como aditivo en muchos alimentos debido a su

capacidad antioxidante, por lo tanto, aumenta la calidad y valor nutricional del alimento. Sin embargo, la vitamina C, al ser muy termolábil, es susceptible a la degradación vía aeróbica o anaeróbica. El procesamiento de los zumos o el almacenamiento a distintas condiciones pueden ser factores que degraden el contenido de esa vitamina. Es por esto, que la determinación de vitamina C se utiliza como indicador de la pérdida de otras vitaminas y es un criterio válido para evaluar componentes organolépticos o nutricionales (Esteve y Frígola, 2007). La determinación mediante una valoración utilizando fenol-indofenol como indicador permite una estimación de la cantidad de vitamina C. Es un método rápido y sencillo, aunque no muy preciso. La determinación mediante HPLC permite la identificación de ácido ascórbico y su forma oxidada ácido dehidroascórbico (DHAA). Este método, además de ser más preciso y fiable, aporta más información.

2.4.3.3. Métodos Microbiológicos.

El recuento microbiológico establecerá la vida útil del producto, asegurando la inocuidad del mismo. Los zumos al ser ácidos, en términos de microbiología, los patógenos no son generalmente tan importantes como el desarrollo de microorganismos como mohos y levaduras. En cambio, productos frescos con baja acidez ($\text{pH} > 4.5$) y alto contenido en agua ($A_w > 0.85$) puede favorecer el crecimiento de una variedad de microorganismos patógenos (Castro y Saraiva, 2014).

Los criterios de calidad microbiológica para zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados están regulados por los reglamentos CE 2073/2005 modificado por 1441/2007 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. La ISO 6579:2002 describe un método para la detección de *Salmonella spp.* Debe haber ausencia en 25 gramos durante la vida útil. Los criterios de higiene de los procesos siguen el método de referencia ISO 16649-1:2001 para medir *Escherichia coli*. Se aplica en el proceso de elaboración. En caso que el resultado sea insatisfactorio se debe realizar mejoras en la higiene de la producción y selección de las materias primas. Se analizará *Listeria monocytogenes* en alimentos que puedan favorecer su desarrollo, antes que el alimento haya dejado el control del explotador de la empresa alimentaria. En circunstancias normales no es útil realizar pruebas regulares sobre este criterio en productos con tratamiento térmico sin posibilidad de recontaminación o en alimentos con un $\text{pH} \leq 4.4$ o $\text{pH} \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$. En cualquier caso, los valores de *Listeria* serán inferiores a 100 ufc g^{-1} .

Se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios (reglamento CE 401/2006). Los niveles máximos de micotoxinas son, para ocratoxina A, en ingredientes de zumo de uva $2 \mu\text{g/ kg}$; patulina en zumo de frutas, en particular, en zumo de manzana $50 \mu\text{g/ kg}$.

2.4.3.4. Métodos Sensoriales.

El análisis sensorial es una disciplina muy útil para conocer las propiedades organolépticas de los alimentos. Se utiliza para el control de calidad y aceptabilidad de un alimento. Un análisis sensorial se puede realizar para concretar los ingredientes que formarán la composición adecuada para que el alimento sea aceptado por el consumidor, evaluar los efectos del tratamiento y la degradación durante su vida útil. La herramienta para llevar a cabo el análisis son las personas a través de sus sentidos.

Las características sensoriales que se evalúan para determinar la calidad son apariencia, textura, sabor y olor. El color es la primera impresión del consumidor respecto al producto. Es uno de los atributos que más influyen en la percepción de calidad por parte del consumidor, determina la compra y el consumo regular (Francis, 1995). La presencia de pulpa, el efecto del tratamiento y/o almacenamiento, influirá en el color y apariencia del zumo. El flavor es otro análisis determinante para la calidad e influye directamente en las preferencias de los consumidores. El conjunto de todos los atributos determinará la aceptabilidad global por parte del consumidor.

Para llevar a cabo el análisis sensorial, es necesario que se realice en las condiciones adecuadas. La sala de catas (ISO 8589:2007) debe estar acondicionada para la realización de las pruebas, iluminada, aislada acústicamente y poseer los equipos adecuados para su ventilación y acondicionamiento térmico (20 a 22 °C). Se recomiendan como horarios

adecuados entre las 11 de la mañana y la 1 de la tarde y de 5 a 6 de la tarde (Anzaldúa-Morales *et al.*, 1983).

Los catadores son seleccionados y entrenados. Debe ser una persona con disponibilidad e interés, ya que se compromete a realizar las catas cuando se establezcan. Las habilidades sensoriales se entrenarán en distintas sesiones, donde aprenderá a detectar y evaluar los distintos atributos.

Hay distintos grupos de catadores o jueces: (Sancho-Valls *et al.*, 1999).

- Catador experto o profesional: Trabaja como catador y está especializado en un sólo producto.
- Catador entrenado o panelista: Miembro de un equipo o panel de catadores con habilidades desarrolladas, incluso para pruebas descriptivas con alta frecuencia (7-15 jueces).
- Catador semi-entrenado: Persona con entrenamiento que no forma parte de un panel, pero realiza pruebas descriptivas (máximo 25 jueces por panel).
- Catador no entrenado o consumidor: No está entrenado, el panel se forma al azar.

El tipo de pruebas que se realizará dependerá de la información que queremos recoger:

- Pruebas de aceptación, donde el catador se limita a evaluar el grado de aceptación o preferencia de una muestra.

- Pruebas discriminatorias, se basan en comparar dos o más muestras u ordenar en base a algún atributo.
- Pruebas descriptivas (QDA) permiten describir, comparar y valorar las características de las muestras en función de unas categorías, puntúan las muestras según una escala.

2.5. Efecto de las altas presiones en derivados de frutas y verduras.

Los microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* y *S. aureus* requieren de 340 MPa/20 min y 400 MPa/20 min, respectivamente, para una reducción de 6 ciclos logarítmicos. Los microorganismos en estado vegetativo se inactivan a presiones de 400-600 MPa, mientras que las esporas y algunas especies resisten hasta 1000 MPa a temperatura ambiente (Palou *et al.*, 1997). La aplicación en zumo de granada de tratamientos 350 MPa/30 s resultó en una disminución del 98.4 % de bacterias mesófilas y 99.2 % de mohos y levaduras, pero no se encontró un efecto adicional tras aplicar 350 MPa/90 s (Varela-Santos *et al.*, 2012). En el puré de fresa, el tratamiento a 350 MPa/1, 5, 15 min/0 °C no fue efectivo en la reducción de bacterias mesófilas totales. En cambio, el mismo tratamiento a 50 °C y el tratamiento térmico, disminuyeron la carga de mohos y levaduras (Marszalek *et al.*, 2015). En puré de manzana la aplicación de 400 MPa/5 min/20 °C fue estable durante 21 días a 5 °C y comparable con el tratamiento convencional de pasteurización (Landl *et al.*, 2010).

No se han encontrado diferencias significativas en diferentes parámetros físico-químicos como pH, °Brix o acidez, entre otros, en zumo de naranja (600 MPa/1 min/20 °C) (Bull *et al.*, 2004), arándano (200, 400, 600 MPa/5-15 min/25 °C) (Barba *et al.*, 2013), granada (350-550 MPa/30-150 s/20 °C) (Varela-Santos *et al.*, 2012) o manzana (430 MPa/7 min/20 °C) (Juárez-Enríquez *et al.*, 2015).

Las variaciones de color entre los zumos de granada sin tratar y presurizados fue significativamente diferente para los HPP 350, 450 y 550 MPa, que tuvieron mayores diferencias de color indicando un efecto de la presurización sobre el color del zumo (Varela-Santos *et al.*, 2012). Los parámetros de color se vieron afectados significativamente por el tratamiento térmico y HPP 400, 500, 600 MPa/ 15 min/10-30 °C en puré de mora y fresa, aunque se encontraron mayores diferencias para el producto pasteurizado (Patras *et al.*, 2009). El puré de fresa pasteurizado también desarrolló mayores diferencias que el presurizado a 350/5 min/0 °C (Marszalek *et al.*, 2015). Sin embargo, Keenan *et al.* (2011) vieron menos diferencias de color en un smoothie de diferentes frutas pasteurizado, que en el presurizado a 400 MPa/1 min/20 °C.

En néctar de mango no hubo diferencias tras aplicar 600 MPa/1 min/20 °C y 110 °C/8.6 s en el contenido total de carotenoides (Liu *et al.*, 2014). Lo mismo indicaron Bull *et al.* (2004) en zumo de naranja a 600 MPa/1 min/20 °C. En cambio, Velázquez-Estrada *et al.* (2013) no encontraron diferencias en zumo de naranja tras los tratamientos a 100, 200, 300 MPa/20 °C, mientras que la pasteurización (90 °C/1 min) causó una disminución cerca del 35 % en su contenido total. El contenido total

de antocianinas fue similar o mayor en el zumo de arándano presurizado (200, 400, 600 MPa/5, 9, 15 min/25 °C), que en el presente en el zumo fresco (Barba *et al.*, 2013). El contenido de antocianinas, en puré de fresa, disminuyó tras la pasteurización con respecto al puré fresco. En el puré de fresa presurizado (400, 500, 600 MPa/15 min/10-30 °C) no se encontraron diferencias (Patras *et al.*, 2009). Marszalek *et al.* (2015) tampoco encontraron diferencias, en el contenido total de antocianinas, en puré de fresa presurizado, ni en el pasteurizado, con respecto al puré fresco.

El efecto de la presión sobre la capacidad antioxidante no es la misma para todos los productos alimenticios. El zumo de naranja redujo el índice antioxidante medido mediante TEAC después del tratamiento en un rango de presiones de 100-800 MPa combinada con temperaturas desde 30 hasta 65 °C (Indrawati *et al.*, 2004). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre el zumo de manzana control y el presurizado (100, 200, 300 MPa/20 °C), analizado mediante FRAP y DPPH, en cambio mostraron diferencias con el zumo pasteurizado. Velázquez-Estrada *et al.* (2013) obtuvieron resultados de FRAP más bajos en el zumo de naranja pasteurizado y presurizado que en el zumo fresco, en cambio con el método TEAC sólo encontraron diferencias en el zumo pasteurizado respecto al zumo presurizado y fresco.

El contenido total de vitamina C y de ácido ascórbico no se vio afectado por tratamientos de 200 MPa/5-15 min/25 °C en zumo de arándano (Barba *et al.*, 2013), ni en puré de manzana tras aplicar 400 MPa/5 min/20 °C y pasteurización media (75 °C/10 min) (Landl *et al.*,

2010). En una bebida a base de vegetales, se retuvo el 91 % de ácido ascórbico tras la presurización a 100-400 MPa/2-9 min/30 °C y el 89 % tras la pasteurización a 98 °C/21 s (Barba *et al.*, 2010). Se obtuvieron resultados similares en el contenido de ácido ascórbico de un zumo de arándano, donde las muestras tratadas a 400-600 MPa/5-15 min fueron significativamente inferiores (92 %) que el zumo fresco (Barba *et al.*, 2013). En un zumo de manzana, no hubo diferencias en el contenido total de vitamina C, entre los zumos tratados a 100, 200, 300 MPa/20 °C y el zumo control, en cambio, el zumo pasteurizado conservó alrededor del 10 % de vitamina C tras el tratamiento (Suárez-Jacobo *et al.*, 2011). Igualmente, los tratamientos térmicos causaron una rápida disminución de ácido ascórbico en puré de fresa (Patras *et al.*, 2009).

Los resultados sobre el efecto de las presiones en los fenoles son muy diversos. Según Patras *et al.*, (2009) el puré de fresa presurizado aumentó el contenido en polifenoles. Terefe *et al.* (2009a) observaron una disminución de estos componentes, mientras que Cao *et al.* (2012) no observaron diferencias. El contenido fenólico total en puré de manzana no cambió tras 400 MPa/5 min/20 °C, en cambio se vio afectado por 600 MPa/5 min/20 °C y TP (75 °C/10 min) (Landl *et al.*, 2010). En puré de mora tampoco hubieron diferencias, en el contenido fenólico, entre 400 MPa/15 min/0 °C, 70 °C/2 min y un puré fresco. De igual manera, en zumo de naranja no hubo diferencias entre el zumo presurizado y el fresco, pero sí se encontraron diferencias con el tratado térmicamente (90 °C/1 min) (Velázquez-Estrada *et al.*, 2013). Los fenoles parecen ser resistentes a la presurización, incluso aumentaron

ligeramente su contenido, 13–27 % tras 200 MPa/5-15 min/25 °C y 24 % tras 400 MPa/15 min/25 °C (Barba *et al.*, 2013).

En el zumo de naranja aumentaron los flavonoides tras 200-300 MPa/20 °C con respecto al zumo fresco y al pasteurizado (Velazquez-Estrada *et al.*, 2013). Los flavonoides y flavonoles en zumo de manzana presurizado (350 MPa/10 min/20 °C) fueron superiores al zumo control (Abid *et al.*, 2014). En cambio, en puré de fresa pasteurizado (90 °C/15 min), se encontró mayor contenido de quercetina que en el zumo fresco y que en el tratado a 300 MPa/1-15 min/0 °C (Marszalek *et al.*, 2015).

El enzima polifenoloxidasa (PPO) ha resistido presiones de hasta 1200 MPa durante 10 minutos antes de inactivarse (Knorr, 1993), aunque es más sensible a pH elevados. La inactivación enzimática depende de la matriz del producto. PPO de patata y champiñón requiere 800-900 MPa para inactivarse, mientras que enzimas de albaricoque, fresa y uva son más sensibles y requieren 100, 400 y 600 MPa, respectivamente (Hendrickx *et al.*, 1998). García-Palazón *et al.* (2004) observaron una total inactivación de PPO en fresa, a presiones entre 400-800 MPa, a temperatura ambiente. Presiones de 600, 700, 800 y 900 MPa a 25 °C inactivaron PPO de manzana, uva, aguacate y pera, respectivamente (Weemaes *et al.*, 1998). Por el contrario, se han observado activaciones del enzima PPO, en puré de fresa a presiones de 300-400 MPa/20-60 °C (Cano *et al.*, 1997), 690 MPa/24 °C (Terefe *et al.*, 2010), en zumo de manzana a 450 MPa (Bayindirly *et al.*, 2006) y en mora a 400 y 800 MPa/5 min (García-Palazón *et al.*, 2004).

La peroxidasa (POD) es un enzima muy resistente, redujo un 35 % su actividad inicial tras aplicar 600-800 MPa/15 min en fresa (García-Palazón *et al.*, 2004). Se ha observado una correlación negativa con el aumento de la presión a temperatura ambiente y la actividad enzimática, es decir, a mayor presión menor actividad enzimática (Terefe *et al.*, 2010). Esto se observó en zumo de manzana tras aplicar 250 /350 /450 MPa/20 °C/10 min (Abid *et al.*, 2014). Además, la combinación de presión con alta temperatura favorece la inactivación. Por el contrario, se ha observado un aumento de la actividad peroxidasa tras aplicar tratamientos HPP suaves. La aplicación de 300 MPa/20 °C (Cano *et al.*, 1997) y 400 MPa/ 5-10 min (García-Palazón *et al.*, 2004) aumentó la actividad enzimática en puré de fresa. De la misma manera ocurrió en zumo de naranja tras aplicar 400 MPa/30-60 °C (Cano *et al.*, 1997). En frutos rojos, como en la mora, no se ha observado actividad peroxidasa (García-Palazón *et al.*, 2004).

La pectin metil esterasa del zumo de naranja se inactivó a presiones mayores de 100 MPa a 30 °C (Polydera *et al.*, 2004). Dicha enzima se redujo hasta el 8 % tras la aplicación de 600 MPa/1 min (Fellows, 2009). En cambio, la aplicación de baja presión (100-250 MPa) a temperaturas mayores de 50 °C (Polydera *et al.*, 2004) y 200-400 MPa a temperatura ambiente (Cano *et al.*, 1997), tuvo un efecto antagónico. La PME de la fresa es muy estable, como la PME de naranja. Se consiguió la inactivación del 90 % del enzima de fresa a presiones mayores de 850 MPa (Ly-Nguyen *et al.*, 2002b). En zanahoria se consiguió el 40 % de inactivación tras el tratamiento a 100 MPa/25 °C/ 10 min (Kim *et al.*,

2001), aunque la aplicación de presiones inferiores a 300 MPa y temperaturas superiores a 50 °C aumentó la actividad PME (Ly-Nguyen *et al.*, 2002a).

Hay estudios que sugieren que HPP retiene mejor las características frescas que el tratamiento térmico tradicional (Patras *et al.*, 2009). La HPP es conocida por extender la vida útil garantizando la seguridad y frescura del producto. Así en un zumo de naranja, zanahoria y limón no se encontraron cambios en el olor, sabor y calidad general, tras 21 días de almacenamiento a 4 °C (Butz y Tauscher, 2002). En cambio, en un puré de manzana, el tratamiento a 400 MPa/5 min/20 °C no impidió totalmente la aparición de cambios indeseables durante 21 días de almacenamiento (Landl *et al.*, 2010). Baxter *et al.* (2005) presurizaron zumo de naranja a 600 MPa/1 min y encontraron que el olor y flavor fue aceptable para los consumidores tras 12 semanas de almacenamiento a 10 °C. En smoothies presurizados a 450 MPa/1, 3, 5 min/20 °C y pasteurizados (70 °C/10 min) no se encontraron efectos por el tratamiento. En cambio, durante el almacenamiento disminuyó la aceptabilidad sensorial total en ambos tratamientos (Keenan *et al.*, 2011)

3. Material y Métodos.

3.1. Diseño experimental.

El diseño experimental se basó en parte de la investigación publicada por Keenan *et al.* (2010, 2011, 2012a y 2012b). Después de los ensayos sensoriales preliminares, se eligió una formulación comercial de batidos que contiene frutas frescas. Se compararon smoothies de cinco tratamientos: tres tratamientos diferentes de altas presiones (350, 450, 600 MPa), un tratamiento térmico (85 °C) y un control al que no se aplicó ningún tratamiento. Se midieron recuentos microbiológicos, actividades enzimáticas, el estado antioxidante, diferentes propiedades físicas y los principales nutrientes. La calidad de los smoothies se evaluó a las 48 horas después de la elaboración. Este período de tiempo representa el tiempo transcurrido desde el procesado al inicio del periodo de venta (incluido el almacenamiento post-procesamiento, transporte y almacenamiento antes de la venta al por menor en el supermercado). Se realizaron recuentos microbianos para determinar si los batidos cumplen con los estándares de calidad microbiológicos después de 30 días de almacenamiento refrigerado. Todos los datos fueron analizados por ANOVA utilizando el paquete Statistix 8 para Windows (software analítico, Tallahassee, FL, EE.UU.). Todas las mediciones y análisis se realizaron, al menos, por triplicado

3.2. Preparación de la muestra.

Se compraron las frutas y verduras en un mercado local, sujeto a temporada y disponibilidad. Se procedió a la elaboración mediante una formulación previa para cada tipo de smoothie.

Smoothie de frutas: 33 % Naranja (*Citrus sinensis* v. Navel-late), 33 % Zumo de Manzana (*Pyrus malus* v. Golden delicious), 14 % Fresa (*Fragaria ananassa* v. Pájaro), 10 % Manzana (*Pyrus malus* v. Golden delicious), 10 % Plátano (*Musa cavendishii* v. Pequeña enana).

Smoothie de frutos rojos: 20 % Fresa (*Fragaria ananassa* v. Pájaro), 20 % Naranja (*Citrus sinensis* v. Navel-late), 16 % Manzana (*Pyrus malus* v. Golden delicious), 10 % Banana (*Musa cavendishii* v. Pequeña enana), 10 % Mora (*Rubus glaucus* v. Boysen), 10 % Uva negra (*Vitis vinifera* v. Moscatel de Hamburgo), 7 % Grosella (*Ribes rubrum* v. Premier Groiselle-raisin), 5 % Uva blanca (*Vitis vinifera* v. Italia), 2 % Zumo de Lima (*Citrus aurantifolia* v. Lima ácida).

Smoothie de verduras: 20 % Zanahoria escaldada 10 min (*Daucus carota*), 20 % Manzana (*Pyrus malus* v. Golden delicious), 20 % de Pectina cítrica al 1 %, 19.9 % Calabacín (*Cucurbita pepo*), 15 % Calabaza (*Cucurbita moschata* v. butternut), 5 % Puerro escaldado 20 min (*Allium ampeloprasum* v. porrum), 0.1 % Sal.

Los smoothies se obtuvieron usando un exprimidor (Robot Coupe C40, Bourgogne, Francia) y se mezcló en un tanque para conseguir la composición mencionada. Los smoothies control y los presurizados fueron

envasados en botellas de 250 ml de tereftalato de polietileno (PET) (Sunbox, Madrid, Spain). Para los pasteurizados se usó una bolsa HT300 (Seal Air Cryovac, Milano, Italy). Ambos envases fueron favorables para HPP y TP, respectivamente, y previenen de posibles efectos negativos en el flavor del smoothie debido al material de envasado. Los smoothies envasados se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad durante un máximo de una hora antes de su procesamiento.

3.3. Aplicación de altas presiones y tratamiento térmico.

HPP consistió en la presurización a una temperatura inicial de 9-10 °C, que es una temperatura de trabajo viable desde un enfoque industrial, que evita el sobrecalentamiento del smoothie durante la presurización y limita los costes energéticos derivados del agua de enfriamiento. Se utilizó un equipo industrial 6500/120 para HPP (Hiperbárica, Burgos, España). Las principales características del sistema de HPP fueron: rendimiento de 555 kg por hora, capacidad de los buques de 120 L, diámetro de los buques en el interior de 200 mm, y la superficie ocupada de 37 m². La medición de la presión se hizo con un transductor de presión IS-20H (instrumento de Wika, Lawrenceville, EE.UU.) capaz de medir presiones de 0 a 689 MPa ($\approx$ 100.000 Psi). La temperatura inicial del agua situada en la entrada del buque fue medida por un sensor de temperatura Pt100 (IFM electrónico, El Prat de Llobregat, España). Se ensayaron tres condiciones diferentes de presurización (350, 450, 600 MPa) para el Ensayo I y una presión (350

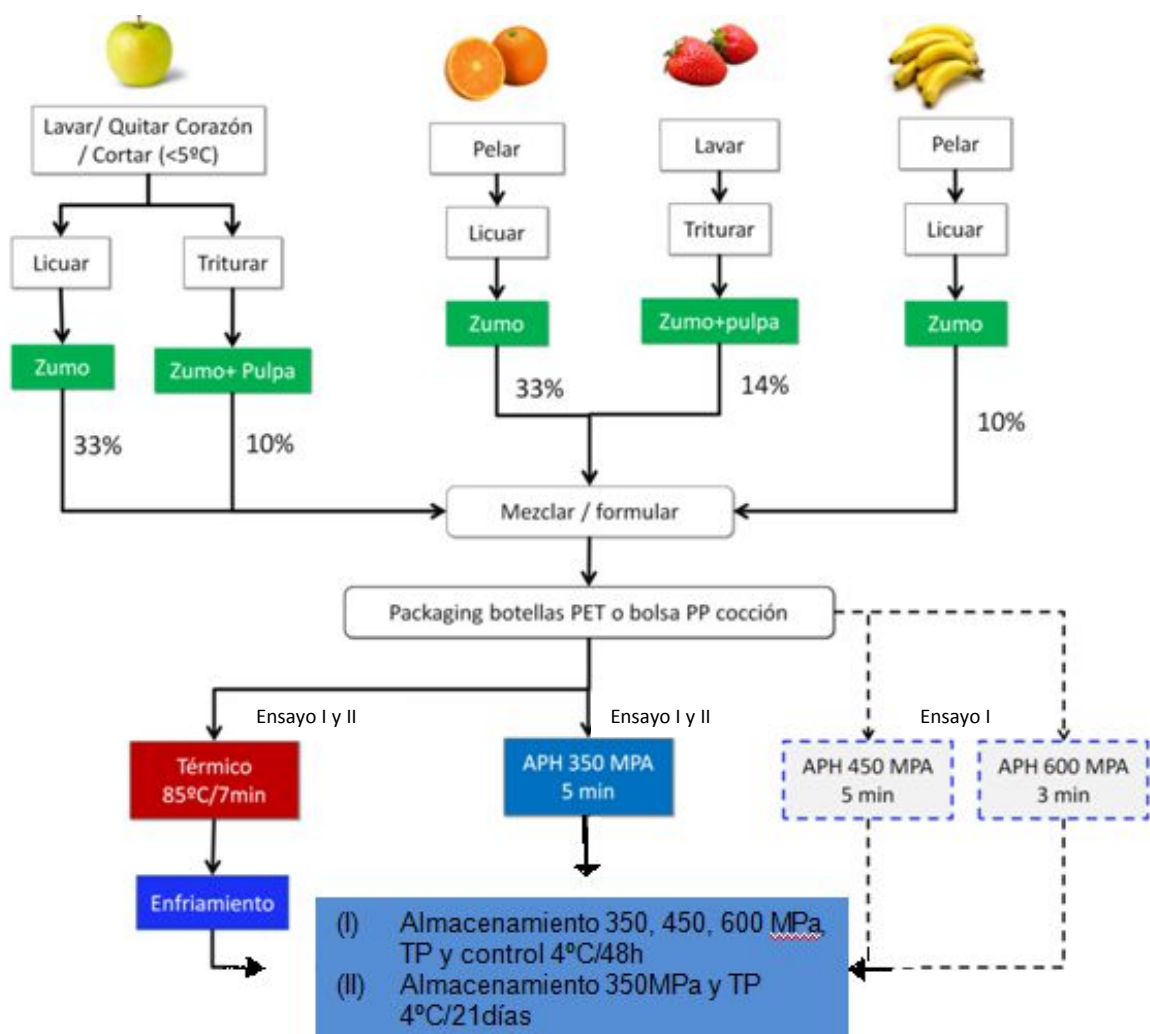
MPa) para los ensayos II, III y IV. Para $P_{\max} = 350$ MPa, la rampa de presión fue de 200 MPa min^{-1} , tiempo de mantenimiento 5 min y el tiempo total de procesamiento de 7 min 18 s. Para $P_{\max} = 450$ MPa, la rampa de presión fue de 215 MPa min^{-1} , tiempo de mantenimiento 5 min y el tiempo total de procesamiento de 7 min 40 s, y para $P_{\max} = 600$ MPa, la rampa de presión era de 230 MPa min^{-1} , tiempo de retención de 3 minutos y el tiempo total de procesamiento de 5 min 8 s. Con tales parámetros, el aumento de la temperatura estuvo por debajo de $3.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ cada incremento de 100 MPa (Patazca *et al.*, 2007), lo que indica que la temperatura de la muestra estuvo por debajo de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a 600 MPa. Las muestras tratadas térmicamente fueron introducidas en un autoclave Ilraplus (Ilpra Systems, Mataró, Spain) y calentadas a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 minutos, con una rampa inicial de $5.7 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y el tiempo total del proceso fue de 27 min. Para los ensayos II, III y IV se procedió de la misma manera para el smoothie control, HPP-350 MPa y TP- $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Después de procesar, las muestras fueron almacenadas durante 48 horas (ensayo I), 21 días (ensayo II) y 28 días (ensayo III y IV) a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en una cámara climática Climacell 707 (MMM Medcenter Einrichtungen, München, Germany) en condiciones de venta al por menor (12 horas a 100 lx / 12 horas en oscuridad).

3.4. Elaboración de smoothies.

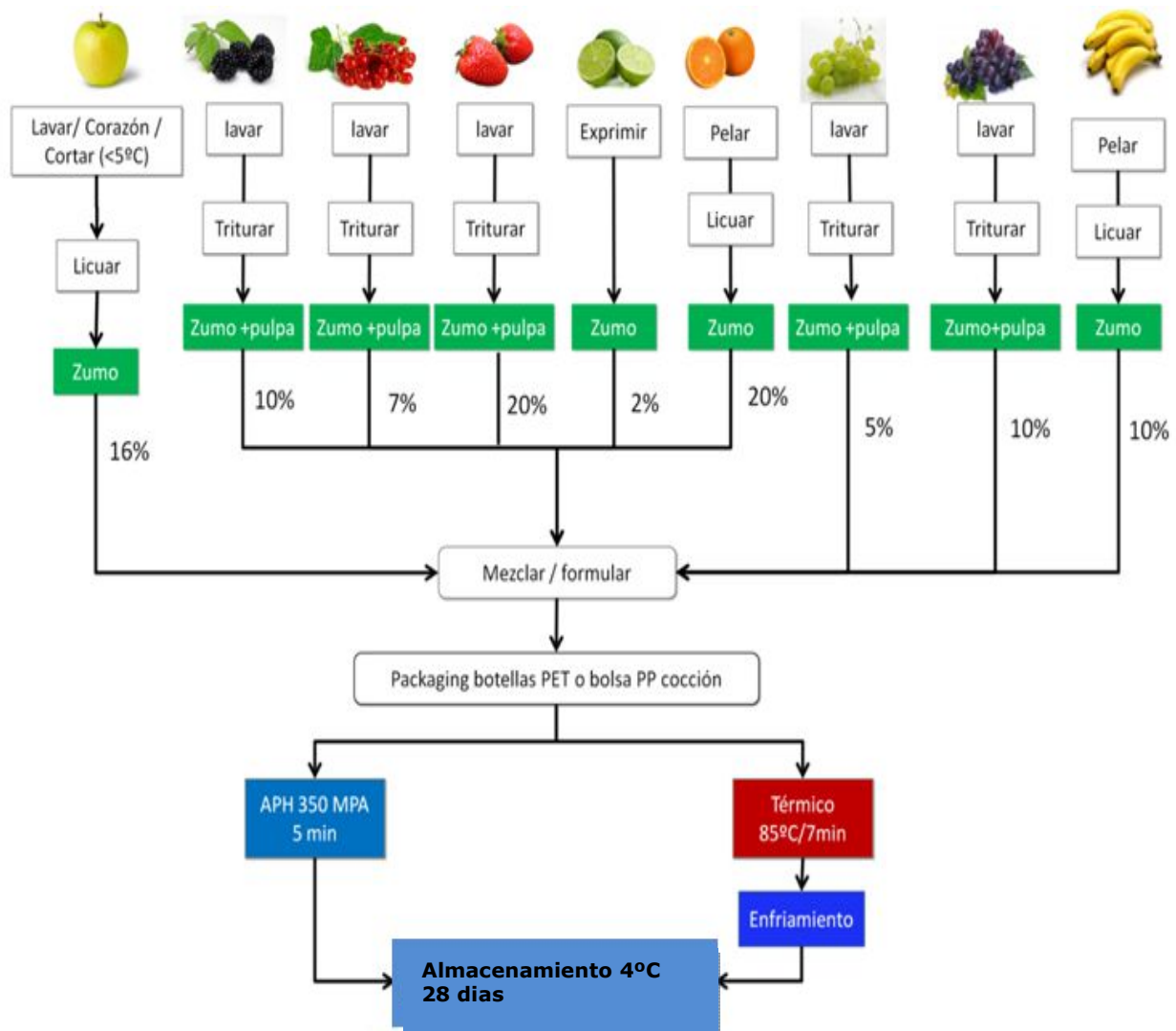
3.4.1. Elaboración de smoothie de frutas.

Figura 10. Diagrama de flujos del proceso de elaboración de smoothie de frutas (Ensayos I y II).



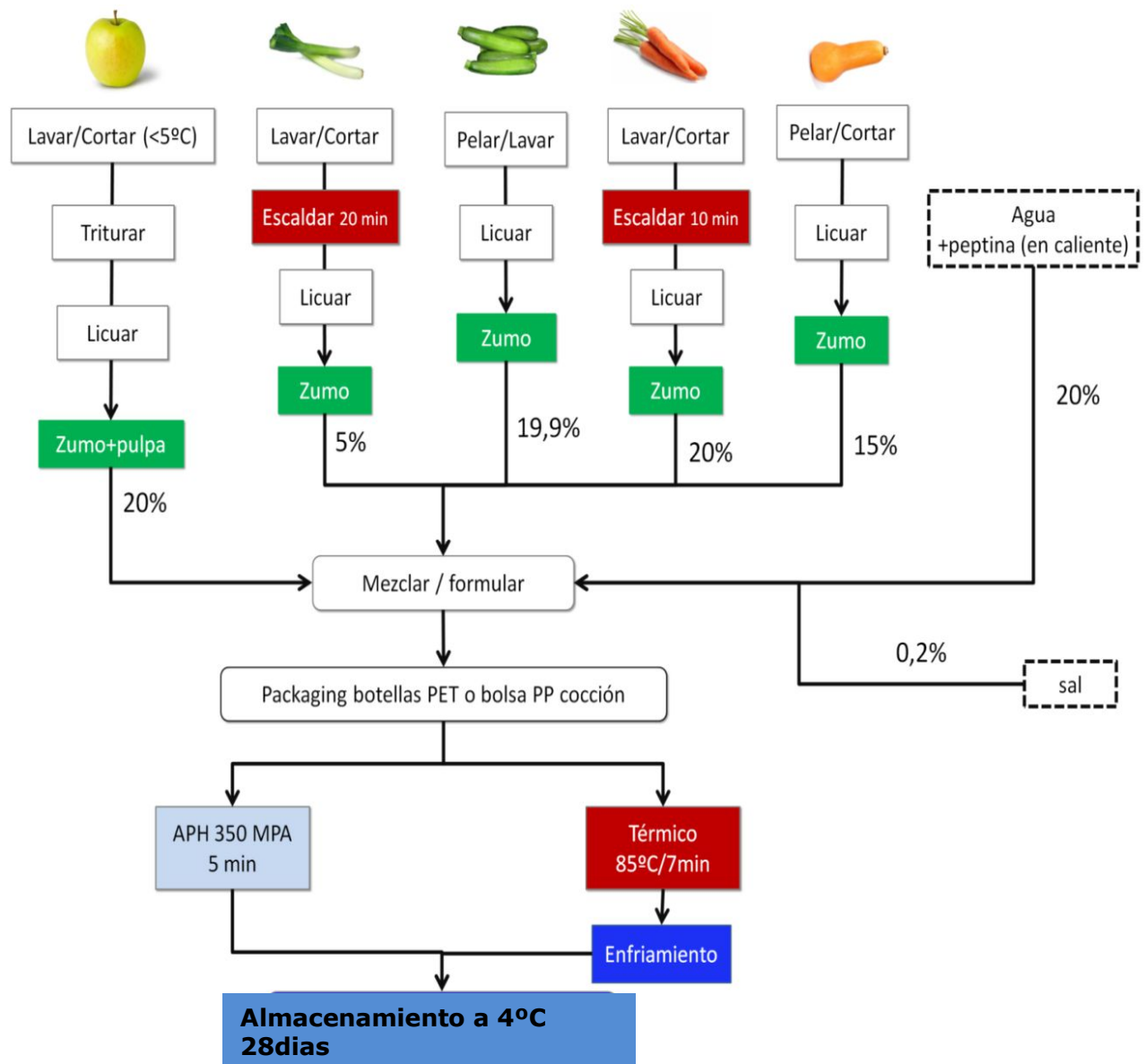
3.4.2. Elaboración de smoothie de frutos rojos.

Figura 11. Diagrama de flujos del proceso de elaboración de smoothie de frutos rojos (Ensayo III).



3.4.3. Elaboración del smoothie de verduras.

Figura 12. Diagrama de flujos del proceso de elaboración de smoothie de verduras (Ensayo IV).



Los smoothies se recibieron a las 48 h de su elaboración. Este tiempo antes de los análisis se aplicó para simular condiciones de venta. Fue estimado como el tiempo necesario desde la elaboración hasta la recepción en los puntos de venta. Una vez transcurrido ese periodo se realizaron pruebas en fresco, el resto se congeló en pequeñas cantidades a -80°C. Posteriormente, se realizaron el resto de análisis.

En el **ensayo I** se estudió el efecto, en un smoothie de frutas, de diferentes presiones (350 MPa/10 °C/5 min, 450 MPa/10 °C/5 min y 600 MPa/10 °C/3 min) y de la pasteurización (85 °C/7 min), comparado con un smoothie control. Los análisis se realizaron por triplicado para tres lotes de fabricación. Se seleccionó el tratamiento más adecuado para el estudio de la vida útil en frutas, frutos rojos y verduras (**ensayo II, III y IV**) y se procesó de igual manera. Se elaboraron smoothies presurizados a 350 MPa/10 °C/5 min y pasteurizados a 85 °C/7 min. Se realizaron tres botes de 250 ml por cada punto de control: día 0, 7, 14, 21 para frutas y también día 28 para frutos rojos y verduras. En los ensayos II, III y IV todos los análisis se realizaron por triplicado en dos lotes de fabricación, para cada punto de control y tipo de smoothie.

3.5. Plan de trabajo.

Tabla 7. Distribución del trabajo realizado en el tiempo.

Tiempo/ Actividad		Métodos	I ensayo	II ensayo	III ensayo	IV ensayo	Artículos
2012	1 ^{er} Semestre	X	X				
	2 ^o Semestre	X					
2013	1 ^{er} Semestre		X	X			
	2 ^o Semestre	X				X	
2014	1 ^{er} Semestre				X	X	
	2 ^o Semestre				X		X
2015							X

3.6. Determinaciones analíticas.

Análisis Físico-químico

Color L* a* b*

Chroma (C*)

Hue (H*)

pH

Acidez (g ac cítrico/100ml)

Sólidos Solubles (°Brix)

Sólidos Insolubles (g/100ml)

Densidad (g/ml)

Transmitancia (%)

Turbidez (NTU)

Viscosidad (cP)

Índice de Pardeamiento (Abs.)

Análisis Nutricional

Vitamina C (mg/100ml)

Ácido ascórbico (AA)

Dehidroascórbico (DHAA)

Azúcares (g/100ml)

Sacarosa

Glucosa

Fructosa

Fenoles (mg eq ác Gálico/100ml)

Flavonoides (mg eq Quercetina/100ml)

Actividad antioxidante

FRAP ($\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}$ /100ml)

DPPH (IC₅₀)

Análisis Enzimático

Pectin metil esterasa (u/g)

Polifenoloxidasa (% act. relativa)

Peroxidasa (% act. relativa)

Análisis Sensorial

Test Triangular

Análisis Descriptivo (Unidades arbitrarias)

Análisis Microbiológico

Bacterias mesófilas (log ufc g⁻¹)

Bacterias psicrófilas (log ufc g⁻¹)

Mohos y Levaduras (log ufc g⁻¹)

E.Coli y Coliformes (log ufc g⁻¹)

Salmonella spp. (Ausencia en 25 g)

L. monocytogenes (Ausencia en 25 g)

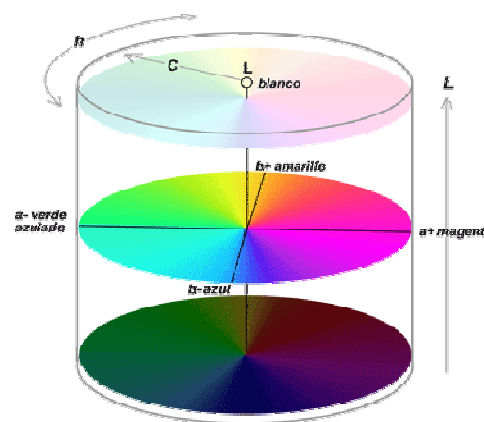
3.6.1. Análisis Físico-Químico.

3.6.1.1. Determinación del color.

El color se midió usando un colorímetro CR-200/08 Chroma Meter II (Minolta Ltd., Milton Keynes, United Kingdom) con adaptador para muestras líquidas. Las coordenadas medidas fueron CIE L* (0 negro a 100 blanco), a* (-a verde, +a rojo), b* (-b azul, +b amarillo). Chroma (C*) y Hue (H*) fueron calculados:

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

$$H^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$



3.6.1.2. Determinación del pH.

El pH del zumo se midió mediante un pHmetro Crison modelo GLP21 (Crison, Barcelona, Spain) previamente calibrado con solución tampón code 9463 pH 4.01 y code 9464 pH 7.00.

3.6.1.3. Determinación de la acidez.

Para la determinación de acidez total se diluyeron 5 ml de muestra con 10 ml de agua desionizada. El volumen final se valoró potenciométricamente (pHmetro modelo GLP21) con NaOH 0.1 M hasta alcanzar un pH de 8.1 (AOAC 924.15). El resultado se expresó como g ác. cítrico/ 100 ml, mediante la fórmula:

$$\text{g ác. cítrico} = \frac{\text{peso eq. ác. cítrico} \times N \text{ NaOH} \times \text{ml gastados}}{\text{ml muestra}} \times 100$$

3.6.1.4. Determinación de sólidos solubles.

Para la determinación de sólidos solubles totales se utilizó un refractómetro (Atago, EEUU) de rango 0-32 °Brix (g sacarosa/100 ml) (AOAC 932.14, 1990).

3.6.1.5. Determinación de sólidos insolubles.

Se pesó una cantidad en torno a 20 g de smoothie y se centrifugó a 15430 x g durante 10 minutos. Los sólidos insolubles totales (S.I.) se calcularon como la diferencia de peso entre la muestra agitada antes de centrifugar y el sobrenadante resultante de la muestra tras ser centrifugada.

$$\text{g S.I./100 ml zumo} = \frac{(\text{g muestra} - \text{g sobrenadante}) \times 100}{\text{g muestra}} \times \text{densidad}$$

3.6.1.6. Determinación de la densidad.

Se tomó una alícuota de zumo mediante un densímetro digital DMA 35N (Anton Paar, Graz, Austria). Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente (± 20 °C) (g/ml).

3.6.1.7. Determinación de viscosidad.

El smoothie se centrifugó a 15430 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue calentado hasta 40 °C en un baño termostático (Comfort Heto master shake). En un viscosímetro capilar Ostwald-Cannon-Fenske (Cannon-Fenske, Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España), de calibre 100 (para verduras) y 300 (para frutas), se

introdujeron 6 ml del smoothie. El tiempo transcurrido en recorrer la distancia entre los dos enrases se midió mediante un electronic timer clock y se calculó la viscosidad absoluta:

$$V_{abs} \text{ (cP)} = \text{Cte} \times \text{tiempo(s)} \times \text{densidad (g/ml)}$$

Cte: Constante de cada viscosímetro a determinada temperatura (40 °C o 100 °C).

Tiempo: duración de la medida en segundos.

3.6.1.8. Determinación de la turbidez.

La turbidez se midió con el turbidímetro 2100N (Hach, Loveland, USA). Los tubos específicos del turbidímetro se llenaron con el sobrenadante del zumo sin agitar. Los resultados fueron expresados como NTU (unidades nefelométricas). El turbidímetro fue previamente calibrado con sus patrones en un rango de 0-4000 NTU.

3.6.1.9. Determinación de la transmitancia.

El sobrenadante del zumo, el mismo utilizado en la medida de turbidez, se midió espectrofotométricamente (Unicam UV/Vis spectrometer ATI unicam). La medida de 100 % de transmitancia a 660 nm fue la correspondiente al agua desionizada.

3.6.1.10. Determinación del índice de pardeamiento.

Se realizó la medida del índice de pardeamiento según el método descrito por Ting y Rouseff (1986). A una cantidad de 3 ml de muestra centrifugada a 15430 x g durante 10 minutos se le añadieron 3 ml de

metanol y se mantuvo 15 min en hielo. Posteriormente se centrifugó en tubos Eppendorf y se midió la absorbancia a 420 nm (Unicam UV/Vis spectrometer ATI unicam). Se utilizó como blanco metanol.

3.6.2. Análisis nutricional.

3.6.2.1. Determinación de vitamina C.

La vitamina C se cuantificó como la suma de la medida del ácido ascórbico y su forma oxidada ácido dehidroascórbico según el método de Gil *et al.* (1998).

Para la extracción, se añadieron a 30 gramos de muestra 80 ml de MeOH/H₂O (5:95) con 0.5 g/L de ác.cítrico + 0.5 g/L de EDTA. La mezcla se centrifugó a 15430 x g durante 10 min. Se filtraron 2 ml del sobrenadante a través de un filtro Millipore de 0.45 µm.

Se analizó por cromatografía líquida con un sistema equipado por una bomba (Merck Hitachi L-6200 Intelligent Pump, Japón), un automuestreador 2050 plus (Jasco Inc., Easton, UK) y un detector UV-Vis (Merck Hitachi LaChrom L-7420, Japón). El ácido ascórbico se determinó a 260 nm. Para la cuantificación del ácido dehidroascórbico se incubaron 3 ml del sobrenadante centrifugado con 1 ml de OPDA (0.011M en extractante) durante 37 min en oscuridad y a 4 °C. Posteriormente, se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 µm. Se cuantificó con el mismo detector a 340 nm.

Las condiciones del HPLC fueron: columna Gemini C18 (300 x 4.6 mm, 5 μ m) conectado a un cartucho de fase reversa C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA), fase móvil metanol/agua (5:95) + 5 mM cetrimida + 50 mM KH_2PO_4 y velocidad del flujo de 0.9 ml/min. Se realizaron rectas de calibrado ($R^2=0.999$) con patrones de ácido ascórbico (0-50 ppm) y dehidroascórbico (0-100 ppm).

3.6.2.2. Determinación de azúcares.

Se diluyó 1 ml de muestra con 10 ml de agua y se filtró a través de un filtro Millipore de 0.45 μ m (Hellín *et al.*, 2001). El análisis se realizó por HPLC con un detector L-7490 LaChrome índice de refracción (Merck-Hitachi). La fase móvil fue agua ultrapura (Merck Millipore, USA). Se inyectaron 20 μ l en una columna CARBOsep CHO682Pb (Transgenomic, Elancourt, Francia) calentada a 80°C por un horno (column blockheater, Jones chromatography LTD). El análisis se calibró con diferentes concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa de 0 a 100 ppm.

3.6.2.3. Determinación del contenido fenólico total.

Se siguió el método descrito por Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. La reacción fue mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para la extracción se utilizó 2 g de muestra con 10 ml de 80 % etanol con 1 % de HCl. Se calentó 60 °C durante 60 minutos y posteriormente se centrifugó a 15430 x g durante 10 minutos. La formación de compuestos azules, debido a la reacción entre el extracto etanólico y el reactivo Folin-Ciocalteu, se midió a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg eq de ácido gálico en 100 ml de muestra.

3.6.2.4. Determinación de flavonoides.

Se realizó según Chang *et al.* (2002). Para la extracción se diluyó 1 ml de zumo en 10 ml de metanol. Posteriormente, después de centrifugar, se tomaron 0.5 ml del extracto y se mezclaron con 0.1 ml de AlCl_3 10 %, 0.1 ml de acetato potásico 1M y 2.8 ml de agua destilada. Se incubó en oscuridad durante 40 minutos. La absorbancia de los compuestos amarillos generados se midió a 415 nm utilizando metanol como blanco. El resultado se expresó como mg eq. de quercetina/100 ml de zumo. Para ello se realizó una recta de calibrado de 0-50 mg de quercetina 100ml^{-1} .

En el caso de los smoothies de frutos rojos, este análisis no se pudo realizar debido a la interferencia de los pigmentos en la lectura de la absorbancia.

3.6.3. Análisis de la capacidad antioxidante.

3.6.3.1. Determinación de la capacidad de reducción del ión férrico (FRAP).

Se siguió el método descrito por Benzie y Strain (1996), con algunas modificaciones. Reactivo FRAP: 80 ml de 300 mM Tampón fosfato pH 3.6, 8 ml de 10 mM TPTZ en 40 mM de HCl y 8 ml de 20 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La muestra se centrifugó en tubos Eppendorf a $15430 \times g$ durante 6 min. La reacción se llevó a cabo con 100 μl del sobrenadante de la muestra centrifugada, 300 μl de agua destilada y 3 ml del reactivo

de FRAP calentado a 37 °C. Siguiendo el mismo método se realizó una recta de calibrado con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en concentraciones de 100 a 1000 μM . La lectura se realizó a 593 nm. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol eq. Fe}^{2+} 100 \text{ ml}^{-1}$.

3.6.3.2. Determinación de la actividad de captación de radicales (DPPH).

Se siguió el método desarrollado por Brand-Williams *et al.* (1995). La muestra diluida, 5 g en 50 ml de etanol 80 %, se centrifugó a 15430 x g durante 10 minutos. Se hicieron diluciones del extracto en concentraciones de 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 y 0 (ml/ml), y se añadió a cada dilución 2 ml de DPPH (0.005 g /100 ml etanol). Se incubó 20 minutos en oscuridad y se midió espectrofotométricamente a 515 nm. La actividad antioxidante total fue expresada como el porcentaje de inhibición del radical DPPH y se determinó con la siguiente ecuación:

$$\%TAA = 1 - (\text{Abs}/\text{Abs control}) * 100$$

%TAA se representó gráficamente con la concentración de extracto. Resolviendo la ecuación de la recta, el resultado será el IC_{50} , la concentración de muestra necesaria para captar el 50% de radicales libres. Cuanto menor sea la cantidad de muestra necesaria, mayor será su poder antioxidante.

3.6.4. Análisis Enzimático.

3.6.4.1. Actividad pectin metil esterasa.

Para la determinación de la actividad pectin metil esterasa (nomenclatura enzimática: EC 3.1.1.11) se utilizó el método descrito por Ting y Rouseff (1986) y Li *et al.* (2015) con pequeñas modificaciones. Se utilizó 5 ml de smoothie agitado, previamente ajustado a pH 7.5 con NaOH 1 M. Se añadió 50 ml de pectina al 1 % en NaCl 0.2 M, previamente ajustada a pH 7.5 con NaOH 0.2 M. La muestra se valoró potenciométricamente (pHmetro modelo GLP21) durante 30 minutos a pH 7.5 con NaOH 0.05 M. Para el cálculo se utilizó la fórmula:

$$\text{PME u/g} = ((\text{ml NaOH} * \text{N NaOH}) / (\text{g muestra} * \text{minutos (30')}))$$

ml NaOH: ml gastados en la valoración de la muestra.

N NaOH: Normalidad de NaOH utilizado en la valoración

g muestra: ml de muestra x densidad.

3.6.4.2. Actividad polifenoloxidasas.

Para la determinación de actividad polifenoloxidasas (PPO) (nomenclatura enzimática: EC 1.14.18.1) se siguió el método descrito por Wang *et al.* (2014) con pequeñas modificaciones. Se mezcló 12.5 g de la muestra en 25 ml de tampón fosfato 0.2 M a pH 7.0, conteniendo 1 g/100 ml PVP y 0.5 g/100 ml TritonX-114. Se centrifugó a 15430 x g durante 10 minutos.

El sustrato se preparó con 4-t-butylcatechol 7.5 mM en agua desionizada y se mantuvo en refrigeración. Para la reacción se mezcló en

un tubo de ensayo, 0.2 ml de extracto, 1 ml de agua y 2 ml de sustrato 7.5 mM. Se agitó, se pasó rápidamente a una cubeta espectrofotométrica y se midió a 420 nm cada minuto, durante 30 min. El incremento de absorbancia se determinó mediante una recta. Los resultados se expresan como actividad relativa en función de la actividad del smoothie control (100 % actividad). Para el blanco se sustituyó, en la reacción, el extracto por agua.

3.6.4.3. Actividad peroxidasa.

Para la determinación de actividad peroxidasa (nomenclatura enzimática: EC 1.11.1.7) se utilizó el método descrito por Vervoort *et al.* (2011). Se mezcló en proporción 1:1 muestra:tampón fosfato 0.2 M pH 6.5. Se centrifugó a 15430 x g durante 10 min. Para la reacción se utilizaron 0.5 ml del extracto, 1.1 ml tampón, 1 ml OPDA (10 g/L) y 0.5 ml solución H₂O₂ (15 g/L tampón). La lectura espectrofotométrica a 485 nm se realizó después de incubar durante 20 minutos en oscuridad. Los datos se expresaron como en la medida del enzima PPO.

$$\% \text{actividad relativa} = \text{Abs muestra} * 100 / \text{Abs control}.$$

3.6.5. Análisis Microbiológico.

3.6.5.1. Bacterias mesófilas y psicrófilas.

El recuento de bacterias mesófilas y bacterias psicrófilas fue determinado con el medio PCA (plate count agar) después de incubar a 30 °C durante 72 horas y 4 °C durante 7 días, respectivamente (ISO 4833:2013 e ISO 17410:2001).

3.6.5.2. Mohos y levaduras.

El recuento de mohos y levaduras se realizó tras la siembra en placa en el medio YGC Agar (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) (Merck, Madrid, Spain). Se incubaron a 25 °C durante 5 días (ISO 21527:2008).

3.6.5.3. *E-Coli* y coliformes totales.

Se determinaron en un medio para *E.coli*/coliformes (ChromID Coli, Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Francia) tras la siembra en placa. Se incubaron durante 24-48 horas a 37 °C (ISO 7251:2005 e ISO 4831:2006).

3.6.5.4. Determinación de bacterias patógenas.

La presencia de bacterias patógenas se realizó según el método de Stollewerk (2012). *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* fue estudiada en 25 ml de muestra, la cual se diluyó 1/10 en Brain Heart Infusion (BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) y se incubó 48 h a 37 °C (ISO 21528:2004). Se utilizó un medio selectivo para *L.*

monocytogenes (Listeria Chromogenic Agar Base) (ISO 11290:1996) y se confirmó mediante la reacción en cadena de polimerasa (HLY gene). Para *Salmonella* spp., las muestras se incubaron en Rappaport Vasiliadis (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) a 41.5 °C durante 48 h, seguido de siembra en CHROMagar™ *Salmonella* plus (Sharlab Sentmenat, Barcelona, España) y confirmación mediante la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (HLY gene) (ISO 6579:2002).

3.6.6. Análisis sensorial.

3.6.6.1. Entrenamiento de los catadores.

Fueron seleccionados y entrenados seis panelistas (ISO 8586:2012). Los descriptores fueron definidos para cada tipo de smoothie (tabla 8, 9 y 10). Se usó una escala no estructurada, donde 0 significó ausencia del descriptor y 10 significó alta intensidad del descriptor.

3.6.6.2. Análisis descriptivo cuantitativo (QDA).

Se llevó a cabo siguiendo la norma ISO 4121:2003. La evaluación sensorial se realizó por duplicado para cada muestra en el tiempo, empleando una botella de 250 ml para cada sesión. Cada panelista determinó todos los atributos en cada sesión realizada por cada lote. Las muestras se codificaron con letras de manera aleatoria.

Tabla 8. Descriptores usados en el análisis sensorial del smoothie de frutas.

Atributos	Definición
Apariencia	
Color coral	Evaluación de la intensidad del color coral.
Color pardo	Evaluación del color pardo.
Olor	
Intensidad	Evaluación de la intensidad del olor general.
Olor a plátano	Evaluación de la intensidad del olor característico a plátano.
Olor a fresa	Evaluación de la intensidad del olor característico a fresa.
Olor a fruta cocida	Evaluación de la intensidad del olor característico a fruta cocida.
Flavor	
Intensidad	Evaluación de la intensidad del sabor en general.
Sabor dulce	Sensación de sabor básico provocado por azúcar.
Sabor ácido	Sensación de sabor básico provocado por ácido.
Sabor amargo	Sensación de sabor básico amargo.
Flavor a plátano	Intensidad del flavor característico a plátano.
Flavor a fresa	Intensidad del flavor característico a fresa.
Flavor a cocido	Intensidad del flavor característico a fruta cocinada.
Textura	
Viscosidad	Sensación en boca evaluada por el grado en que el zumo es grueso, cubre la boca y su dificultad para tragar.
Arenosidad	Sensación en boca relacionada con la percepción de partículas del tamaño de arena fina.
Calidad global	Puntuación de la calidad sensorial en referencia a la norma de calidad para este producto

Tabla 9. Descriptores usados en el análisis sensorial del smoothie de frutos rojos.

Atributos	Definición
Apariencia	
Color pardo	Evaluación de la intensidad del pardeamiento.
Turbidez	Evaluación de la pérdida de la nube turbia.
Olor	
Intensidad	Evaluación de la intensidad del olor en general.
Fruta fresca	Evaluación de la intensidad del olor característico a fruta fresca.
Fruta cocida (mermelada)	Evaluación de la intensidad del olor característico a fruta cocida.
Fresa/ frutos rojos	Evaluación de la intensidad del olor característico a fresa y otros frutos rojos
Plátano	Evaluación de la intensidad del olor característico a plátano.
Flavor	
Intensidad	Evaluación de la intensidad del flavor en general.
Fruta fresca	Sabor debido al azúcar y frescura de la fruta.
Fruta cocida (mermelada)	Intensidad del flavor característico de la fruta cocida.
Fresa/frutos rojos	Intensidad del flavor característico de la fresa.
Plátano	Intensidad del flavor característico del plátano.
Ácido	Sensación ácida provocada por los ácidos de la fruta.
Textura	
Viscosidad	Grado en que el zumo es grueso, cubre la boca y su dificultad para tragar.
Arenosidad	Sensación relacionada con la percepción de partículas del tamaño de arena fina.
Calidad global	Puntuación de la calidad sensorial de la muestra en referencia a los atributos de calidad para este producto.

Tabla 10. Descriptores usados en el análisis sensorial del smoothie de verduras.

Atributos	Definición
Apariencia	
Color naranja	Evaluación de la intensidad del color anaranjado.
Color pardo	Evaluación del color pardo.
Partículas	Evaluación de la pérdida de la nube turbia.
Olor	
Intensidad	Evaluación de la intensidad del olor general.
Calabaza	Evaluación de la intensidad del olor característico de calabaza
Melón verde	Evaluación de la intensidad del olor característico a cucurbitáceas.
Cocinado	Evaluación de la intensidad del olor característico a vegetales cocinados (zanahoria).
Flavor	
Intensidad	Evaluación de la intensidad general del flavor.
Dulce	Sensación de sabor provocado por el azúcar.
Amargo	Sensación de sabor provocado por moléculas básicas.
Zanahoria	Intensidad del flavor característico de vegetales (zanahoria).
Puerro	Intensidad del flavor característico del puerro.
Zumo de	Intensidad del sabor a zumo de manzana cocinada.
Retrogusto	Evaluación del mal gusto remanente en la boca después de tragar la bebida.
Textura	
Viscosidad	Sensación en la boca evaluada por el grado en que el jugo es grueso, recubre la boca y su dificultad para
Arenosidad	Sensación en la boca relacionada con la percepción de partículas del tamaño de arena fina.
Calidad global	Calidad sensorial de la muestra según la referencia para este producto.

3.6.7. Análisis estadístico.

Los datos fueron analizados usando Statistix 8 para Windows (Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA). El diseño del modelo fue completamente al azar y el tratamiento de conservación fue considerado una variable independiente. La réplica fue un efecto aleatorio. El efecto del tratamiento sobre las variables dependientes o el efecto del tiempo fueron determinados mediante un ANOVA de una vía. El test Tukey se utilizó para ver diferencias significativas, las cuales fueron consideradas estadísticamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Para el ensayo I el tamaño de muestra fue $n = 45$ (5 tratamientos x triplicado x 3 lotes). Para el ensayo II $n = 51$ (2 tratamientos x 4 días de muestreo x 2 lotes x triplicado + smoothie control en el día 0) y para el ensayo III y IV $n = 63$ (2 tratamientos x 5 días de muestreo x 2 lotes x triplicado + smoothie control en el día 0).

4. Resultados y Discusión.

4.1. Ensayo I: Aplicación de diferentes condiciones de presurización para obtener smoothies de fruta con características “fresh-like”.

El consumo de frutas y verduras es un factor clave para una dieta equilibrada. La Oficina de Prevención y Promoción de la Salud del Gobierno de los Estados Unidos (2015) recomienda el consumo de cinco porciones diarias de frutas y verduras. En Europa, el consumo de frutas y verduras varía entre países (Lobstein *et al.*, 2004), pero de acuerdo con los resultados de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (2008), el consumo medio de frutas y verduras (386 g por día) está por debajo de 400 g por día, según recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los smoothies son una forma cada vez más popular de consumir homogeneizados de frutas que contienen pulpa, y por lo tanto, pueden contribuir a una dieta más saludable.

Como se ha mencionado por varios autores (Keenan *et al.*, 2010; Knockaert *et al.*, 2011; Landl *et al.*, 2010; Vervoort *et al.*, 2012), HPP ha demostrado ser una alternativa al tratamiento térmico para el procesamiento de zumos de frutas y verduras, además es aceptado por la mayoría de los consumidores (Butz *et al.*, 2003). HPP tiene potencial para lograr la destrucción de los microorganismos vegetativos y la inactivación enzimática, sin promover mucho cambio en las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la calidad resultante de un smoothie multi frutas y comparar el efecto de tres tratamientos con presión (350 MPa/10 °C/5 min, 450 MPa/10 °C/5 min y 600 MPa/10 °C/3 min), un tratamiento térmico convencional (85 °C/7 min) y un control (sin tratamiento). Se llevaron a cabo diferentes análisis sensoriales, físicos, enzimáticos, nutricionales y microbiológicos. En base a los resultados obtenidos, uno de los tres tratamientos HPP será elegido para futuros estudios de vida útil dónde se controlará el deterioro de smoothies de frutas conservados en refrigeración.

4.1.1. Efecto de las condiciones de presurización sobre el flavor.

El objetivo de la utilización de HPP es la retención del sabor fresco en los smoothies, conocido este atributo como "fresh like". Una evaluación cualitativa preliminar mostró que a todas las muestras tratadas térmicamente se le atribuyeron sabores a fruta cocinada. Por otro lado, los presurizados a 600 MPa también desarrollaron un sabor desagradable, comúnmente asociado a HPP. Todos los evaluadores estuvieron de acuerdo en que las muestras tratadas térmicamente y los tratados a 600 MPa fueron claramente diferentes de los demás y fueron rechazados debido a alteraciones de sabor. Las muestras tratadas a 350 o 450 MPa se compararon con la muestra control utilizando diferentes pruebas triangulares. Los catadores seleccionaron correctamente la muestra extraña seis veces o menos, de entre las treinta y seis posibles identificaciones. Para que las diferencias sean estadísticamente

significativas entre las muestras ($P < 0,05$), se requirieron dieciocho identificaciones correctas, de un total de treinta y seis. La conclusión fue que el panel sensorial no discriminó entre los distintos tratamientos en los smoothies y que el sabor fresco de la fruta se mantuvo en los tratados a 350 o 450 MPa (**Tabla 11**).

Las principales diferencias en el sabor entre los smoothies HPP y los TP se basan en el desarrollo de un sabor a fruta cocinada, como resultado de la degradación térmica de los compuestos responsables del flavor en la fruta (Ludikhuyze *et al.*, 2003). El sabor de la fruta también puede ser alterado por HPP, dependiendo de la intensidad de los tratamientos aplicados, entre otros factores. La mayoría de los datos disponibles corresponden a productos de frutas individuales. Por ejemplo, la aplicación de 200-600 MPa a temperatura ambiente no alteró el sabor del puré de fresa (Lambert *et al.*, 1999), el zumo de mandarina (Takahashi *et al.*, 1993) o zumo de naranja-limón-zanahoria (Fernández-García *et al.*, 2001). Por el contrario, la aplicación de tratamientos HPP más intensos (500-800 MPa hasta 20 min) modificaron el sabor del puré de fresa (Lambert *et al.*, 1999) y el zumo de naranja (Fernández-García *et al.*, 2001). En otros estudios, el sabor del zumo de naranja tratado con HPP fue puntuado mejor que el zumo de naranja pasteurizado (Parish, 1998; Polydera *et al.*, 2003). Por el contrario, Keenan *et al.* (2012a) no encontraron diferencias claras en el sabor y en algunas sustancias volátiles, en smoothies TP ($70\text{ }^{\circ}\text{C} \geq 10\text{ min}$) y HPP (450 MPa/20 °C/ 5 min o 600 MPa/20 °C/10 min), elaborados con manzana, naranja, plátano y fresa. En este estudio, el uso de HPP condujo a una pérdida parcial de

sabor a fruta fresca tras 24 horas a 4 °C. La falta de correspondencia con nuestros resultados puede explicarse por diferencias en la composición del smoothie, incluyendo zumo de manzana previamente pasteurizado, aplicación de mayor temperatura y / o la prueba sensorial utilizada por Keenan *et al.* (2012a). Sin embargo, nuestros resultados confirmaron que HPP puede afectar al sabor del smoothie, aunque la aplicación de una presión igual o alrededor de 450 MPa a 10 °C puede prevenir el desarrollo de sabores desagradables.

Tabla 11. Porcentaje de respuestas correctas en el test triangular del flavor de los smoothies de fruta.

Tratamiento	Respuestas correctas	% acierto	P
HPP 350	2	6	N.S.
HPP 450	6	17	N.S.
HPP 600	36	100	***
T. Térmico	36	100	***

HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). N= 36. Niveles de significación: *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$, N.S. $P > 0.05$ (no significativo).

4.1.2. Efecto de las condiciones de presurización sobre la inactivación de enzimas oxidasas y pécticas.

La inactivación de enzimas oxidasas y pécticas, responsables de la oxidación y la clarificación de la nube turbia, es un objetivo importante en el procesamiento de los productos a base de fruta. Las diferencias entre los tratamientos fueron notables con respecto a las actividades de los enzimas en los smoothies. Como se muestra en la **Tabla 12**, los smoothies tratados con HPP mantuvieron la actividad PPO, POD y PME bastante similar a los zumos control, mientras que el tratamiento a 85 °C durante 7 min resultó altamente eficaz en la inactivación de estos tres enzimas. Ningún tratamiento HPP tuvo diferencias significativas en las actividades relativas de POD y PPO, mientras que la aplicación de 600 MPa redujo la actividad PME a la mitad. El tratamiento necesario para la inactivación de estas enzimas puede alterar las características sensoriales del smoothie.

La resistencia a la presión de PME se ha observado en otros estudios. Por ejemplo, Bayindirli *et al.* (2006) aplicaron 450 MPa/50 °C /30 min para inactivar la PME en zumo de naranja, aunque la calidad sensorial no se evaluó. Se observó inactivación PME en zumo de naranja tratado a 400 MPa/50 °C /12 min (Nienaber y Shellhammer, 2001a) y en plátano tratado a 600 MPa /10 °C /2 min (Ly-Nguyen *et al.*, 2002a), mientras que una ligera activación de PME fue encontrada por Cano *et al.* (1997) en zumo de naranja, el cual se trató a 200 y 400 MPa /20 °C /15 min. La actividad PME se relaciona principalmente con la estabilidad de la nube en los zumos de frutas. El enzima PME hidroliza ésteres metílicos de

ácido galacturónico, generando grupos carboxilo libres y metanol libre. El resultado es la formación de pectina de bajo metoxilo y ácido poligalacturónico, que puede reaccionar con los iones Ca^{+2} presentes en el medio, para formar pectato de calcio y otros compuestos insolubles en agua, cuya precipitación da lugar a una pérdida gradual de la turbidez del zumo (Sila *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2003). Esto puede afectar negativamente a la apariencia y, por tanto, los smoothies de frutas pueden necesitar agitación antes de su consumo. Por otra parte, se observó que los enzimas PPO y POD son más resistentes a la presión que el enzima PME. No hay consenso sobre el efecto de HPP en la inactivación de enzimas oxidasas en productos de frutas. Keenan *et al.* (2012b) observaron inactivación parcial de PPO en un smoothie multi-fruta presurizado a 450 y 600 MPa, mientras que Cano *et al.* (1997) observaron activaciones del enzima PPO en puré de fresa tratado a 300-400 MPa/20-60 °C. González-Cebrino *et al.*, (2012) informaron que HPP fue ineficaz para inactivar la PPO en puré de ciruela, el cual necesitó ingredientes antipardecimiento o un pretratamiento de escaldado. En zumo de fresa y naranja procesados por HPP (300-400 MPa/ 20 °C/15 min) se ha obtenido inactivación parcial de POD (Cano *et al.*, 1997), mientras que en un extracto enzimático de fresa (400 MPa/20 °C/ 5 min) se produjo activación del enzima POD (García-Palazón *et al.*, 2004). En nuestro estudio, PPO y POD permanecieron totalmente activas en los smoothies tratados con HPP, por lo que éstos estuvieron expuestos a las reacciones de oxidación catalizadas por estos enzimas. La fruta puede sufrir pardecimiento como resultado de la oxidación de polifenoles catalizada por PPO (García-Palazón *et al.*, 2004), mientras que POD oxida

diferentes sustratos a expensas del peróxido de hidrógeno y puede causar cambios en el color y sabor de las frutas (Zhang *et al.*, 2005).

Tabla 12. Actividad enzimática residual de los smoothies de fruta.

	Control	HPP350	HPP450	HPP600	Térmico
POD (%)	100.0±1.2 ^a	100.3±2.3 ^a	102.2±5.2 ^a	101.4±4.2 ^a	7.9±3.5 ^b
PPO (%)	100.1±5.4 ^a	100.3±8.7 ^a	90.6±7.4 ^a	91.3±11.2 ^a	11.0±12.1 ^b
PME (u g ⁻¹)	2.67±0.68 ^a	2.98±0.70 ^a	2.49±0.69 ^a	1.58±0.62 ^b	0.29±0.08 ^c

HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). Media ± Desviación Típica.

Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

4.1.3. Efecto de las condiciones de presurización sobre la clarificación y color.

La tendencia del smoothie hacia la clarificación y el pardeamiento se evaluó objetivamente mediante diferentes propiedades físicas. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**. En general, los smoothies tratados con HPP presentan características físicas similares a las presentadas por los smoothies control, con algunas excepciones. La densidad y el contenido en sólidos solubles fueron similares en todos los smoothies. Los valores de viscosidad y turbidez medidos en el sobrenadante fueron mayores en los tratados térmicamente, que en los smoothies tratados con HPP, lo que indicó que la tendencia a clarificar

podría ser mayor en los presurizados. Cuando se compararon las muestras HPP, se observó que los valores de viscosidad absolutos aumentaron a medida que se incrementó la presión; por el contrario, la turbidez del smoothie no se vio afectada por las diferentes presiones utilizadas. De acuerdo con los valores de transmitancia, ésta fue significativamente mayor en los smoothies tratados a 350 MPa, que en los tratados térmicamente, mientras que el resto de tratamientos obtuvo valores de transmitancia intermedios. El contenido en sólidos insolubles fue mayor en los smoothies presurizados y pasteurizados, que en los smoothies control, lo que sugiere una menor tendencia a la floculación en las muestras no tratadas.

HPP dio lugar a una consistencia y viscosidad absoluta más baja en zumos de naranja (Parish *et al.*, 1998; Polydera *et al.*, 2005a), aunque no se observaron diferencias claras en la transmitancia y la viscosidad absoluta en otros estudios (Bull *et al.*, 2004). La pérdida de viscosidad en los zumos turbios se puede atribuir a la degradación de la pectina a través de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos y, por consecuencia, precipitación de la pulpa (Sila *et al.*, 2009). Es conocido que la floculación de la pectina puede estar afectada por el pH en smoothies de frutas y zumos. Como se puede ver, la mezcla de fruta utilizada para elaborar los smoothies en nuestro estudio dio como resultado un producto ácido, en los cuales, los valores de acidez valorable total y pH no se vieron afectados por ningún tratamiento de conservación. HPP no dio lugar a cambios en el pH o acidez en zumo de naranja (Bull *et al.*, 2004) y zumo de arándano (Barba *et al.*, 2013). La acidificación se asocia, a menudo, al

crecimiento de bacterias ácido lácticas, aunque es difícil su desarrollo al comienzo del almacenamiento de un producto ácido pasteurizado. Nuestra evaluación física indicó que los smoothies tratados con HPP tienen una mayor tendencia a la clarificación, que los smoothies tratados con calor. Parish (1998) llegó a la misma conclusión al evaluar la estabilidad de la nube turbia en el zumo de naranja, tras aplicar presión a 500-700 MPa. En el estudio anterior, la pasteurización térmica también fue más eficaz que HPP, para la estabilización de la nube. Teniendo en cuenta la resistencia a la presión de los enzimas PME, el uso de HPP en smoothies debe combinarse con estrategias de estabilización complementarias. Por ejemplo, Sun-Waterhouse *et al.* (2013) propusieron el uso de carboximetilcelulosa, un agente estabilizador, para evitar problemas de clarificación en smoothies tratados por HPP. Además, el uso de variedades de frutas ricas en polisacáridos solubles en agua también puede ayudar a la estabilización de la nube, en el caso de smoothies de frutas.

Tabla 13. Características físicas relacionadas con la clarificación de los smoothies de fruta.

	Control	HPP350	HPP450	HPP600	Térmico
Densidad (g ml ⁻¹)	1.05±0.00	1.05±0.00	1.05±0.00	1.05±0.00	1.05±0.00
S. Soluble (°Brix)	13.1±1.0	12.9±1.1	13.0±1.0	13.0±1.0	12.9±1.0
Viscosidad (cP)	3.60±0.15 ^d	3.85±0.20 ^{cd}	4.03±0.23 ^c	4.46±0.50 ^b	4.88±0.16 ^a
Turbidez (NTU)	416±84 ^b	446±57 ^b	439±24 ^b	489±56 ^b	752±159 ^a
Transmitancia (%)	26.5±5.8 ^a	24.1±4.5 ^a	21.3±4.0 ^{ab}	20.2± 5.0 ^{ab}	15.9 ±5.4 ^b
S. I. (g 100 g ⁻¹)	18.4±1.3 ^b	22.1±2.5 ^a	22.6±1.1 ^a	23.9±1.1 ^a	21.2±2.6 ^a
pH	3.8±0.1	3.8±0.0	3.7±0.1	3.7±0.1	3.7±0.1
Acidez total (g 100ml ⁻¹)	0.46±0.04	0.47±0.03	0.45±0.03	0.46±0.02	0.46±0.03

HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). Media ± Desviación Típica.

Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

En cuanto al color, las coordenadas CIELab fueron similares en los smoothies control y los tratados con HPP (**Tabla 14**), por lo que el color naranja no fue alterado por la presión. Por el contrario, la aplicación del tratamiento térmico aumentó el valor L* y, en menor medida, el ángulo H*, lo que resultó en smoothies con un tono ligeramente diferente y más luminosos, aunque no afectó a los valores de a*, b* y C*. Por otra parte, el índice de pardeamiento (I.P.) no se vio afectado por el tratamiento térmico o HPP, lo que sugiere que las actividades oxidasas enzimáticas no afectaron al color en los smoothies presurizados. El pardeamiento no

enzimático después del tratamiento térmico puede ser debido a varias reacciones, incluyendo la reacción de Maillard, la caramelización y la destrucción de pigmentos, tales como carotenoides o antocianinas (Ibarz *et al.*, 2000). Keenan *et al.* (2011) encontraron resultados opuestos en un smoothie presurizado de manera similar (450 MPa/ 20 °C /5 min) y un pasteurizado. A diferencia de nuestro estudio, HPP condujo a mayores cambios de color, lo que resultó en una reducción de L*, mientras que para las muestras control y tratadas térmicamente los valores de L* fueron similares. Esta disparidad en los resultados se podría explicar por las diferentes materias primas y / o condiciones de procesamiento utilizadas por Keenan *et al.* (2011). En cualquier caso, el cambio de color inducido por el tratamiento podría ser menos relevante en homogeneizados de diferentes frutas, que en los smoothies elaborados con frutas individuales, ya que necesitan un color reconocible para satisfacer las expectativas de los consumidores.

Tabla 14. Parámetros de color de los smoothies de fruta.

	Control	HPP350	HPP450	HPP600	Térmico
Luminosidad L*	37.1±3.2 ^b	37.6±2.6 ^b	37.3±2.0 ^b	38.3±2.5 ^b	42.3±2.8 ^a
Rojo a*	9.7±2.1	10.7±1.6	10.7±1.4	10.6±1.7	9.1±1.9
Amarillo b*	11.9±3.1	12.3±2.6	12.0±1.5	12.7±2.0	13.3±1.4
Chroma C*	15.4±3.4	16.4±2.7	16.2±1.5	16.6±2.3	16.1±1.9
Hue H*	50.7±5.8 ^{ab}	49.0±5.0 ^b	48.3±4.8 ^b	50.1±4.5 ^{ab}	55.8±5.1 ^a
I.P. (nm)	0.12±0.02	0.11±0.03	0.12±0.03	0.12±0.03	0.10±0.02

HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). Media ± Desviación Típica.

Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

4.1.4. Efecto de las condiciones presurización sobre la capacidad antioxidante.

Las reacciones de oxidación enzimáticas y no enzimáticas pueden afectar negativamente a la calidad del smoothie. Los resultados de la capacidad antioxidante (**Tabla 15**) confirmaron que los smoothies tratados con HPP tuvieron una capacidad antioxidante menor (mayor IC₅₀ y FRAP inferior), que los smoothies tratados térmicamente a las 48 h post-procesamiento. Estas diferencias entre tratamientos pueden ser debidas a las actividades de los enzimas oxidasas. Una reducción similar en la capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) fue reportado por Keenan *et al.* (2010) en smoothies presurizados a 450 MPa/ 20 °C / 5 min en comparación con las muestras tratadas térmicamente, lo que indica que

la actividad enzimática no fue inactivada por los tratamientos HPP. Otros estudios en zumo de naranja no observaron cambios en la capacidad antioxidante, justo después de la presurización o del tratamiento térmico (Fernández-García *et al.*, 2001, Sánchez-Moreno *et al.*, 2005), incluso, Polydera *et al.* (2005a) encontraron una mayor estabilidad oxidativa en zumo de naranja tratado con HPP (600 MPa/40 °C /4 min), que en el pasteurizado (80 °C /1 min) durante el almacenamiento refrigerado. Nuestros resultados muestran que los smoothies tratados por HPP, con sus enzimas oxidasas activas, presentan una mayor tendencia a oxidarse, y por lo tanto, serían menos estables bajo refrigeración. Las reacciones de oxidación se ven particularmente favorecidas en los smoothies, en comparación con la fruta intacta, ya que al licuar y exprimir la fruta, se ponen en contacto enzima-sustrato, lo que puede ayudar a explicar la pérdida temprana de la capacidad antioxidante, observada en los smoothies tratados por HPP.

Tabla 15. Capacidad antioxidante de los smoothies de fruta.

	Control	HPP350	HPP450	HPP600	Térmico
FRAP	303.4±49.7 ^{ab}	259.4±39.0 ^b	263.8±36.8 ^b	264.7±43.0 ^b	349.1±31.1 ^a
DPPH	48.9±10.7 ^a	59.1±8.7 ^a	56.0±9.8 ^a	49.2±7.9 ^a	29.8±3.5 ^b

HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

Unidades: FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{+2}$ eq. 100 ml⁻¹), DPPH (IC₅₀).

4.1.5. Efecto de las condiciones de presurización sobre las características nutricionales.

La retención de los nutrientes principales, incluyendo vitaminas, antioxidantes y azúcares, es otro aspecto relevante del procesamiento de frutas. La degradación de la vitamina C es, a menudo, considerada un obstáculo para la calidad nutricional de los derivados de frutas. Como se muestra en la **Tabla 16**, el contenido en ácido ascórbico fue bajo en los smoothies, independientemente del tratamiento de conservación. El análisis mediante HPLC-UV indicó que la mayoría de la vitamina C presente en los smoothies corresponde a su forma oxidada, ácido dehidroascórbico. La conversión de ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico es catalizada por el enzima ascorbato oxidasa, aunque la oxidación directa también puede ocurrir (Greenway y Ongomo, 1990). El contenido total de vitamina C no fue afectado por ningún tratamiento HPP y tuvieron niveles similares a los del zumo control. HPP retuvo mejor la vitamina C que el tratamiento térmico, con los beneficios nutricionales que conlleva. La resistencia a la presión de la vitamina C también se ha observado en otros estudios. Keenan *et al.* (2012b) informaron que HPP permite la retención de vitamina C en smoothies. Del mismo modo, el uso de ultra HPP (1400 MPa/1 °C /4 min) no afectó el contenido de ácido ascórbico en un zumo de naranja-limón-zanahoria (Butz *et al.*, 2003). No hubo diferencias entre los tratamientos en cuanto a los fenoles totales y el contenido de flavonoides. Ambos grupos antioxidantes fueron estables tras la aplicación de HPP y tratamiento térmico. Keenan *et al.* (2011) encontraron resultados similares en smoothies a las 24 h post-

procesamiento. Los fenoles pueden actuar como antioxidantes y como sustratos en reacciones de pardeamiento durante la oxidación de fruta (Robards et al., 1999). En general, los antioxidantes fenólicos son considerados más resistentes que la vitamina C, en el procesado de frutas (Kalt, 2005). La vitamina C juega un papel importante en la inhibición de reacciones de oxidación en la fruta, degradándose rápidamente en condiciones pro-oxidantes. Nuestros resultados confirmaron que los smoothies pueden ser tratados por HPP sin el riesgo de degradación de fenoles, incluyendo flavonoides, ya que la oxidación inducida por el procesamiento y las actividades oxidasas no originaron ninguna reducción relevante del contenido de fenoles. En cualquier caso, el uso de HPP no proporcionó ninguna ventaja con respecto a la retención de fenoles y flavonoides, en comparación con el tratamiento térmico.

Tabla 16. Contenido de vitamina C y otros antioxidantes.

	Control	HPP350	HPP450	HPP600	Térmico
Ác. Ascórbico	5.1±4.2	4.7±3.7	4.7±3.7	4.6±3.7	3.5±2.8
Ác. Dehidroascórbico	37.0±7.0 ^a	34.1±7.9 ^a	32.9±5.7 ^a	33.7±3.7 ^a	22.9±4.6 ^b
Vitamin C (AA+DHAA)	42.1±3.5 ^a	37.7±5.3 ^a	37.6±4.6 ^a	38.4±4.2 ^a	26.4±6.0 ^b
Fenoles	37.1±8.4	34.7±4.7	37.6±4.0	35.9±6.4	39.7±3.1
Flavonoides	6.1±1.4	7.0±1.4	6.6±1.7	7.8±1.3	7.4±1.6

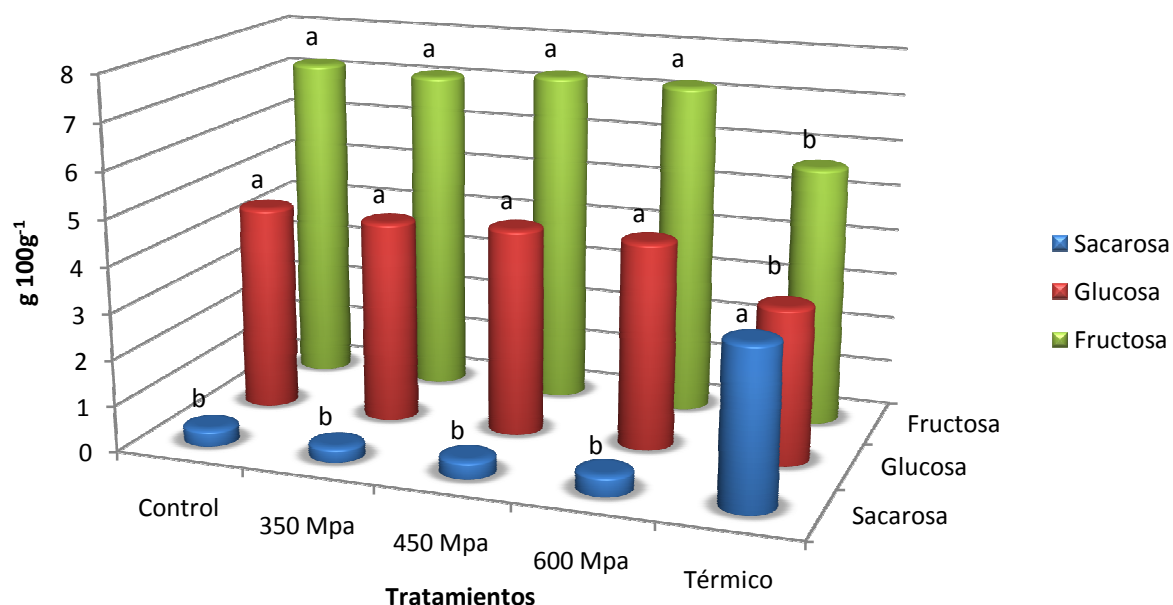
HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). Media ± Desviación Típica.

Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

AA y DHAA (mg 100ml⁻¹), Fenoles (mg GAE 100ml⁻¹), Flavon. (mg QE 100ml⁻¹).

Finalmente, el uso de HPP o pasteurización llevó a cambios en el contenido de azúcar (**Figura 13**). El aumento observado en el contenido de glucosa y fructosa indicó que la hidrólisis de sacarosa se llevó a cabo en las muestras tratadas por HPP, lo que sugiere que los enzimas β -fructosidasa siguieron un patrón similar en la inactivación, que enzimas oxidasas y pécticos. Se ha observado inversión de la sacarosa en otros productos de frutas tratados por HPP. Por ejemplo, la inactivación incompleta del enzima β -fructosidasa resultó en la desaparición total de la sacarosa durante el almacenamiento de puré de frambuesa presurizado (Butz *et al.*, 2003). Por otro lado, la inactivación térmica de β -fructosidasa también ha sido bien documentado en productos de frutas (Simpson *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran la hidrólisis de la sacarosa en los smoothies al poco tiempo de ser presurizados, modificando su perfil de azúcares al aumentar la glucosa y fructosa.

Figura 13. Contenido en sacarosa, glucosa y fructosa en los smoothies de frutas tras diferentes métodos de conservación.



Tratamientos: HPP (350 y 450 MPa a 10 °C durante 5 min; 600 MPa a 10 °C durante 3 min); térmico (85 °C durante 7 min). Media ± Desviación Típica. Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

4.1.6. Calidad microbiológica evaluada a los 30 días de almacenamiento.

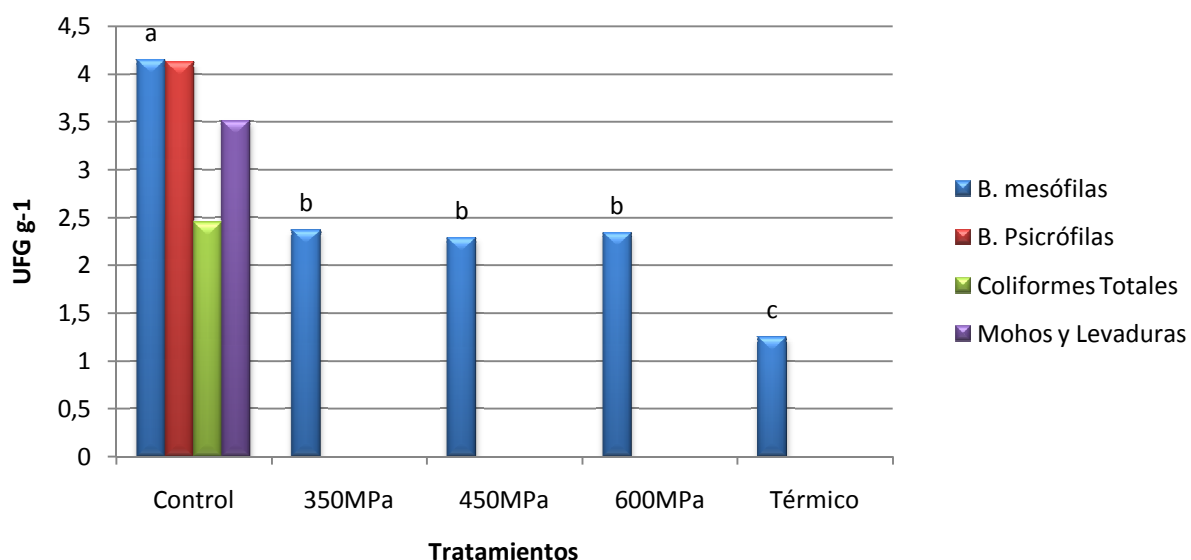
Antes de ser comercializados para su consumo, los smoothies deben cumplir con los estándares microbiológicos durante su vida útil. Por esta razón, la calidad microbiológica se comprobó después de 30 días de almacenamiento refrigerado a 4 °C (**Figura 14**). El deterioro y las bacterias patógenas se inhibieron, en general, en los smoothies de frutas. Los smoothies control tuvieron un recuento de bacterias aerobias mesófilas (TVC) de 4.2 log ufc g⁻¹, que se redujo a 2.3 y 1.3 log ufc g⁻¹ en

smoothies tratados por HPP y pasteurizados, respectivamente. Por lo tanto, la pasteurización a 85 °C durante 7 min fue ligeramente más eficaz que los tratamientos HPP en la inactivación microbiana. El reglamento de la Comisión Europea (EC) nº 2073 (2005) establece, para los smoothies, un máximo de recuentos mesófilos de 5 log ufc g⁻¹. Además, no se encontraron recuentos por encima del límite de detección para bacterias psicrófilas totales o coliformes totales, mientras que *E. coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* estuvieron ausentes en todas las muestras de smoothies, como exige la Comisión Europea (EC) nº 2073 (2005). Todos los tratamientos HPP también fueron eficaces contra mohos y levaduras, los principales microorganismos implicados en el deterioro de los zumos de frutas y purés (Parish y Higgins, 1989). Por lo tanto, los estándares microbiológicos pueden ser mantenidos en smoothies durante 30 días sin la pasteurización térmica, aunque los dos tratamientos, HPP y tratamiento térmico, reducen el riesgo por crecimiento de microorganismos.

La inactivación de microorganismos por HPP se ha demostrado en numerosos estudios sobre zumos de frutas y purés. En general, presiones entre 200 y 600 MPa, en un rango de temperatura leve, son eficaces en la inactivación de la mayoría de patógenos y de microorganismos vegetativos presentes en los zumos de frutas (Balasubramaniam y Farkas, 2008; Bayindirli *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2004; Parish, 1998; Vega-Gálvez *et al.*, 2014). En un estudio reciente, la presurización en frío a 300 MPa durante 5 min inactivó *Zygosaccharomyces bailii* y *L. monocytogenes* añadidas a un smoothie multi-fruta elaborado con bayas,

naranja, uva y manzana (Scolari *et al.*, 2015). Nuestros resultados confirmaron que es posible obtener smoothies microbiológicamente estables mediante la aplicación de 350 MPa a una temperatura fría. El uso de presiones más altas puede alterar el sabor. Además no tiene efectos antimicrobianos adicionales. No es necesario aplicar mayores presiones para mantener los estándares microbiológicos necesarios. Como se puede ver, la calidad microbiológica se puede asegurar sin gran dificultad a través de HPP en smoothies o zumos ácidos, donde los microorganismos tienen pocas posibilidades de proliferar.

Figura 14. Efecto del tratamiento de conservación en la carga microbiana.



Medias con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

4.2. Ensayo II: Vida comercial de los smoothies de fruta tratados por alta presión y por calor.

Recientemente, las industrias productoras de zumos están interesadas en HPP como tecnología de conservación no térmica, porque preserva la mayor parte de las moléculas saludables relacionadas con un zumo fresco. En realidad, HPP afecta algunas propiedades nutritivas, pero estos cambios no son totalmente predecibles especialmente en un smoothie multi-fruta. Uno de los principales problemas en la fabricación de productos listos para el consumo, como estos a base de frutas y hortalizas frescas, es su corta vida útil. Por lo tanto, la extensión de la vida útil de los alimentos utilizando tecnologías poco agresivas de procesado que afecten mínimamente a las propiedades sensoriales y nutricionales de estos productos es un reto para la industria alimentaria.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del procesado por alta presión y pasteurización, con el fin de obtener un producto con características similares al alimento fresco. Se analizaron parámetros físico-químicos, microbiológicos, enzimáticos, nutricionales y sensoriales de un smoothie multi fruta, durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 4°C.

4.2.1. Calidad microbiológica.

Los recuentos iniciales de microorganismos fueron bajos (**Tabla 17**), siendo $4.4 \log \text{ ufc g}^{-1}$, $2.5 \log \text{ ufc g}^{-1}$, $3.4 \log \text{ ufc g}^{-1}$ y $2.3 \log \text{ ufc g}^{-1}$ para aerobios mesófilos (TVC), bacterias psicrófilas (PSY), mohos y levaduras, y coliformes totales, respectivamente. Los tratamientos de conservación tienen un impacto en los recuentos de aerobios mesófilos con una reducción de $1.4 \log \text{ ufc g}^{-1}$ para las muestras HPP y $2.6 \log \text{ ufc g}^{-1}$ para las muestras TP. El tratamiento por calor ($85^\circ\text{C}/7 \text{ min}$) tuvo mayor impacto que el tratamiento HPP ($350 \text{ MPa} / 5 \text{ min}$). Ambos procesos consiguieron una alta reducción microbiológica, con recuentos, después del procesado, por debajo del límite de detección para bacterias psicrófilas y coliformes, y muy cerca del límite de detección ($0.1 \log \text{ ufc g}^{-1}$) para mohos y levaduras. Durante el almacenamiento a 4°C , los recuentos microbiológicos para todos los tratamientos se mantuvieron constantes y no se observaron crecimientos.

La eficacia de los tratamientos HPP está bien documentada y nuestros resultados HPP estuvieron de acuerdo con la bibliografía para productos similares. Landl *et al.* (2010) no observaron crecimiento microbiológico en un puré de manzana, con un pH de 3.2, durante 21 días de almacenamiento a 5°C , tras aplicar HPP (400 MPa durante 5 min). Del mismo modo, Varela-Santos *et al.* (2012) evaluaron el impacto del tratamiento HPP 350-550 MPa, durante diferentes tiempos de procesado, en la calidad microbiológica del zumo de granada (pH 3.0). Sus resultados indicaron que tras aplicar una presurización media (350 MPa durante 150 s), el nivel de bacterias aerobias mesófilas y el de

mohos y levaduras estuvo por debajo del límite de detección. La supervivencia de los microorganismos naturales del zumo de manzana tratado por HPP, fue investigado por Lavinias *et al.* (2008). Estos autores encontraron que después de un tratamiento de HPP a 350 MPa durante 7 min, las bacterias mesófilas aerobias disminuyeron de un rango de 4.6-5.9 log ufc g⁻¹ a niveles indetectables. No observaron crecimiento después de un periodo de almacenamiento de 8 semanas a 4 °C. Recientemente, Juárez-Enríquez *et al.* (2015) indicaron que después de un tratamiento de HPP a 430 MPa, el zumo de manzana clarificado (pH 3.4) fue estéril y no se observó crecimiento microbiológico durante un tiempo de almacenamiento de 34 días.

Tabla 17. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad microbiológica (log ufc g⁻¹) de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4 °C.

	Vida útil	B. Mesófilas	B. Psicrófilas	Mohos y Levaduras	Coliformes
Control	0	4.4±0.2 ^x	2.5±0.4 ^x	3.4±0.3 ^x	2.3±0.5 ^x
HPP	0	3.0±1.1 ^y	< L.D	0.1±0.2 ^y	< L.D
TP	0	1.8±0.7 ^z	< L.D	0.1±0.2 ^y	< L.D
HPP	7	2.9±1.2	0.8±0.9	0.1±0.2	< L.D
TP	7	1.9±0.6	0.3±0.5	< L.D	< L.D
HPP	14	2.9±1.3	1.1±0.7	0.6±0.7	< L.D
TP	14	2.3±0.1	0.3±0.7	0.6±0.7	< L.D
HPP	21	3.0±1.4	< L.D	0.3±0.5	< L.D
TP	21	1.8±0.7	< L.D	0.3±0.7	< L.D

HPP (350 /10 °C /5 min); TP (85 °C /7 min). Media ± Desviación Típica. Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$. LD < 0.1 log ufc g⁻¹.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.2.2. Actividad enzimática residual.

Los efectos de los tratamientos de conservación y el tiempo de almacenamiento sobre las actividades enzimáticas de los smoothies de frutas se muestran en la **Tabla 18**. En general, el tratamiento HPP a 350 MPa resultó menos eficaz que el tratamiento TP en la inactivación de enzimas. En los smoothies presurizados, PPO permaneció totalmente

activa, como en las muestras no tratadas, durante todo el tiempo de almacenamiento. Por el contrario, el tratamiento TP prácticamente inactiva el enzima y no se producen cambios durante el almacenamiento. En el día 0, el enzima POD fue parcialmente inactivado por el tratamiento TP, mientras que el tratamiento HPP no tuvo ningún efecto sobre el enzima. Durante el almacenamiento, la actividad POD en los smoothies TP se mantuvo en el 20%, mientras que en los smoothies HPP disminuyó ligeramente al 80% la actividad residual en el día 21. La actividad PME de los smoothies HPP fue similar a la de los smoothies control, alrededor de seis veces mayor que en los smoothies pasteurizados. La actividad PME no se vio afectada por el tiempo de almacenamiento. Los tres enzimas, PME, PPO y POD, a menudo se inactivan con el tratamiento TP, pero son altamente resistentes a las altas presiones en los productos derivados de frutas (Terefe *et al.*, 2014), aunque se han realizado pocos estudios de vida útil en smoothies elaborados con diferentes frutas. Keenan *et al.* (2012b) no encontraron una evolución clara de la actividad PPO en smoothies de frutas mantenidos en refrigeración durante 10 horas. En nuestro caso, la actividad enzimática podría conducir a una pérdida de calidad en los smoothies tratados por alta presión.

Tabla 18. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la actividad enzimática relativa de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4 °C.

	Vida útil	PPO (%)	POD (%)	PME (u PME g ⁻¹)
Control	0	100±3 ^x	100±2 ^x	2.2±0.3 ^x
HPP	0	101±13 ^x	91±5 ^x	2.3±0.3 ^x
TP	0	5±6 ^y	23±20 ^y	0.4±0.3 ^y
HPP	7	98±7 ^x	93 ±5 ^x	2.3±0.3 ^x
TP	7	2±3 ^y	20±16 ^y	0.4±0.3 ^y
HPP	14	103±21 ^x	87±16 ^x	2.4±0.3 ^x
TP	14	1±2 ^y	17±11 ^y	0.4±0.2 ^y
HPP	21	96±9 ^x	78±7 ^x	2.4±0.5 ^x
TP	21	0±0 ^y	18±14 ^y	0.5±0.3 ^y

HPP (350 / 10 °C / 5 min), TP (85 °C / 7 min). Media ± Desviación Típica.

Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.2.3. Características físico químicas.

El efecto de HPP y TP en diferentes parámetros físico-químicos durante 21 días de almacenamiento se presenta en la **Tabla 19**. En los smoothies de diferentes frutas no hubo cambios en el contenido total de sólidos solubles, pH, acidez total y el total de sólidos insolubles. Los

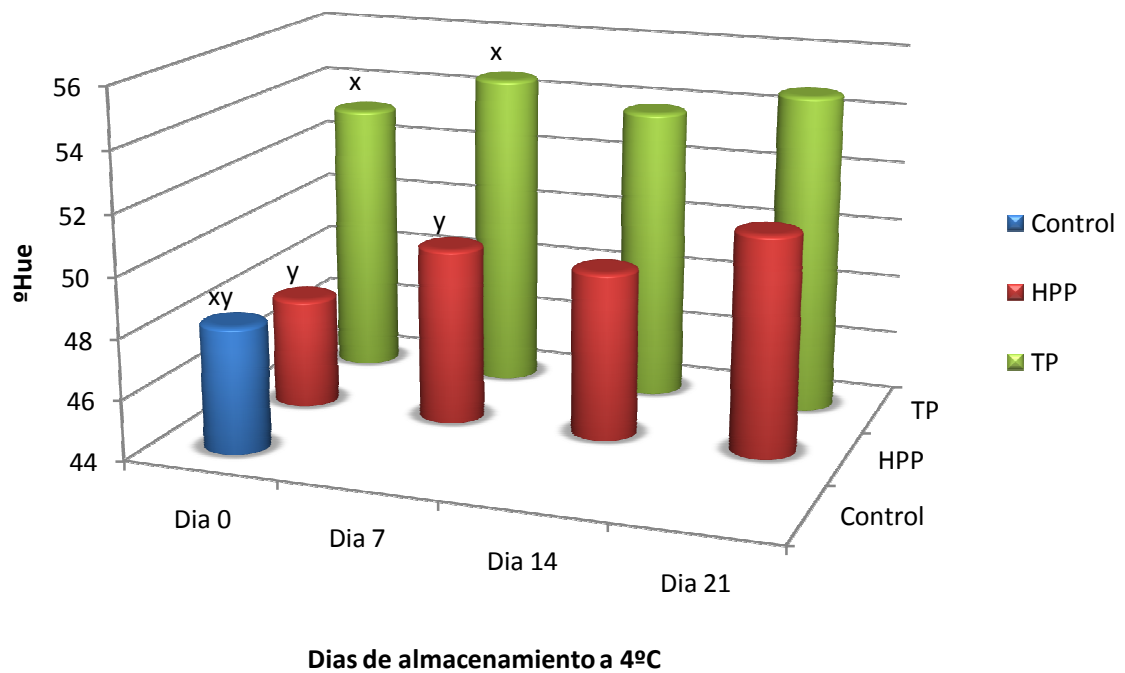
tratamientos de conservación no tienen efecto sobre dichos parámetros y no se observaron cambios durante los 21 días de almacenamiento. Resultados similares fueron obtenidos por Landl *et al.* (2010) para la acidez total de un puré de manzana presurizado a 400 MPa.

La transmitancia del smoothie no se vió afectada por los tratamientos HPP y TP pero, durante el almacenamiento, las muestras HPP presentaron un aumento significativo de la transmitancia, del 5 % en el día 7 al 16 % en el día 21, lo que muestra un proceso gradual de clarificación. Por el contrario, la transmitancia del smoothie TP permanece casi sin cambios. Para la viscosidad absoluta, en el día 0, las muestras TP presentaron un valor ligeramente superior (5.1 cP) respecto a los smoothies HPP (3.9 cP) y control (3.9 cP). Durante el almacenamiento, la viscosidad de los smoothies TP permaneció estable con un valor de 4.8 cP. Para los smoothies HPP, la viscosidad disminuyó de 3.9 en el día 0 a 3.0 cP a día 21 y fue, en todos los puntos de control, inferior a la viscosidad de los smoothies pasteurizados.

Se encontraron pequeñas diferencias en el color de los smoothies entre los tratamientos. Los valores de L^* en el día 0 fueron significativamente diferentes para HPP (37.0) y TP (41.5). Para valores de a^* , se observaron diferencias entre los tratamientos en los días 7, 14 y 21. También, la coordenada a^* (de rojo a verde) tiende a disminuir durante el almacenamiento para las muestras TP y permanece estable para las muestras HPP. El ángulo hue (**Figura 15**) presenta un pequeño aumento para las muestras TP, que se puede asociar con tonalidades de color marrón. El índice de pardeamiento (I.P.) fue similar para las

muestras tratadas y sin tratar en el día 0 y en el día 7. Para el día 14 y 21 aparecen algunas diferencias, una pequeña reducción en smoothies HPP y un aumento del I.P. en los TP, lo que indicó una diferencia ($P < 0.05$) entre tratamientos. En general nuestros cambios de color están de acuerdo con otros estudios. En un smoothie de diferentes frutas, Keenan *et al.* (2010) mostraron diferencias en los parámetros de color (L^* y a^*) de muestras no tratadas y muestras HPP (450 MPa/5 min), mientras que el color de las muestras tratadas térmicamente no se vio afectado durante el almacenamiento. Recientemente, Yu *et al.* (2013) observaron cambios más drásticos, entre el control y el zumo de fresa de una variedad china (bayberry) tratado a 400 MPa durante 5 min, donde los valores de a^* disminuyeron en el día 0, seguido de un aumento durante la primera semana. Sadilova *et al.* (2009), concluyeron que el tratamiento térmico favorece la formación de productos de degradación. Esto podría explicar la pérdida de color. En vista de los resultados, los fenómenos de oxidación y clarificación podrían contribuir a un mayor deterioro de los smoothies presurizados, limitando su vida útil, en comparación con los productos equivalentes pasteurizados por calentamiento suave (Oey *et al.*, 2008).

Figura 15. Evolución del color de los smoothies de frutas tratados por HPP y TP, a lo largo del almacenamiento, mediante la medida de la coordenada Hue.



^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

Tabla 19. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características físico-químicas de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4 °C.

Vida útil		pH	Acidez	S.solubles	S.Insol.	Transmitancia	Viscosidad	L*	a*	b*	I.P.
			(g A.C. 100ml ⁻¹)	(°Brix)	(g 100g ⁻¹)	(%)	(cP)	(CIE units)	(CIE units)	(CIE units)	(Abs.420nm)
Control	0	3.6±0.2	5.6±1.1	12.7±0.4	16±4	0.3±0.0	3.9±1.4 ^y	38.3±2.4 ^{xy}	11.4±0.5	12.9±1.8	0.10±0.02
HPP	0	3.6±0.2	5.6±1.0	12.8±0.6	16±4	0.3±0.0 ^b	3.9±1.5 ^{a y}	37.0±2.6 ^y	10.7±0.7	11.8±1.6	0.10±0.03
TP	0	3.6±0.2	5.4±1.2	12.6±0.5	16±2	0.3±0.0	5.1±0.6 ^x	41.5±2.3 ^x	10.5±1.1 ^a	14.1±2.5	0.09±0.02
HPP	7	3.6±0.1	5.7±1.2	12.8±0.3	16±4 ^y	4.8±4.1 ^{ab x}	3.2±1.6 ^{b y}	39.0±2.4	11.0±0.3 ^x	13.1±1.6	0.10±0.03
TP	7	3.6±0.1	5.6±1.3	12.7±0.3	18±2 ^x	0.4±0.1 ^y	4.8±0.9 ^x	42.0±2.0	10.0±0.9 ^{ab y}	14.1±1.4	0.09±0.02
HPP	14	3.6±0.0 ^y	5.7±0.6	12.6±0.3	15±4	8.7±7.1 ^{ab x}	3.3±1.8 ^{b y}	39.9±3.1	11.1±0.3 ^x	13.1±1.8	0.08±0.01 ^y
TP	14	3.7±0.0 ^x	5.6±1.0	12.7±0.1	17±3	1.4±1.2 ^y	4.8±0.9 ^x	42.4±2.7	10.0±0.5 ^{ab y}	13.8±1.8	0.10±0.02 ^x
HPP	21	3.6±0.1	6.0±0.9	12.5±0.2	15±5	16.3±14.1 ^{b x}	3.0±1.7 ^{b y}	40.4±3.4	10.5±0.7 ^x	13.2±1.4	0.09±0.00 ^y
TP	21	3.7±0.1	5.4±0.9	12.4±0.3	18±3	1.3±2.0 ^y	4.8±0.9 ^x	42.6±2.6	9.0±0.6 ^{b y}	12.8±1.2	0.11±0.01 ^x

HPP (350 / 10 °C / 5 min), TP (85 °C / 7 min). Media ± Desviación Típica. Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$. ^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.2.4. Capacidad antioxidante.

Los smoothies presurizados tuvieron mayores valores de DPPH y menores valores de FRAP, que los smoothies TP, en cualquier día de control. Los resultados estuvieron de acuerdo con un estudio de vida útil similar (Keenan *et al.*, 2010), donde los smoothies presurizados también mostraron una mayor reducción de la capacidad antioxidante, lo que sugiere que los enzimas oxidativos pueden contribuir a la reducción de la capacidad antioxidante, mientras que la inactivación térmica de estos enzimas ayudaría a estabilizar el estado antioxidante de los smoothies de frutas. Los resultados para el análisis del status antioxidante fueron coherentes con las actividades enzimáticas.

Tabla 20. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la capacidad antioxidante de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C.

	Vida útil	DPPH (IC ₅₀)	FRAP (μmolFe^{2+} 100mL ⁻¹)
Control	0	33±8	359±135
HPP	0	35±5	341±93
TP	0	30±4	424±95
HPP	7	38±2 ^x	360±73
TP	7	33±3 ^y	400±45
HPP	14	42±12	344±57
TP	14	35±7	387±73
HPP	21	41±3 ^x	328±16 ^y
TP	21	35±5 ^y	355±15 ^x

HPP (350 / 10 °C / 5 min), TP (85 °C / 7 min). Media ± Desviación Típica.

Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.2.5. Contenido nutricional.

El efecto de los tratamientos de conservación y el tiempo de almacenamiento en la calidad nutricional se muestran en la **Tabla 21**. La mayor parte de la vitamina C presente en los smoothies de frutas correspondió a ácido dehidroascórbico (DHAA). El procesado de frutas favorece la oxidación del ácido ascórbico a DHAA catalizado por la enzima ascorbato oxidasa, aunque también puede ocurrir mediante oxidación directa (Greenway y Ongomo, 1990).

En el día 0, los smoothies TP presentaron valores más bajos para AA, DHAA y vitamina C que HPP y smoothies control, aunque la diferencia no fue significativa ($P > 0,05$). Durante el almacenamiento pudo observarse una disminución progresiva en todas las muestras. El ácido ascórbico se redujo un 70 % en los smoothies HPP y TP a lo largo de los 21 días. Para DHAA, se observó una reducción del 64 % y del 60 % en los smoothies HPP y TP, respectivamente. También se observó una tendencia similar para la vitamina C, con una reducción del 65 % en las muestras HPP y del 61 % en las muestras TP.

Hubo un hecho contradictorio, la aplicación de alta presión no afectó a la vitamina C, pero sufrió un deterioro algo mayor durante el almacenamiento. La mayor pérdida de vitamina C se produjo en los smoothies presurizados y fue coherente con los resultados obtenidos para la actividad enzimática y la capacidad antioxidante, aunque la vitamina C también se degrada por vías no enzimáticas, en particular, en los derivados de frutas pasteurizados (Perera, 2007). Keenan *et al.* (2012b) obtuvieron resultados similares en cuanto al ácido ascórbico en smoothies de frutas almacenados a 4 °C, durante un máximo de 10 h. Landl *et al.* (2010) obtuvieron también una fuerte reducción de AA, DHAA y vitamina C en puré de manzana tratados por TP y HPP a 400 MPa durante 5 min.

Por el contrario, el contenido total de fenoles y flavonoides fue similar en ambos tipos de smoothies en el día 0. Los valores de flavonoides se mantuvieron estables, para ambos tratamientos, durante 21 días de almacenamiento. Lo mismo sucedió con el contenido total de

fenoles de las muestras TP, mientras que las muestras HPP presentan una reducción significativa (26 %) durante el almacenamiento. Este fenómeno también fue observado por Keenan *et al.* (2010), quienes encontraron una degradación parcial del contenido fenólico en ambos smoothies de frutas, HPP y TP, mantenidos durante 30 días en refrigeración.

Los compuestos fenólicos son responsables, en parte, de la capacidad antioxidante de las frutas, siendo más resistentes que la vitamina C al procesado de éstas (Kalt, 2005). La vitamina C se oxida en primer lugar, protegiendo a los fenoles frente a la oxidación. Cuando la vitamina C se ha degradado, se produce la oxidación de los compuestos fenólicos.

Tabla 21. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad nutricional de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C.

	Vida útil	AA (mg 100mL ⁻¹)	DHAA (mg 100mL ⁻¹)	Vitamina C (mg 100mL ⁻¹)	Fenoles (mgGAE 100mL ⁻¹)	Flavonoides (mgQE 100mL ⁻¹)
Control	0	3.9±0.7	30.1±9.1	34.0±9.7	44±10	10.1±0.7
HPP	0	5.7±1.9 ^a	31.4±11.3 ^a	37.1±13.1 ^a	49±10 ^a	9.6±0.7
TP	0	4.3±2.1 ^a	21.5±3.8 ^a	25.9±5.7 ^a	46±13	9.9±0.5
HPP	7	3.9±2.0 ^{ab}	19.5±6.4 ^b	23.3±7.6 ^b	43±5 ^{ab}	10.0±0.6
TP	7	4.0±0.3 ^a	22.0±8.6 ^a	26.0±8.7 ^a	45±6	10.2±1.6
HPP	1	1.5±2.3 ^b	15.4±5.0 ^{b x}	16.9±4.2 ^{b x}	42±5 ^{ab}	10.8±2.2
TP	1	0.3±0.3 ^b	9.8±1.7 ^{b y}	10.1±1.7 ^{b y}	43±4	10.8±3.6
HPP	2	1.7±2.7 ^b	11.3±0.7 ^b	13.1±3.0 ^b	36±3 ^b	8.8±0.8
TP	2	1.4±1.6 ^b	8.8±3.5 ^b	10.4±2.3 ^b	40±5	9.8±1.9

HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Media ± Desviación Típica.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05;

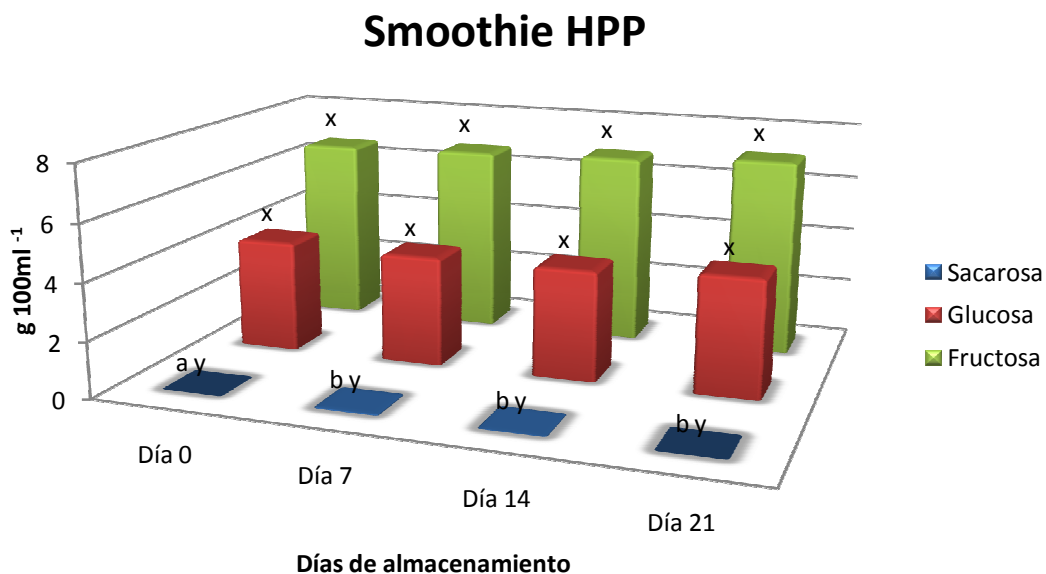
^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

El efecto de los tratamientos de conservación y el almacenamiento sobre el contenido en azúcar (sacarosa, glucosa y fructosa) se presenta en la **Figura 16**. En el día 0, HPP y las muestras control presentan contenidos similares de sacarosa, glucosa y fructosa. Durante el almacenamiento, entre el día 0 y el día 7, el contenido de sacarosa cae drásticamente, de 1.0 g ml⁻¹ a una cantidad por debajo del límite de detección. La glucosa y la fructosa, en los smoothies HPP, permanecen estables en el tiempo. Por el contrario, las muestras TP presentan un

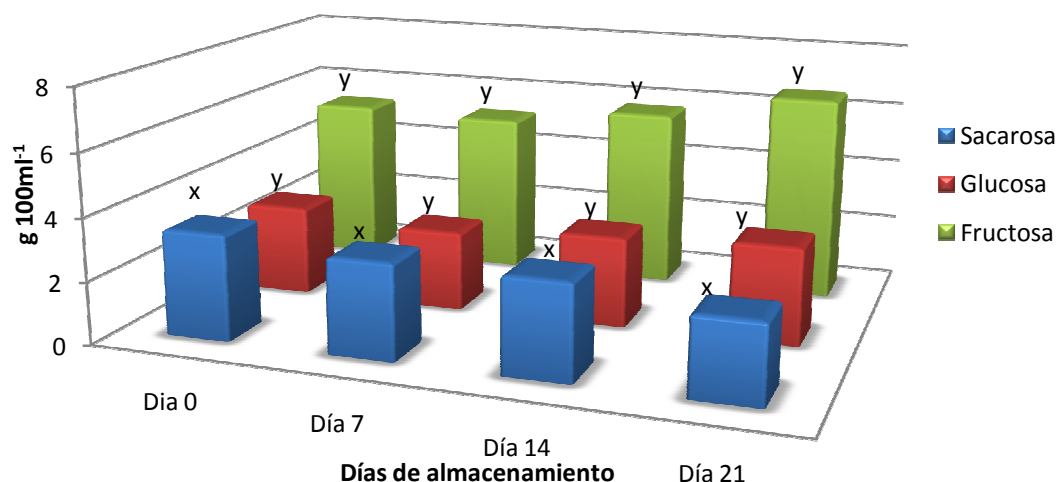
patrón diferente. En el día 0, el contenido de sacarosa es 3 veces mayor, mientras que el contenido de glucosa y fructosa es más bajo, en comparación con los valores obtenidos para los HPP.

En las muestra HPP, la inversión de la sacarosa fue relevante en el día 7. Por el contrario, los niveles de sacarosa se mantuvieron constantes en los smoothies TP durante el almacenamiento, lo que indica que el enzima β -fructosidasa fue inactivado a 80 °C durante 7 min, sugiriendo que la hidrólisis total de la sacarosa tuvo lugar en los smoothies HPP durante el almacenamiento. Butz *et al.* (2003) encontraron resultados similares en zumos de naranja, limón y zanahoria, pasteurizados y presurizados.

Figura 16. Efecto del tratamiento de conservación sobre contenido de azúcar (sacarosa, glucosa y fructosa) de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4°C.



Smoothie TP



Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$ (Tukey Test).

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$;

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.2.6. Atributos sensoriales.

Los resultados del análisis sensorial cuantitativo descriptivo (QDA) relativos a los atributos de olor y flavor, atributos de apariencia, textura y calidad global, para los smoothies HPP y TP, se muestran en la **Tabla 22**

El olor de los smoothies fue descrito utilizando cuatro atributos: intensidad global, plátano, fresa y la intensidad del olor a fruta cocinada. Los resultados de estos atributos dividen las muestras en dos grupos: el grupo control y HPP y, por otro lado, el grupo TP. Los smoothies control y HPP se caracterizaron por una mayor intensidad de olor a plátano y fresa y menor intensidad del olor a fruta cocinada. Estos resultados fueron coherentes con los obtenidos por Fernández-García *et al.* (2001), en el

zumos de naranja-limón-zanahoria, donde no se encontraron diferencias en el aroma entre los zumos control y presurizados (500 MPa/5 min), y con los de Picouet *et al.* (2015), en los zumos de zanahoria (600 MPa/5 min).

En cuanto a los atributos de flavor, las muestras TP tuvieron menor sabor a fruta fresca y mayor sabor a cocido, lo que muestra el efecto negativo del tratamiento TP, en ambos atributos de olor y sabor. Según Farkas y Hoover (2000) y Barbosa-Cánovas y Rodríguez (2002), las altas presiones que normalmente se utilizan en la industria alimentaria, no pueden romper los enlaces covalentes, por lo que permanecen sin cambios los compuestos responsables del color, aroma y sabor, manteniendo la calidad sensorial del alimento. A lo largo de la vida útil, el sabor en las muestras TP permaneció estable, mientras que en las muestras HPP aumentó el sabor ácido y disminuyó el sabor dulce. El aumento del sabor ácido podría modificar la percepción del sabor dulce, como señala Pangborn (1961). Este resultado puede estar relacionado con la disminución de la calidad sensorial total en los smoothies HPP, ya que la mayoría de los consumidores prefieren un sabor dulce a uno ácido. Otros sabores básicos junto al dulce (agrio, salado, amargo y umami) son más complejos para adquirir y desarrollar una preferencia (Sijtsema *et al.*, 2012).

El color de los zumos de frutas y vegetales es un atributo importante en las preferencias del consumidor y se ha utilizado como un indicador de la calidad sensorial y nutricional de los alimentos, durante su procesado y posterior almacenamiento. En cuanto a los atributos de

aparición, después del tratamiento de conservación, los smoothies HPP no mostraron diferencias significativas con los smoothies control. Dede *et al.*, (2007) y Picouet *et al.*, (2015) concluyeron que, para muchos productos de frutas, el procesado HPP fue efectivo para conservar el color fresco. Nuestros resultados son coherentes con esta conclusión porque, en general, el color de las muestras HPP fue similar a los smoothies control a día 0. A lo largo de la vida útil se produjo un deterioro general del color, mediante una disminución de la intensidad del color coral y un aumento de la intensidad del color marrón. Estos cambios fueron más evidentes en las muestras HPP y podrían estar relacionados con una mayor actividad enzimática POD y PPO (Liavoga y Matella, 2012; Zabetakis *et al.*, 2000). Además, estos resultados estuvieron de acuerdo con los de Keenan *et al.* (2010), quienes concluyeron que los smoothies pasteurizados mostraron menor cambio de color que los HPP.

Entre los smoothies HPP y TP, se observaron diferencias significativas respecto a la viscosidad. Las muestras HPP no tuvieron diferencias significativas con la viscosidad de los smoothies control. En cambio, fueron puntuados con una menor viscosidad, en comparación con los pasteurizados. Este resultado estuvo de acuerdo con la mayor viscosidad absoluta obtenida en los pasteurizados (Tabla 19), lo que puede ser debido a la mayor actividad del enzima PME (Tabla 18), implicada en la degradación de la pectina de la pared celular y, por tanto, en la aparición de productos de baja viscosidad (Giovane *et al.*, 2004). Además, las muestras HPP tuvieron menor contenido de sacarosa, que las muestras TP. La sacarosa podría proteger contra la desnaturalización

de la PME, mediante la reducción de la actividad de agua del medio. Por el contrario, las muestras TP fueron puntuadas más arenosas.

En cuanto a los resultados de la calidad global, no se observaron diferencias significativas entre los smoothies control y los HPP a día 0. Ambos obtuvieron la mayor puntuación. A lo largo del almacenamiento, la calidad sensorial total de los smoothies HPP disminuyó significativamente, mientras que no se observaron cambios en los smoothies TP. La inactivación enzimática por HPP es un fenómeno muy complejo y la mayoría de las veces, la aplicación de HPP sin tratamiento térmico es insuficiente para lograr la completa inactivación de los enzimas oxidativos (Chakraborty *et al.*, 2014), responsables del deterioro del color, sabor y contenido nutricional en zumo de frutas (Liavoga y Matella, 2012) y smoothies (Keenan *et al.*, 2010), afectando negativamente a la puntuación hedónica de los derivados de fruta.

Tabla 22. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4 °C.

	Vida útil	Olor				Flavor						
		Intensidad	Plátano	Fresa	Cocido	Intensidad	Dulce	Amargo	Cocido	Plátano	Fresa	Acido
Control	0	6.7±1.0 ^x	4.4±1.3 ^x	3.5±1.6 ^x	0.1±0.2 ^y	6.9±0.9 ^x	4.8±1.7	0.9±0.9 ^y	0.1±0.4 ^y	4.2±1.6 ^x	3.4±1.6 ^x	2.5±1.1
HPP	0	6.0±1.0 ^y	4.3±1.6 ^{a x}	3.1±1.5 ^x	0.3±0.6 ^y	6.6±1.0 ^{a xy}	4.6±1.8 ^a	1.0±0.9 ^{xy}	0.2±0.4 ^y	4.5±1.6 ^{a x}	3.3±1.5 ^x	2.8±1.1 ^b
TP	0	5.9±1.1 ^y	2.5±1.4 ^y	1.5±0.9 ^y	4.5±2.1 ^x	6.0±0.9 ^y	3.8±1.6	1.7±1.4 ^y	4.1±1.6 ^x	2.7±1.1 ^y	2.0±1.2 ^y	2.2±1.0
HPP	7	6.1±0.6	4.0±1.3 ^{ab x}	2.8±0.9	0.4±0.5	6.3±1.0 ^{ab}	3.6±1.5 ^{ab}	1.6±1.3	0.2±0.6 ^y	3.0±1.6 ^b	2.5±1.3 ^x	3.4±0.9 ^{ab x}
TP	7	6.3±0.9	2.0±1.1 ^y	1.4±1.0	4.8±1.7	6.1±1.0	3.4±1.4	1.7±1.5	4.4±1.6 ^x	2.3±1.3	1.7±1.1 ^y	2.0±1.0 ^y
HPP	14	5.8±0.9	3.1±1.1 ^{b x}	2.6±1.3 ^x	0.5±0.6 ^y	6.2±0.6 ^{ab}	3.3±1.2 ^b	1.8±1.3	0.4±0.8 ^y	2.8±1.4 ^b	2.4±1.5	3.3±0.8 ^{ab x}
TP	14	6.3±0.9	2.0±1.6 ^y	1.5±1.2 ^y	4.7±1.6 ^x	6.3±0.8	3.3±1.5	1.9±1.4	4.4±1.5 ^x	2.6±2.3	1.7±1.3	1.9±1.0 ^y
HPP	21	5.7±0.6	3.1±1.3 ^{b x}	2.3±1.1 ^x	0.7±0.9 ^y	5.8±0.7 ^b	2.9±1.3 ^b	1.6±1.1	0.4±0.6 ^y	2.6±1.5 ^b	2.2±1.2	3.7±1.0 ^{a x}
TP	21	6.1±1.0	1.7±1.0 ^y	1.3±1.2 ^y	4.8±1.8 ^x	6.1±0.9	2.6±1.2	1.7±1.5	4.5±1.6 ^x	1.9±0.8	1.5±1.3	2.2 ±1.2 ^y

Tabla 22 (continuación). Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de fruta almacenados 21 días a 4 °C.

	Vida útil	Apariencia	Textura		Calidad global	
		Color coral	Color pardo	Viscosidad	Arenosidad	
Control	0	6.8±1.4 ^x	1.4±1.2 ^y	4.3±2.1 ^y	3.4±1.5	7.8±0.9 ^x
HPP	0	6.2±1.2 ^{a x}	1.8±1.3 ^{b y}	4.3±1.7 ^{x,y}	3.1±1.5	7.5±1.1 ^{a x}
TP	0	3.4±1.1 ^y	5.0±1.6 ^x	5.7±1.5 ^x	4.1±1.6	4.9±1.5 ^y
HPP	7	5.9±1.1 ^{ab}	2.3±1.4 ^{ab}	3.9±1.3 ^y	3.5±1.3 ^y	6.8±1.0 ^{ab}
TP	7	3.3±1.1	5.2±1.6	5.9±1.2 ^x	4.6±1.8 ^x	4.8±1.2
HPP	14	4.9±1.2 ^{bc x}	3.5±1.6 ^{a y}	4.0±1.4 ^y	3.7±1.5	5.9±1.2 ^{bc x}
TP	14	2.9±1.1 ^y	5.4±1.6 ^x	5.6±1.6 ^x	4.2 ± 1.8	4.7±1.0 ^y
HPP	21	4.6±1.2 ^{c x}	3.4±1.5 ^{a y}	3.9±1.6 ^y	3.2±1.5 ^x	5.8±1.1 ^{c x}
TP	21	2.7±1.3 ^y	6.0±1.6 ^x	5.6±1.7 ^x	4.4±1.7 ^y	4.3±0.8 ^y

HPP (350 / 10 °C / 5 min), TP (85 °C / 7 min). M±SD: Media ± Desviación Típica.

Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$. ^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$. ^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.3. Ensayo III: Vida comercial de los smoothies de frutos rojos tratados por alta presión y calor.

Las frutos rojos tienen colores y sabores característicos y contienen altos niveles de antioxidantes, como compuestos fenólicos, flavonoles, taninos y antocianos, entre otros, con efectos positivos para la salud humana (Netzel *et al.*, 2002; Nile y Park, 2014). El impacto directo de los tratamientos HPP supone poca alteración del olor y el sabor en las propiedades sensoriales de los productos derivados de frutas y verduras, debido a dicho tratamiento no provoca cambios en los enlaces covalentes de los compuestos de bajo peso molecular (Tauscher, 1995). Sin embargo, dependiendo de las condiciones de presurización o de la matriz dónde se aplica, los tratamientos HPP pueden modificar las reacciones enzimáticas y químicas, lo que podría resultar en la formación de compuestos asociados con cambios no deseados en el color, olor y sabor (Oey *et al.*, 2008).

El presente estudio tiene como objetivo comparar los efectos de un tratamiento leve HPP (350 MPa y 10 °C durante 5 min) y un tratamiento térmico (85 °C durante 7 min), sobre la calidad y la estabilidad de smoothies a base de diferentes frutos rojos (fresa, uva negra, mora, grosella, uva blanca, entre otras). Se evaluó la destrucción de los microorganismos y la inactivación de los enzimas asociados a la descomposición de las frutas, así como varias medidas objetivas de la estabilidad oxidativa, pardeamiento, clarificación del smoothie, estabilidad sensorial y retención de los principales nutrientes.

4.3.1. Calidad microbiológica.

El proceso de conservación utilizado para los smoothies debe garantizar su calidad microbiológica y seguridad durante el almacenamiento en refrigeración. Los recuentos microbiológicos se presentan en la **Tabla 23**. El recuento en los smoothies HPP, al final del almacenamiento, para microorganismos aerobios mesófilos, bacterias psicrófilas y coliformes totales fueron 4.2, 2.3 y 2.3 log ufc g⁻¹, respectivamente, mientras que *E. coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* estuvieron ausentes en todas las muestras. Según la Comisión Europea (EC) nº 2073 (2005), para el consumo de smoothies se requiere ausencia de bacterias patógenas y un nivel de microorganismos mesófilos por debajo de 5 log ufc g⁻¹. Por lo tanto, los smoothies presurizados cumplen ampliamente las normas microbiológicas durante los 28 días de conservación bajo refrigeración. HPP también fue eficaz contra mohos y levaduras, los principales microorganismos implicados en el deterioro de los zumos y purés de frutas (Parish y Higgins, 1989). El recuento de mohos y levaduras fue de 2 log ufc g⁻¹, en el día 28, siendo necesario al menos 6 log ufc g⁻¹ para producir alteraciones sensoriales por fermentación en zumos de fruta (Thomas et al., 2004). Por lo tanto, la aplicación de 350 MPa a 10 °C durante 5 min fue eficaz para controlar el crecimiento de bacterias patógenas y marcadores de higiene tales como bacterias coliformes, mohos y levaduras, que pueden proliferar en los smoothies. En comparación con HPP, TP (85 °C /7 min) fue ligeramente más eficaz en la reducción de la carga microbiológica de los smoothies, aunque esto no supone una

ventaja con respecto a HPP, ya que las cargas microbiológicas fueron bajas en ambos tipos de tratamientos. Una conclusión similar se obtuvo en un estudio preliminar, donde la calidad microbiológica de los smoothies, elaborados con naranja, plátano, manzana y fresa, se estudió a los 30 días de almacenamiento refrigerado. Se obtuvieron recuentos inferiores a $1 \log \text{ g}^{-1}$ de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras mediante el uso, tanto de HPP (350 MPa / 10 °C / 5 min), como TP (85 °C / 7 min), mientras que los smoothies control alcanzaron cargas microbianas de $4.2 \log \text{ ufc g}^{-1}$ (aerobios mesófilos) y $3.5 \log \text{ ufc g}^{-1}$ (mohos y levaduras). Por otra parte, el uso de presiones más elevadas (450-600 MPa/ 10 °C / 3-5 min) no tuvo efectos antimicrobianos adicionales en los smoothies, resultados que se utilizaron para diseñar el presente ensayo (Hurtado *et al.*, 2015).

El uso de altas presiones, entre 200 y 400 MPa, fue eficaz para suprimir la mayoría de patógenos y microorganismos vegetativos presentes en los zumos de frutas (Balasubramaniam y Farkas, 2008; Bayindirli *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2004; Juárez-Enríquez *et al.*, 2014; Parish, 1998; Varela-Santos *et al.*, 2012; Vega-Gálvez *et al.*, 2014). La destrucción de microorganismos por HPP (300 MPa / 4 °C / 5 min) se consiguió en smoothies elaborados con bayas, naranja, uva y manzana, inoculados con cultivos de *Zygosaccharomyces bailii* y *L. monocytogenes* (Scolari *et al.*, 2015). Como se observa, el control de los microorganismos no plantea grandes dificultades en los smoothies de frutos rojos presurizados a 350 MPa y baja temperatura.

Tabla 23. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad microbiológica de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

Tratamiento	Vida útil	Aerobios mesófilos	B. psicrófilas	Mohos y Levaduras
Control	0	3.5±0.3 ^x	2.5±0.4	3.3±0.12
HPP	0	1.8±0.9 ^y	<LoD	1.5±0.12 ^a
TP	0	0.2±0.3 ^z	<L.D.	<L.D.
HPP	7	1.1±0.4 ^x	0.5±0.8	1.4±0.16 ^a
TP	7	0.3±0.3 ^y	<L.D.	<L.D.
HPP	14	0.9±0.2 ^x	0.2±0.4	0.9±0.12 ^b
TP	14	0.1±0.2 ^y	<L.D.	<L.D.
HPP	21	0.8±0.3 ^x	<L.D.	0.9±0.16 ^b
TP	21	0.4±0.3 ^y	<L.D.	<L.D.
HPP	28	0.6±0.3 ^x	0.2±0.3	0.4±0.16 ^c
TP	28	0.2±0.3 ^y	<L.D.	<L.D.

HPP: (350 MPa/5 min/10 °C); TP: (85 °C/7 min).Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

Unidades: Log ufc g⁻¹; LD < 0.1 log ufc g⁻¹.

4.3.2. Actividad enzimática residual.

La inactivación de los enzimas es importante para impedir el deterioro del producto. Como se puede ver en la **Tabla 24**, las actividades relativas de los enzimas PME, PPO y POD fueron similares en los smoothies HPP y en el control en el día 0, lo que indica que estos tres

enzimas fueron resistentes a las condiciones de presión aplicadas. Por el contrario, TP inactivó los enzimas PPO y POD, y, en menor medida, el enzima PME. Las actividades de estas enzimas se redujeron a alrededor del 16 % (POD), 3.6 % (PPO) y 25 % (PME) en el día 0, en los smoothies pasteurizados. Según esto, los enzimas pécticos y oxidasas permanecieron plenamente activos en los smoothies HPP durante el almacenamiento y, por lo tanto, estos smoothies tendrían una mayor tendencia a la oxidación y a la clarificación. La pérdida de la nube turbia es un defecto principalmente asociado a la actividad PME, debido a la desesterificación de la pectina, que favorece la precipitación (Cameron *et al.*, 1998). Por otra parte, PPO puede producir pardeamiento en la fruta, al catalizar la oxidación de los fenoles (García-Palazón *et al.*, 2004), mientras que POD oxida diferentes sustratos, lo que resulta en la formación de diferentes productos, que pueden causar cambios en el color y el sabor de las frutas (Zhang *et al.*, 2005). Esto no significa que una inactivación completa de los enzimas POD y PPO proporcione una estabilidad total frente a la oxidación, debido a que también tienen lugar reacciones no enzimáticas, tales como la reacción de Maillard, degradación de pigmentos y ácido ascórbico, que pueden contribuir al deterioro del sabor y color en derivados de frutas (Ibarz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014).

Los enzimas oxidasas y pécticos se inactivan, a menudo, mediante tratamientos térmicos, pero son altamente resistentes a las altas presiones. La sensibilidad hacia la presión depende del origen del enzima y de las condiciones del proceso (Chakraborty *et al.*, 2014; Hendrickx *et*

al., 1998; Terefe *et al.*, 2014). En general, no existe un acuerdo sobre la respuesta de los enzimas presentes en frutas a los tratamientos HPP. La aplicación de 350-600 MPa durante 3-5 minutos a 10 °C, en smoothies de frutas, no afectó a las actividades de PPO y POD (Hurtado *et al.*, 2015), mientras que, Keenan *et al.* (2012b) encontraron reducciones de dos tercios en la actividad PPO de un smoothie de frutas (450 MPa / 20 °C / 5 min). Otros estudios también encontraron inactivación de POD después del tratamiento con HPP (400 MPa / 20 °C / 20 min) en puré de fresa (Moreno *et al.*, 2002), o bien una inactivación parcial de POD también en puré de fresa (300 MPa / 20 °C / 15 °C) (Cano *et al.*, 1997) y en fresa entera (450 MPa / 20 °C / 6 min) (Terefe *et al.*, 2009a). Se han encontrado resultados similares para PPO, como la inactivación parcial en fresa entera (400 MPa / 20 °C / 5 min) (García-Palazón *et al.*, 2004) y en mosto de uva (300 MPa / 15 °C / 2 min) (Castellari *et al.*, 1997). Por el contrario, en puré de fresa tratado con HPP (300 MPa / 20 °C / 15 °C) tuvo lugar una ligera activación de PPO (Cano *et al.*, 1997), en frambuesa (400 MPa / 20 °C / 5 min) (García-Palazón *et al.*, 2004), en un extracto enzimático de arándano (100-690 MPa / 30-70 °C / 10 min) (Terefe *et al.*, 2015) y en zumo de manzana (450 MPa / 25 °C / 15 min) (Bayindirly *et al.*, 2006). El enzima PME también ha sido resistente a la presión en otros estudios. En smoothies presurizados a 350-400 MPa / 10 °C / 5 min, PME no se inactivó, siendo necesario aplicar 600 MPa / 10 °C / 3 min para reducir la actividad PME a un 60% (Hurtado *et al.*, 2015). PME se inactivó parcialmente en zumo de naranja (450 MPa / 50 °C / 30 min) (Nienaber y Shellhammer, 2001a, b; Bayindirli *et al.*, 2006) y plátano (600 MPa / 10 °C / 2 min) (Ly-Nguyen *et al.*, 2002a), mientras

que, por el contrario, HPP favoreció una ligera activación de PME en zumo de naranja (200-400 MPa / 20 °C / 15 min) (Cano et al., 1997). Un estudio realizado sobre diferentes enzimas PME purificadas ha confirmado que la resistencia a la presión de PME depende del tipo de fruta. PME de fresa fue más resistente al tratamiento HPP (850 MPa / 10 °C / 90 s) en comparación con la PME de naranjas y plátanos (Ly-Nguyen *et al.*, 2002b). Teniendo en cuenta la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos, debido a los diferentes productos y condiciones de presurización, en general, la literatura confirmó nuestra apreciación que las enzimas oxidasas y pécticas permanecen activas tras aplicar tratamientos leves de HPP.

Tabla 24. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la actividad enzimática de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

	Vida útil	POD (%)	PPO (%)	PME (u PME g ⁻¹)
Control	0	100.2±3.8 ^x	100.7±2.8 ^x	1.2±0.1 ^x
HPP	0	94.3±1.6 ^x	98.4±2.8 ^x	1.2±0.1 ^x
TP	0	16.2±4.4 ^y	3.6±1.6 ^y	0.3±0.0 ^y
HPP	7	103.8±2.6 ^x	106.2±4.6 ^x	1.3±0.1 ^x
TP	7	9.5±1.4 ^y	5.9±3.0 ^y	0.4±0.0 ^y
HPP	14	99.6±2.7 ^x	103.0±4.1 ^x	1.5±0.1 ^x
TP	14	11.8±2.1 ^y	4.9±2.2 ^y	0.4±0.0 ^y
HPP	21	97.7±2.7 ^x	111.4±4.9 ^x	1.2±0.1 ^x
TP	21	9.7±3.1 ^y	0.37±0.4 ^y	0.3±0.1 ^y
HPP	28	101.3±3.4 ^x	105.1±1.6 ^x	1.2±0.1 ^x
TP	28	9.4±3.1 ^y	0.0±0.0 ^y	0.3±0.1 ^y

HPP:(350 MPa/5 min/10 °C); TP: (85 °C/7 min).Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

4.3.3. Características físico-químicas.

La acidez total y el pH son parámetros que se controlan a menudo en estudios de vida útil, ya que indican que los zumos y smoothies de frutas pueden tener un exceso de carga microbiológica. Como se muestra en la **Tabla 25**, independientemente del tratamiento, los smoothies de frutos rojos son un producto ácido (pH <3,5). Los valores de pH y acidez total valorable medidos en el día 0 fueron similares en todos los

smoothies. Sin embargo, la acidez total fue mayor en los smoothies HPP, que en los smoothies TP, en diferentes días de almacenamiento, lo que supuso una pequeña, pero significativa reducción en el pH al final del almacenamiento. Otros estudios sobre HPP describieron cambios significativos en el pH y la acidez durante la vida útil en zumo de naranja (Bull *et al.*, 2004) y zumo de arándano (Barba *et al.*, 2012). Como se ha visto, el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras fue inhibido durante la vida útil, tanto por HPP, como TP, aunque los recuentos de aerobios mesófilos fueron ligeramente superiores en los smoothies HPP. Quizás, esto podría explicar las pequeñas variaciones en el pH y la acidez total observada en smoothies de frutos rojos durante el almacenamiento.

Las medidas de reflectancia son particularmente útiles para discriminar cambios de color debidos a la elaboración y el almacenamiento de los alimentos. Como se muestra en la **Tabla 25**, las coordenadas de color CIELab fueron similares en los smoothies control y los HPP en el día 0. En consecuencia, el tratamiento HPP no modificó el color rojo-violáceo natural de los smoothies de frutos rojos. Por el contrario, TP aumentó los valores de L^* , a^* y b^* , lo que condujo a una cierta pérdida de la tonalidad del color púrpura. Independientemente del procesado, el color fue estable en el tiempo en ambos tipos de frutos rojos. Del mismo modo, no hubo diferencias en el índice de pardeamiento entre los smoothies control y HPP en el día 0, mientras que los smoothies TP presentaron el índice de pardeamiento más alto. Como ocurrió para el color CIELab, el índice de pardeamiento se mantuvo estable en ambos tipos de smoothies durante el almacenamiento. Ambas medidas, el color

CIELab e índice de pardeamiento, confirmaron que el uso de HPP mantuvo el color de los smoothies y éste fue estable durante el almacenamiento.

En smoothies con un color naranja (Hurtado *et al.*, 2015), el uso de HPP (350 MPa / 20 °C / 5 min) no afectó al color CIELab ni el índice de pardeamiento medido después de 2 días de almacenamiento. Por el contrario, el uso de TP (85 °C / 5 min) aumentó el valor de L*, como ocurrió en nuestro estudio de frutos rojos. En otros smoothies de color naranja (Keenan *et al.*, 2012a), el uso de HPP (450 MPa / 20 °C / 5 min) dio como resultado muestras con inferior L*, a* y b*, mientras que TP disminuyó el valor de a *. Por otra parte, durante la vida útil (30 días) se produjo un oscurecimiento gradual (reducción de L *) en ambos smoothies tratados por HPP o TP, sobre todo en los primeros. En fresa tratada a 300 MPa / 20 °C / 2-10 min no se produjeron cambios de color CIELab (Terefe *et al.*, 2009a). De manera similar, no se vió afectado un zumo de arándano (600 MPa / 42 °C / 5 min), aunque este sufrió una ligera disminución en L* y el ángulo hue durante el almacenamiento en refrigeración (56 días) (Barba *et al.*, 2012). Por el contrario, HPP (350 MPa / 4 °C / 150 s) aumentó los valores de L*, a* y b* en el zumo de granada (Varela- Santos *et al.*, 2012). Después, estas tres coordenadas disminuyeron fuertemente durante el almacenamiento en refrigeración (35 días) debido a la degradación de antocianinas (Varela- Santos *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios indican que la fruta tratada mediante HPP puede conservar su color original, pero no sería estable durante el almacenamiento. Por el contrario, se conoce que los tratamientos

térmicos pueden producir cambios de color en los productos de fruta como resultado de varias reacciones, incluyendo la reacción de Maillard, la caramelización y la destrucción de pigmentos como antocianinas (Ibarz *et al.*, 2000), lo que podría explicar el cambio de rojo-violáceo a rojizo observado en la tonalidad del color en los smoothies TP. Estas reacciones de pardeamiento serían menos perceptibles en los smoothies de frutos rojos que en los smoothies más claros, y por lo tanto, el oscurecimiento sería más difícil de determinar.

Tabla 25. Efecto de los tratamientos de conservación sobre los parámetros físico-químicos de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

Vida útil		pH	Acidez Total (g ac.Cítrico 100ml ⁻¹)	L*	a*	b*	I.P. (Abs.420nm)
Control	0	3.3±0.0	0.80±0.01	23.1±0.6 ^y	20.0±0.5 ^y	-1.9±0.4 ^y	0.32±0.02 ^y
HPP	0	3.3±0.0	0.81±0.01 ^b	24.1±1.1 ^y	20.7±0.6 ^y	-1.6±0.4 ^y	0.29±0.01 ^y
TP	0	3.3±0.0	0.78±0.01	28.5±0.8 ^x	26.7±0.3 ^x	3.0±1.1 ^x	0.37±0.03 ^x
HPP	7	3.4±0.0	0.85±0.01 ^{a x}	24.3±1.0 ^y	21.9±1.5 ^y	-1.3±1.0 ^y	0.27±0.02 ^y
TP	7	3.4±0.0	0.80±0.01 ^y	28.2±0.6 ^x	25.7±0.4 ^x	2.5±0.4 ^x	0.36±0.01 ^x
HPP	14	3.4±0.0	0.84±0.01 ^{ab}	24.5±0.6 ^y	21.7±1.5 ^y	-1.7±0.6 ^y	0.26±0.02 ^y
TP	14	3.4±0.0	0.83±0.01	28.7±0.8 ^x	26.2±1.1 ^x	2.3±0.4 ^x	0.33±0.02 ^x
HPP	21	3.3±0.0	0.85±0.01 ^{ab x}	25.3±0.0 ^y	21.0±0.9 ^y	-1.2±0.4 ^y	0.27±0.01 ^y
TP	21	3.4±0.0	0.80±0.01 ^y	28.7±0.8 ^x	24.8±0.5 ^x	2.3±0.4 ^x	0.35±0.01 ^x
HPP	28	3.2±0.0 ^y	0.85±0.01 ^{ab x}	25.2±0.4 ^y	21.2±0.5 ^y	-1.3±0.4 ^y	0.24±0.01 ^y
TP	28	3.4±0.0 ^x	0.79±0.01 ^y	28.2±0.8 ^x	24.6±1.0 ^x	2.1±0.4 ^x	0.37±0.01 ^x

HPP: (350MPa/5min/10°C); TP: (85°C/7min). Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

4.3.4. Parámetros relacionados con la clarificación.

La estabilidad de la turbidez durante el almacenamiento es una característica de calidad importante en los zumos y smoothies de frutas. Como se muestra en el **Tabla 26**, los smoothies de frutos rojos tuvieron una turbidez alta en comparación con otros smoothies elaborados sin frutos rojos (400-750 NTU) (Hurtado *et al.*, 2015). La turbidez disminuyó en los smoothies durante el almacenamiento en ambos tratamientos. Sin embargo, debido a la alta turbidez de este tipo de smoothies, sólo se pudo cuantificar a partir del día 28, una vez que NTU disminuyó por debajo del límite de detección del turbidímetro (4.000 NTU). En ese momento, los smoothies HPP fueron menos turbios que los smoothies TP. La transmitancia óptica también se midió para comparar la clarificación del smoothie durante el almacenamiento. Los porcentajes de transmitancia relativa fueron muy bajos en ambos tipos de smoothies y confirmaron que la turbidez para los presurizados, a día 28, fue inferior que para el resto. Otros estudios han visto que las altas presiones tienen una tendencia a favorecer la clarificación. Hurtado *et al.* (2015) encontraron transmitancias relativas del 20 % y 16 % a las 48 h post-procesado, en smoothies tratados por HPP y TP, respectivamente. A diferencia de nuestro estudio, Bull *et al.* (2004) no encontraron diferencias claras en el grado de clarificación, medida como la transmitancia relativa, de un zumo de naranja tratado por HPP (600 MPa / 20 °C / 1 min) o TP (85 °C / 25 s), después de cuatro semanas de almacenamiento en refrigeración.

La pérdida de turbidez de la nube del zumo también puede dar lugar a cambios de viscosidad. La viscosidad absoluta fue menor en los smoothies presurizados que en los térmicos durante todo el período de almacenamiento. Esto confirma el mayor grado de clarificación obtenido en los presurizados. Hurtado *et al.* (2015) encontraron una menor viscosidad absoluta en los smoothies HPP, en comparación con los TP almacenados durante 48 h. En un estudio de vida útil en zumo de fresa, tras aplicar 600 MPa / 25°C / 4 min, la viscosidad absoluta disminuyó un 32.5 % después de un mes de almacenamiento a 4 °C (Cao *et al.*, 2012), aunque no se estudió TP. Resultados similares se han obtenido en el zumo de naranja tratado con HPP (Parish, 1998; Polydera *et al.*, 2005b), aunque Bull *et al.* (2004) no encontraron un efecto claro del tratamiento sobre la viscosidad del zumo de naranja almacenado en frío. Igual ocurrió en el estudio de Keenan *et al.* (2012a), que no encontraron diferencias entre los smoothies tratados por HPP o TP en dos medidas relacionadas con la viscosidad, el coeficiente de consistencia (K) y en el índice de flujo (n), medido después de procesar (24 h) y después del almacenamiento (30 días). Hemos observado que la mayor degradación de pectina se produjo en los smoothies HPP, como consecuencia de las actividades enzimáticas residuales, ya que contribuyen a aumentar la clarificación durante el almacenamiento en refrigeración. Además, el contenido en sólidos insolubles totales disminuyó claramente con el tiempo en los smoothies HPP.

Tabla 26. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la clarificación de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

	Vida útil	Turbidez (NTU)	Transmitancia (%T)	Viscosidad absoluta (cP)	S.solubles (°Brix)	S.Insolubles (g 100ml ⁻¹)
Control	0	>LoD	0.27±0.00	4.8±0.3 ^y	12.8±0.1	20.8±0.9
HPP	0	>LoD	0.27±0.00	4.3±0.1 ^{a y}	12.7±0.1	22.8±1.3 ^a
TP	0	>LoD	0.27±0.00	6.4±0.2 ^{a x}	12.8±0.2	22.7±0.5
HPP	7	3728±187	0.41±0.07	2.9±0.2 ^{b y}	13.0±0.0	18.1±0.3 ^b
TP	7	>4000	0.27±0.08	5.8±0.1 ^{b x}	12.9±0.1	23.1±0.2 ^x
HPP	14	3460±540	0.81±0.33	2.4±0.1 ^{b y}	13.0±0.0	15.9±0.2
TP	14	>LoD	0.33±0.36	5.9±0.1 ^{b x}	13.0±0.0	23.0±0.3 ^x
HPP	21	3433±566	1.27±0.01 ^x	2.1±0.1 ^{b y}	12.8±0.1	15.3±0.3 ^c
TP	21	>LoD	0.27±0.01 ^y	5.9±0.3 ^{b x}	12.9±0.1	22.7±0.2 ^x
HPP	28	2167±551 ^y	1.36±0.36 ^x	1.9±0.1 ^{b y}	12.8±0.1	14.9±0.3 ^c
TP	28	3570±503 ^x	0.30±0.33 ^y	5.6±0.2 ^{b x}	12.8±0.1	22.3±0.4 ^x

HPP: (350MPa/5min/10°C); TP: (85°C/7min). Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

>LoD: superior al límite de detección.

4.3.6. Capacidad antioxidante.

Los smoothies pueden oxidarse durante el procesado y almacenamiento, como resultado de reacciones enzimáticas y reacciones no enzimáticas. Los resultados se presentan en la **Tabla 27**. La capacidad antioxidante de los smoothies de frutos rojos fue particularmente alta, alrededor del doble, en comparación con otros

smoothies elaborados con una menor proporción de frutos rojos (Hurtado *et al.*, 2015; Keenan *et al.*, 2012b). Este resultado era de esperar, ya que los frutos rojos son particularmente ricos en antioxidantes fenólicos, como flavonoles, taninos y antocianos, entre otros (Netzel *et al.*, 2002; Nilo y Park, 2014). Aunque el uso de HPP o TP no afectó a la capacidad antioxidante (día 0), ésta fue ligeramente superior en los TP. El estado antioxidante de ambos smoothies disminuyó a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento. Los valores de FRAP disminuyeron a partir del día 21 en los smoothies TP, pero no en los smoothies HPP; mientras que los valores de IC_{50} aumentaron a partir del día 14 en ambos tipos de tratamientos. Los smoothies HPP tuvieron un estado antioxidante más bajo que los pasteurizados en los días 14 y 21. Otros estudios tampoco encontraron cambios en la capacidad antioxidante de un zumo de naranja después de HPP o TP (Fernández-García *et al.*, 2001, Sánchez-Moreno *et al.*, 2005). En cuanto a estudios de vida útil, Keenan *et al.* (2010) informaron de diferencias menos marcadas en el estado antioxidante de smoothies tratados por HPP (450 MPa / 20 °C / 5 min) y TP (P70 > 10 min) durante el almacenamiento en refrigeración (30 días). Los resultados pueden ser explicados por la inactivación parcial de enzimas oxidasas bajo estas condiciones de presurización. Otros estudios informaron de resultados opuestos. Polydera *et al.* (2005a) encontraron una mayor estabilidad oxidativa en el tratado por HPP (600 MPa / 40 °C / 4 min), que en el TP (80 °C / 1min) en zumo de naranja, durante el almacenamiento en refrigeración (90 días), lo que indicaría, en este caso, que los TP pueden ser menos eficaces que los tratamientos a presiones elevadas, para alcanzar la inactivación de los enzimas oxidasas en frutas

procesadas. Nuestros datos indican que, cuando las condiciones de presurización aplicadas no son suficientes para la inactivación de las enzimas, las actividades remanentes pueden favorecer la oxidación y los smoothies serían más propensos a ser oxidados durante el almacenamiento. Sin embargo, a diferencia de otros smoothies, los de frutos rojos tuvieron una alta capacidad antioxidante, lo que puede contribuir a reducir los efectos de las reacciones de oxidación sobre el color y sabor.

Tabla 27. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la capacidad antioxidante de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4°C.

	Vida útil	FRAP ($\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}$ 100ml ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀)
Control	0	705.1±36.5	20.1±0.4
HPP	0	695.5±32.3	21.0±0.4 ^{bc}
TP	0	757.6±57.3 ^a	19.6±0.5 ^b
HPP	7	624.4±53.9	19.5±0.3 ^c
TP	7	667.6±69.9 ^{ab}	18.8±0.6 ^b
HPP	14	633.7±30.4 ^y	22.7±1.4 ^{ab x}
TP	14	713.3±35.4 ^{ab x}	21.2±0.7 ^{b y}
HPP	21	611.2±23.7 ^y	24.0±0.5 ^{a y}
TP	21	658.5±25.2 ^{b x}	25.2±1.2 ^{a x}
HPP	28	627.2±34.8	23.9±1.3 ^a
TP	28	666.1±26.7 ^b	24.3±1.5 ^a

HPP: (350 MPa/5 min/10 °C); TP:(85 °C/7 min).Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

4.3.6. Contenido nutricional.

Los antioxidantes de la fruta, la vitamina C y los azúcares pueden ser degradados por diferentes vías durante el procesado y almacenamiento del smoothie. Los resultados sobre los datos nutricionales se presentan en la **Tabla 28**. La vitamina C determinada en los smoothies correspondió a ácido dehidroascórbico, mientras que el contenido en ácido ascórbico fue inferior al límite de detección ($<0,5 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$) en todas las muestras. Esto también se ha observado en otros estudios en los que la vitamina C se analizó por HPLC-UV. Hurtado *et al.* (2015) encontraron cantidades más bajas ($<5 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$) de ácido ascórbico, que de ácido dehidroascórbico ($<30 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$) en smoothies a las 48 h post-procesado. Esto confirmó que el ácido ascórbico se oxidó rápidamente durante el procesamiento del smoothie. Nuestros resultados mostraron que HPP no redujo el contenido total de vitamina C en el día 0, aunque esta vitamina se redujo de 21 a $3 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$ en el día 28 en los presurizados, como consecuencia de la mayor oxidación durante el almacenamiento. Por el contrario, TP redujo el contenido total de vitamina C a $13 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$ en el día 0, siendo esta vitamina completamente degradada durante el almacenamiento. El contenido total de vitamina C se igualó en ambos tipos de smoothies en el día 14, después de lo cual, el uso de HPP no tuvo beneficios nutricionales adicionales respecto a la retención de vitamina C. Varios estudios comparativos también han informado que la degradación del ácido ascórbico es menor en el HPP que en los productos TP (Butz *et al.*, 2003; Hurtado *et al.*, 2015; Keenan *et al.*, 2012b; Landl *et al.*, 2010;

Polydera *et al.*, 2003). El ácido ascórbico puede oxidarse a ácido dehidroascórbico, ya que protege a los fenoles frente a la oxidación, convirtiendo las quinonas a su forma reducida. Por lo tanto, la oxidación del ácido ascórbico puede verse favorecida en productos ricos en compuestos fenólicos, dónde los enzimas oxidasas, como PPO, permanecen activos, como sucedió en los presurizados. Por otra parte, las reacciones de oxidación se incrementan en productos de frutas homogeneizados, que contienen más oxígeno ocluido que la fruta intacta, lo que también puede explicar la oxidación rápida de la vitamina C. Una vez que el ácido dehidroascórbico se forma, la vitamina C no tiene capacidad para reducir los fenoles. La degradación de la vitamina C puede corresponder a reacciones oxidativas catalizadas por enzimas oxidasas o a reacciones aeróbicas y anaeróbicas no enzimáticas (Nagy *et al.*, 1980). La pérdida de antioxidantes de la fruta está favorecida en los smoothies, cuando los enzimas de degradación no son inactivados por HPP (Keenan *et al.*, 2010), como sucedió en nuestro estudio.

A diferencia de la vitamina C, los fenoles de las frutas fueron bastante resistentes a la presión (Hurtado *et al.*, 2015; Keenan *et al.*, 2012b) y pasteurización (Landl *et al.*, 2010; Marszalek *et al.*, 2015; Patras *et al.*, 2009), a pesar que la degradación de los fenoles puede ocurrir en función de las condiciones de procesamiento y almacenamiento. Los smoothies de frutos rojos son particularmente ricos en fenoles totales, su contenido fue similar en los HPP y TP, alrededor de 85 mg GAE 100 ml⁻¹ (Tabla 28), aunque el contenido de fenoles disminuyó en los HPP en el día 28. Esto indicó que fue necesario un alto

grado de oxidación para observar una pérdida cuantitativa de fenoles en los smoothies. Keenan *et al.* (2010) también observaron una pérdida de fenoles totales durante el almacenamiento (30 días) en HPP (450 MPa / 20 °C / 3 min) en comparación con TP (70 °C $\geq$ 10 min). La degradación de los fenoles durante el almacenamiento también ocurrió en otros estudios de vida útil en diferentes zumos presurizados (Barba *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014; Varela-Santos *et al.*, 2012). El ácido ascórbico es el antioxidante primario involucrado en las reacciones de oxidación-reducción, que se producen en la fruta, pero, una vez que se degrada, los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes en los smoothies de frutas. Si las enzimas oxidasas no están inactivadas por el tratamiento, como sucede en los HPP, los fenoles terminarían siendo oxidados, sin la posibilidad de ser recuperados por la acción del ácido ascórbico, con la consiguiente pérdida nutricional de los smoothies. Confirmando nuestros resultados, Gil-Izquierdo *et al.*, (2002) encontraron una menor estabilidad de flavonoles en el zumo de naranja, cuando las actividades enzimáticas no fueron inhibidas por los tratamientos térmicos.

Los azúcares también pueden sufrir modificaciones químicas durante el procesado y almacenamiento de la fruta, debido a la hidrólisis y otras reacciones catalizadas o no por enzimas. El perfil de azúcares de los smoothies no se vio afectado por el tratamiento y tiempo de almacenamiento. El contenido en sacarosa estuvo por debajo del límite de detección ($<0,5 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$) en todas las muestras desde el día 0, lo que sugiere que, el triturado y mezclado de la fruta puede haber

favorecido la extracción y el contacto entre el azúcar y los enzimas, teniendo lugar la hidrólisis de la sacarosa durante el procesado. Esto explicaría la falta de sacarosa en los smoothies TP, ya que la inactivación térmica de β -fructosidasa está documentada (Butz *et al.*, 2003; Hurtado *et al.*, 2015). Los niveles de fructosa y glucosa fueron alrededor de 6 g 100 ml⁻¹ y no se vieron afectados por los tratamientos durante todo el período de almacenamiento. Del mismo modo, la inactivación incompleta de β -fructosidasa resultó en la desaparición total de la sacarosa en puré de frambuesa tratado con HPP y refrigerado durante 30 días (Butz *et al.*, 2003). Sin embargo, en el primer ensayo, la hidrólisis de sacarosa fue más intensa en los HPP que en los TP después de 48 h de almacenamiento en refrigeración. Dos hechos podrían apoyar los resultados obtenidos: (i) los frutos rojos tienen un menor contenido en sacarosa que otras frutas, como manzana, fresa y uva (Vicente *et al.*, 2009); (ii) una pequeña cantidad de sacarosa puede ser completamente hidrolizada por enzimas β -fructosidasa, durante la elaboración del smoothie y su procesado, a monosacáridos como la fructosa y la glucosa.

Tabla 28. Efecto de los tratamientos de conservación sobre el contenido nutricional de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

	Vida útil	Vitamina C Total (mg 100ml ⁻¹)	Fenoles Totales (mg GAE 100ml ⁻¹)	Sacarosa (g 100ml ⁻¹)	Glucosa (g 100ml ⁻¹)	Fructosa (g 100ml ⁻¹)
Control	0	19.1±1.8 ^x	84.8±5.6	<LoD	5.8±0.0	6.7±0.1
HPP	0	21.0±3.0 ^{a x}	86.4±6.2 ^{ab}	<LoD	5.6±0.2 ^b	6.5±0.1 ^b
TP	0	13.5±1.2 ^{a y}	75.7±5.5	<LoD	5.6±0.2 ^b	6.6±0.1
HPP	7	11.5±0.9 ^{b x}	82.8±5.9 ^{ab}	<LoD	5.9±0.2 ^a	6.4±0.2 ^b
TP	7	6.4±0.3 ^{bc y}	81.9±7.5	<LoD	6.0±0.1 ^a	6.6±0.0
HPP	14	6.8±0.7 ^{bc}	93.3±2.7 ^a	<LoD	6.0±0.2 ^a	6.7±0.2 ^{ab}
TP	14	6.8±0.9 ^b	96.1±1.4	<LoD	6.1±0.1 ^a	6.7±0.1
HPP	21	4.9±0.3 ^c	85.7±3.2 ^{ab}	<LoD	6.1±0.1 ^a	6.8±0.1 ^a
TP	21	3.4±0.3 ^{cd}	93.3±2.0	<LoD	6.1±0.2 ^a	6.7±0.2
HPP	28	2.8±0.0 ^{c x}	66.4±7.4 ^{b y}	<LoD	6.2±0.1 ^a	6.9±0.1 ^a
TP	28	1.3±0.2 ^{d y}	81.9±2.8 ^x	<LoD	6.2±0.1 ^a	6.9±0.2

HPP: (350 MPa/5 min/10 °C); TP: (85 °C/7 min).Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

4.3.8. Atributos sensoriales.

Los resultados del análisis sensorial se muestran en la **Tabla 29**. A diferencia de TP, HPP no tendría consecuencias negativas para la calidad global de los smoothies. No hubo diferencias significativas entre el control y los smoothies HPP para cualquier atributo sensorial en el día 0, mientras que el uso de TP condujo a cambios en el olor, flavor, apariencia y calidad general en el día 0.

Un aspecto relevante fue que el olor a fruta fresca (frescura) fue superior en el HPP, que en los smoothies TP, durante todo el período de almacenamiento, a pesar de que la intensidad de esa frescura disminuyó, en HPP, a partir de día 21. No se encontraron diferencias entre los smoothies HPP y TP para el olor y el flavor a fresa en cualquier tiempo de almacenamiento, mientras que, por el contrario, el olor y el flavor del plátano fue más alto en HPP, aunque las diferencias entre ellos desaparecieron con el tiempo. La contribución de otras frutas (manzana, naranja, mora, grosella, uva blanca y roja y lima) al sabor del smoothie no pudo ser apreciada por los evaluadores, con suficiente nitidez, para ser cuantificada. Otro aspecto relevante fue que los smoothies HPP estuvieron libres de malos olores y sabores desagradables asociados con el tratamiento de conservación, mientras que el TP desarrolló un olor y sabor persistente a fruta cocida, lo que explicaría su menor frescura. Por otra parte, los HPP fueron calificados como más ácidos que los TP, a partir de los 14 días.

HPP puede modificar reacciones enzimáticas y químicas, pudiendo favorecer la formación de compuestos asociados a cambios no deseados en el sabor (Oey *et al.*, 2008). La aplicación de presiones leves tiene pocas posibilidades de afectar a la estructura de pequeños compuestos moleculares del sabor. Por otra parte, si la temperatura durante los tratamientos de presurización es baja, se reduce el riesgo de alteración de compuestos de sabor. Hay disponibles algunos datos sobre el perfil de sabor de smoothies de frutas tratados por HPP. Keenan *et al.*, (2012a) no encontraron ninguna retención clara del olor y sabor de la fruta fresca en

smoothies HPP (450 MPa / 20 °C / 5 min) elaborados con manzana, zumo de manzana pasteurizado, naranja, plátano y fresa. El uso de zumo de manzana pasteurizado (29 %) como ingrediente podría explicar estos resultados. En otros productos de frutas, la aplicación de 200 a 600 MPa a temperatura ambiente no alteró el sabor del puré de fresa (Lambert *et al.*, 1999), zumo de mandarina (Takahashi *et al.*, 1993) o zumo de naranja-limón-zanahoria (Fernández-García *et al.*, 2001); mientras que, por el contrario, la aplicación de tratamientos más intensos HPP (500-800 MPa / 20 min / 20°C) modificaron el sabor del puré de fresa (Lambert *et al.*, 1999) y zumo de naranja (Fernández-García *et al.*, 2001). Lambert *et al.* (1999) informaron que HPP provocó la formación de nuevos compuestos volátiles. Del mismo modo, Zabetakis *et al.* (2000) encontraron cierta dependencia de la presión en la degradación de algunos compuestos volátiles que contribuyen al sabor a fresa.

El desarrollo del olor y sabor a fruta cocida sería la diferencia sensorial más relevante entre productos de frutas pasteurizados mediante el uso de calor o de alta presión (Parish, 1998; Polydera *et al.*, 2003). Muchos compuestos del sabor presentes en los zumos de frutas están sujetos a ser degradados por los tratamientos térmicos, lo que resulta en pérdidas significativas de los sabores frutales naturales y desarrollo de sabores de frutas cocinadas (Wang *et al.*, 2003). Por ejemplo, el escaldado por encima de 80 °C, en productos de arándano, provoca la pérdida de su sabor natural y algunos componentes nutricionales (Rossi *et al.*, 2003). Un estudio llevado a cabo con nariz electrónica en puré de fresa, llegó a la conclusión de que los cambios en

el perfil de volátiles fueron más intensos en el producto pasteurizado (80 °C / 5 min), que en el presurizado (600 MPa / temperatura ambiente / 5min) (Dalmadi *et al.*, 2007). En cualquier caso, el seguimiento de los cambios en el flavor en productos de frutas a través del perfil de volátiles tiene grandes dificultades debido a la complejidad en la composición del sabor, en particular, en smoothies, donde diferentes frutas están interactuando, siendo idóneos para realizar estudios mediante olfatometría. Por el contrario, el uso de QDA sería un primer paso para estudios adicionales realizados con los consumidores. El presente estudio ha confirmado que estos resultados pueden extrapolarse a los smoothies a base de frutos rojos, donde la ausencia de malos sabores sería una ventaja notable con respecto al tratamiento térmico.

Nuestros resultados muestran que el deterioro del sabor sería más pronunciado en los smoothies HPP, que en los TP, debido a dos razones: (i) los HPP tienen un olor más natural y flavor a fruta fresca y, por lo tanto, se puede apreciar más el deterioro durante el almacenamiento; (ii) las reacciones de oxidación catalizadas por enzimas oxidasas pueden haber contribuido a degradar compuestos del sabor, en los smoothies de frutos rojos.

El deterioro de la apariencia también puede limitar la vida útil del smoothie. El análisis QDA confirmó las diferencias observadas de color CIELab entre los tratamientos. El color del smoothie no fue afectado directamente por HPP, mientras que TP resultó en un ligero oscurecimiento de los smoothies durante todo el período de almacenamiento. Keenan *et al.* (2012a) encontraron una pérdida de color

más alta, durante el almacenamiento en los smoothies HPP, que en los TP, caracterizada por un color rosa-naranja. Coincidiendo con las mediciones ópticas, se apreció una mayor clarificación en los smoothies HPP durante el almacenamiento y, como consecuencia de esto, la turbidez fue inferior en el HPP que en los TP, a partir de 21 días. La clarificación también dio lugar a algunos cambios en los atributos de textura. Los smoothies HPP presentan una viscosidad menor que los TP en los días 14 y 21, pero no en el día 28, mientras que la arenosidad fue similar, en ambos tipos de smoothies, en el tiempo. Keenan *et al.* (2012a) no encontraron diferencias claras entre smoothies HPP y TP en la viscosidad, el tamaño del grano y en la separación, aunque la viscosidad disminuyó ligeramente al principio de la vida útil. La textura confirmó que la viscosidad disminuyó en los HPP conforme la clarificación incrementó. Las puntuaciones de viscosidad fueron coherentes con los valores absolutos medidos en los smoothies, a pesar de la dificultad que supone la evaluación sensorial de los cambios de textura en una matriz líquida.

De acuerdo con el panel entrenado, la calidad global de HPP fue superior o, al menos igual, que los presentados por los TP almacenados hasta 28 días. Los smoothies a base de frutos rojos pueden ser considerados como un producto bastante estable, desde el punto de vista sensorial. Dichos smoothies de frutos rojos tuvieron una alta capacidad antioxidante, que puede contribuir a reducir los efectos de las reacciones de oxidación en el color y el sabor. En otros estudios, las pérdidas de calidad sensorial global empezaron a ser apreciadas a los 30 días de almacenamiento en refrigeración en los smoothies HPP (450 MPa / 20°C /

5 min) (Keenan *et al.*, 2011) o a los 89 días de almacenamiento en refrigeración el zumo de naranja tratado con HPP (600 MPa / 40°C / 4 min) (Polydera *et al.*, 2005b). Sin embargo, los dos tratamientos anteriores implicaron riesgos sensoriales claros, para los productos a base de frutas, por las altas presiones y temperaturas utilizadas. En nuestro estudio, la pérdida de calidad sensorial global comenzó a ser relevante a los 21 días de almacenamiento en refrigeración y, por lo tanto, los smoothies a base de frutos rojos podrían ser ofrecidos a los consumidores como “recién hechos”, durante, al menos, 14 días.

Tabla 29. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

Vida útil		Olor					Flavor					
		Intensidad	Fresco	Plátano	Fresa	Cocido	Intensidad	Fresco	Cocido	Plátano	Fresa	Acido
Control	0	6.7±0.4	6.6±0.5 ^x	5.0±0.5 ^x	3.7±0.6	0.1±0.1 ^y	7.2±0.3	4.6±0.6	0.0±0.0 ^y	4.7±0.5 ^x	3.8±0.6	4.3±0.5
HPP	0	6.2±0.3	6.5±0.5 ^{a x}	5.2±0.4 ^{a x}	3.5±0.6	0.0±0.0 ^{b y}	7.2±0.3 ^a	4.5±0.6	0.0±0.0 ^y	4.4±0.5 ^{a xy}	4.2±0.7	4.4±0.5
TP	0	6.9±0.4	2.7±0.5 ^y	3.0±0.4 ^{a y}	3.0±0.5	4.8±0.5 ^x	6.9±0.4	3.9±0.3	4.7±0.5 ^x	2.8±0.4 ^{a y}	3.8±0.4	5.0±0.6
HPP	7	6.1±0.3	4.8±0.6 ^{ab x}	3.9±0.3 ^{ab x}	4.0±0.5	0.2±0.2 ^{ab y}	6.6±0.3 ^{ab}	4.1±0.4	0.1±0.1 ^y	3.6±0.4 ^{ab}	4.2±0.5	4.0±0.5
TP	7	7.1±0.4	2.1±0.3 ^y	2.6±0.3 ^{ab y}	3.4±0.5	4.8±0.5 ^x	7.1±0.3	3.3±0.2	4.1±0.6 ^x	2.7±0.4 ^a	3.9±0.4	5.2±0.5
HPP	14	6.0±0.4	4.7±0.5 ^{ab x}	3.3±0.3 ^{bc x}	4.1±0.5	0.5±0.2 ^{ab y}	6.5±0.2 ^{ab}	3.8±0.4	0.1±0.1 ^y	2.7±0.2 ^{bc x}	4.0±0.3	3.6±0.5 ^y
TP	14	6.4±0.4	1.9±0.3 ^y	2.2±0.3 ^{ab y}	3.1±0.5	5.0±0.3 ^x	6.7±0.3	3.2±0.3	4.2±0.5 ^x	1.7±0.2 ^{ab y}	3.4±0.2	5.1±0.4 ^x
HPP	21	6.0±0.4	3.9±0.4 ^{b x}	3.1±0.3 ^{bc x}	3.5±0.4	0.9±0.3 ^{a y}	6.0±0.2 ^b	3.0±0.4	0.3±0.1 ^y	2.1±0.2 ^c	3.8±0.3	3.2±0.4 ^y
TP	21	6.3±0.4	1.8±0.3 ^y	1.8±0.2 ^{b y}	3.3±0.5	4.7±0.5 ^x	6.3±0.3	3.1±0.3	4.1±0.5 ^x	1.6±0.2 ^{ab}	3.8±0.4	5.1±0.5 ^x
HPP	28	5.9±0.3	3.2±0.4 ^{b x}	2.1±0.3 ^c	3.5±0.5	0.7±0.3 ^{ab y}	5.9±0.2 ^b	3.0±0.4	0.4±0.2 ^y	1.8±0.2 ^c	3.5±0.3	3.2±0.5 ^y
TP	28	6.3±0.4	1.4±0.3 ^y	1.6±0.3 ^b	3.0±0.6	4.3±0.4 ^x	6.5±0.3	3.0±0.3	4.1±0.5 ^x	1.4±0.2 ^b	4.0±0.4	4.7±0.5 ^x

Tabla 29 (continuación). Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de frutos rojos almacenados 28 días a 4 °C.

Vida útil		Apariencia	Turbidez	Textura	Arenosidad	Calidad Global
		Pardeamiento		Viscosidad		
Control	0	7.4±0.3 ^x	8.3±0.5	4.3±0.5	2.9±0.5	8.4±0.2 ^x
HPP	0	7.6±0.2 ^x	8.4±0.4 ^a	4.4±0.5	3.3±0.5	8.6±0.2 ^{a x}
TP	0	4.8±0.3 ^y	8.6±0.6	5.0±0.6	3.5±0.5	6.7±0.3 ^{a y}
HPP	7	7.4±0.2 ^x	8.1±0.7 ^a	4.0±0.5	3.7±0.4	7.6±0.2 ^{ab x}
TP	7	5.0±0.2 ^y	8.3±0.6	5.2±0.5	3.7±0.5	6.5±0.2 ^{ab y}
HPP	14	7.0±0.1 ^x	7.3±0.6 ^a	3.6±0.5 ^y	3.3±0.4	7.0±0.3 ^{bc x}
TP	14	4.8±0.3 ^y	7.5±0.4	5.1±0.4 ^x	3.8±0.4	5.9±0.2 ^{bc y}
HPP	21	5.9±0.4 ^x	6.5±0.3 ^{ab y}	3.2±0.4 ^y	3.2±0.5	6.0±0.3 ^{cd}
TP	21	4.4±0.4 ^y	7.6±0.4 ^x	5.1±0.5 ^x	3.6±0.4	5.9±0.2 ^{bc}
HPP	28	6.9±0.3 ^x	5.2±0.3 ^{b y}	3.3±0.5	3.0±0.4	5.3±0.3 ^d
TP	28	5.2±0.3 ^y	7.2±0.5 ^x	4.7±0.5	3.1±0.5	5.6±0.1 ^c

HPP (350 / 10 °C/ 5 min); térmico (85 °C / 7 min). Media ± Error Standard.

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) P≤0.05. ^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) P≤0.05.

4.4. Ensayo IV: Vida comercial de los smoothies de verdura tratados por alta presión y calor.

Los consumidores exigen, cada vez más, alimentos mínimamente procesados, con alto valor nutricional (Oey *et al.*, 2008), libres de aditivos, sabor fresco, microbiológicamente seguros y con larga vida útil. Los zumos y smoothies han sido asociados a dietas saludables y naturales. La desventaja principal es la estabilización de smoothies durante su vida útil, ya que los homogeneizados son más susceptibles a ser oxidados que la fruta o verdura intacta, debido a diferentes mecanismos de deterioro, que implican microorganismos, enzimas y reacciones oxidativas. Se ha estudiado el efecto de las altas presiones en zumos de manzana, naranja o granada (Abid *et al.*, 2014; Polydera *et al.*, 2005a, 2005b; Varela-Santos *et al.*, 2012), en zumos de varias frutas (Butz *et al.*, 2003; Carbonell-Capella *et al.*, 2013), y en purés o smoothies de frutas (Keenan *et al.*, 2012a, 2012b; Marszalek *et al.*, 2015; Patras *et al.*, 2009). También se han aplicado altas presiones a trozos de repollo (Álvarez-Jubete *et al.*, 2014), porciones de nabo (Clariana *et al.*, 2011), porciones de calabaza (Zhou *et al.*, 2014), o trozos de judías verdes y brócoli (McInerney *et al.*, 2007). En zumos, purés o smoothies de diferentes verduras, por ejemplo zumo de zanahoria (Picouet *et al.*, 2015) o puré de calabaza (Contador *et al.*, 2014), hay poca información sobre el efecto de las altas presiones. El efecto de HPP sobre una verdura o fruta, no puede extrapolarse como comportamiento al resto de productos derivados de frutas o verduras, debido a las diferentes matrices que conforman el smoothie.

Los objetivos del estudio fueron comparar los efectos de un tratamiento HPP (350 MPa y 10 °C durante 5 min) y un tratamiento térmico equivalente (85°C durante 7 min) sobre la calidad y la estabilidad de smoothies elaborados a partir de diferentes verduras (zanahoria, calabacín, calabaza, puerro, entre otros ingredientes), almacenados en condiciones de venta al por menor. Se estudió la inactivación microbiológica y enzimática, retención de nutrientes y antioxidantes y calidad sensorial.

4.4.1. Calidad microbiológica.

En la **Tabla 30** se muestran los resultados microbiológicos para smoothies HPP y TP tras 28 días de almacenamiento. Los recuentos iniciales de HPP y TP fueron diferentes, significativamente, del smoothie control, que obtuvo niveles de 4.92, 4.10 y 3.58 log ufc g⁻¹ para bacterias aerobias mesófilas, psicrófilas y mohos y levaduras, respectivamente. Los resultados, tras el proceso de conservación, indicaron que ambos tratamientos fueron efectivos en la inactivación microbiana a día 0. Los valores microbiológicos se mantuvieron dentro de los límites requeridos por la Comisión Europea nº 2073 (2005) durante el almacenamiento. A lo largo de la vida útil se apreció un ligero aumento en bacterias mesófilas a partir del día 21 y, a partir del día 14, en bacterias psicrófilas y mohos y levaduras, siendo más evidente en los smoothies HPP. No hubo diferencias entre los tratamientos durante el almacenamiento, a excepción del día 14, donde los smoothies HPP tuvieron mayor carga de

microorganismos. Dichos valores disminuyeron posteriormente a niveles parecidos a los iniciales y, en algunos casos inferiores, incluso, al límite de detección ($L.D < 0.1 \log \text{ ufc g}^{-1}$). Aunque en menor medida, este hecho también ocurrió en el ensayo de smoothies de frutas (Ensayo II), donde las bacterias psicrófilas aumentaron y después disminuyeron.

La eficacia de HPP está demostrada en numerosos estudios de frutas tratados a 300-450 MPa/20 °C/1-15 min, como manzana, naranja, albaricoque y cereza (Bayindirli *et al.*, 2006), arándano (Barba *et al.*, 2013), granada (Varela-Santos *et al.*, 2012), puré de fresa (Marszalek *et al.*, 2015) o puré de manzana (Landl *et al.*, 2010), y en zumos de verduras (Pilavtepe-Celik, 2013), zanahoria (Kim *et al.*, 2001), calabaza (Zhou *et al.*, 2014) y pepino (Zhao *et al.*, 2013). La mayoría de los resultados de HPP sobre la destrucción de microorganismos hacen referencia a productos ácidos, frecuentemente zumos de frutas. El hecho de que el smoothie de verduras no sea un producto ácido, podría favorecer el desarrollo de bacterias y levaduras, que son los principales microorganismos responsables del deterioro del zumo (Parish y Higgins, 1989). Éstos producen CO_2 , malos olores y sabores y cambios en el color y estabilidad del zumo. Aunque la aplicación de 350 MPa/5 min/20 °C mantiene la seguridad microbiológica del producto, para un uso industrial y una comercialización que mantenga la calidad del smoothie, sería conveniente la aplicación de presiones mayores. Sin embargo, al aumentar la presión, las características sensoriales podrían verse comprometidas y, por tanto, en este caso, el smoothie HPP no tendría

ninguna ventaja sensorial frente al TP, aunque nutricionalmente podría ser superior.

Tabla 30. Efecto de los tratamientos de conservación sobre la calidad microbiológica de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

	Vida útil	B. Mesófilas	B. Psicrófilas	Mohos y Levaduras
Control	0	4.92±0.15 ^x	4.10±0.15 ^x	3.58±0.23 ^x
HPP	0	2.32±0.23 ^y	0.37±0.24 ^{b y}	0.23±0.15 ^{b y}
TP	0	1.93±0.19 ^y	0.15±0.10 ^{b y}	< L.D.
HPP	7	2.01±0.31	0.66±0.41 ^{ab}	0.76±0.45 ^b
TP	7	1.85±0.40	0.40±0.16 ^{ab}	0.12±0.12 ^b
HPP	14	3.46±0.41 ^x	2.23±0.79 ^{ab x}	2.41±0.42 ^{a x}
TP	14	1.75±0.46 ^y	0.92±0.11 ^{a y}	0.82±0.17 ^{a y}
HPP	21	3.62±0.62	1.20±0.07 ^{ab}	0.62±0.24 ^b
TP	21	2.47±0.05	0.56±0.33 ^{ab}	<L.D.
HPP	28	2.91±0.75	2.62±0.82 ^a	0.59±0.49 ^b
TP	28	1.19±0.69	0.78±0.13 ^{ab}	<L.D.

HPP: (350 MPa/5 min/10 °C); TP: (85 °C/7 min).Media ± Error Standard

^{xy} efecto del proceso (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

^{abcd} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

Unidades: Log ufc g⁻¹ ; LD < 0.1 log ufc g⁻¹ .

4.4.2. Actividad enzimática residual.

Los resultados de la actividad enzimática residual para Polifenoloxidasa (PPO), Peroxidasa (POD) y Pectin Metil Esterasa (PME), en el smoothie de verduras se muestran en la **Tabla 31**. Las altas presiones provocaron la activación del enzima PPO a día 0 y 7, aunque disminuyó a partir del día 14, hasta menos del 50 % de actividad en el día 28. En cambio, los smoothies TP presentaron menos del 50 % de actividad PPO en el día 0 y desapareció la actividad enzimática residual al final del almacenamiento (día 28). Para el enzima POD se observaron reducciones de un 20-30 % de la actividad en ambos tratamientos, llegando a ser dicha actividad inferior en los presurizados, que en los smoothies TP. Sin embargo, el enzima POD permaneció activo y constante durante el almacenamiento. El enzima PME, al igual que el enzima PPO, aumentó su actividad tras el tratamiento de presión y disminuyó durante el almacenamiento, aunque en el smoothie HPP tuvo mayor actividad, que en el smoothie TP, en todos los puntos de control. En los smoothies pasteurizados se produjo una inactivación de PME del 60 % tras el tratamiento (día 0). En cambio, durante el almacenamiento, no se observaron cambios en la actividad PME residual de los smoothies TP.

Los tratamientos HPP moderados podrían activar estos enzimas, debido a varios factores: (1) configuración reversible del enzima tras la inactivación, (2) cambios estructurales del enzima que favorecen la interacción enzima-sustrato (Anese *et al.*, 1995), como la liberación de un segundo centro activo y, (3) cambios en el sustrato o solvente que

favorezcan dicha interacción. En un zumo de zanahoria y en manzana, se produjo un aumento en la actividad PME tras aplicar presiones entre 500-600 MPa (Kim *et al.*, 2001) y 200-600 MPa/ 15-40 °C respectivamente (Barón *et al.*, 2006). En cambio, el tratamiento térmico en un zumo de zanahoria, consiguió una disminución de la actividad enzimática residual PME hasta el 28 %, tras aplicar un tratamiento corto de temperatura (105 °C/ 30 s) (Kim *et al.*, 2001).

También se ha observado un aumento en la actividad de POD, en un zumo de zanahoria, tras aplicar presiones de 350-500 MPa (Anese *et al.*, 1995). Sin embargo, en trozos de zanahoria se produjo un 50 % de inactivación de POD después de presurizar a 100-200 MPa a 20 °C durante 13 minutos (Van Buggenhout *et al.*, 2006). Para la inactivación enzimática de POD de calabacín se estudió la aplicación de varios tratamientos térmicos y se observó que se necesitaron temperaturas mayores a 85 °C/3 min para obtener una inactivación parcial (Neves *et al.*, 2012). Estos resultados podrían explicar la leve inactivación enzimática conseguida en nuestro ensayo para POD y, en menor medida, para PPO y PME, tras la pasteurización de los smoothies.

En cambio, el enzima PPO de zanahoria varió desde el 90 % de actividad, después de aplicar 300 MPa, al 10 % de actividad, tras presiones de 500 MPa (Kim *et al.*, 2001). Por otro lado, en un estudio de diferentes tratamientos de presión en calabaza (300, 600, 900 MPa/ 60, 70, 80 °C), se consiguió inactivar parcialmente PPO en todos los tratamientos, excepto 300 MPa/70 °C que provocó la activación del enzima (García-Parra *et al.*, 2014). Así mismo, PPO de manzana aumentó

un 50 % la actividad tras aplicar 450 MPa/25 °C/15 min (Bayindirly *et al.*, 2006). En cambio, un tratamiento térmico corto (105 °C/ 30 s) en un zumo de zanahoria, consiguió disminuir la actividad PPO residual hasta el 2 % (Kim *et al.*, 2001).

La alta actividad enzimática remanente favorece el deterioro del smoothie durante el almacenamiento, mediante el desarrollo de reacciones que promueven la aparición de sabores y olores desagradables, clarificación y cambios en el color propio del smoothie. En otros ensayos de smoothies (ensayo II y III) y en otros estudios de zumos de vegetales presurizados (Ludikhuyze *et al.*, 2003; McInerney *et al.*, 2007), se ha observado que el efecto del tratamiento depende, entre otros factores, de la matriz donde se aplica, en este caso, del tipo de verdura.

Tabla 31 Efecto de los tratamientos de conservación sobre la actividad enzimática de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

	Vida útil	PPO (%)	POD (%)	PME (u PME g ⁻¹)
Control	0	100.0±6.9 ^{xy}	100.1±1.7 ^x	0.26±0.03 ^{xy}
HPP	0	171.5±36.9 ^{a x}	86.7±4.1 ^{a y}	0.47±0.10 ^{a x}
TP	0	41.9±11.2 ^{a.y}	88.1±0.8 ^y	0.11±0.02 ^y
HPP	7	114.5±36.6 ^{ab x}	76.9 ±1.9 ^{ab y}	0.32±0.05 ^{ab x}
TP	7	33.7±16.1 ^{a y}	87.1±2.9 ^x	0.08±0.02 ^y
HPP	14	61.7±25.4 ^{b x}	80.1±2.4 ^{ab}	0.28±0.03 ^{ab x}
TP	14	16.7±7.6 ^{ab y}	85.0±3.4	0.11±0.01 ^y
HPP	21	48.2±18.9 ^{b x}	80.2±3.1 ^{ab}	0.26±0.03 ^{ab x}
TP	21	0.0±0.0 ^{b y}	88.1±3.6	0.10±0.01 ^y
HPP	28	46.6±18.4 ^{b x}	74.0±1.6 ^{b y}	0.19±0.02 ^{b x}
TP	28	0.0±0.0 ^{b y}	88.5±4.7 ^x	0.08±0.03 ^y

HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Media ± Error Standard.

Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.4.3. Características físico-químicas.

Los resultados obtenidos para valores de acidez y parámetros de color se muestran en la **Tabla 32**. La acidez aumentó ligeramente en los smoothies presurizados. Es por esto que, además tuvieron un pH más bajo, que los smoothies TP, los cuales no observaron cambios. Estos resultados se han obtenido en otros ensayos de vida útil de frutas (ensayo II y III) y en otros estudios como, por ejemplo, zumo de

granada (Varela-Santos *et al.*, 2012). Es posible que el desarrollo de algunas bacterias y/o reacciones químicas, durante la vida útil, provoquen la acidificación del producto.

Respecto al color, el parámetro L^* se vio afectado por el tratamiento a presión, siendo ligeramente superior al smoothie control y TP, aunque durante el almacenamiento dicho valor no varió. No se observaron diferencias durante la vida útil en las coordenadas a^* y b^* para los presurizados. Sin embargo, en los TP, se produjo una disminución del valor b^* conforme aumentó el tiempo de almacenamiento y, en consecuencia, cambios en los parámetros Hue y Chroma tras la pasteurización. Hue y Chroma disminuyeron durante el almacenamiento en los smoothies TP, debido a la aparición de una tonalidad diferente en el color y una disminución de la saturación del color, lo que supuso un oscurecimiento del tono. En general, los smoothies pasteurizados presentaron un color diferente y más oscuro con respecto a HPP y control. Por otro lado, HPP retuvo mejor el color, los cambios fueron menos evidentes, y así lo confirmó el índice de pardeamiento.

En un estudio realizado en calabaza (Zhou *et al.*, 2014), los parámetros a^* y b^* disminuyeron en ambos tratamientos, HPP (450 MPa/20 °C/15 min) y TP (85 °C/5 min), aunque los presurizados obtuvieron mayor L^* que los pasteurizados. El zumo de pepino presurizado a 400 MPa/4 min (Zhao *et al.*, 2013), el puré de tomate a 400 MPa/25 °C/15 min (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006) y una bebida de vegetales tras 400 MPa/2-9 min (Barba *et al.*, 2010) también obtuvieron mayor L^* , coincidiendo estos resultados con los smoothies de verduras.

Los cambios estructurales que tienen lugar en el smoothie, provocados, en parte, por cambios microbiológicos o enzimáticos, pueden resultar en pérdida de la estabilidad de la nube turbia y, al clarificar, dar lugar a zumos con mayor L^* , más luminosos, como en los smoothies de verduras presurizados.

Por otra parte, los pasteurizados mostraron una disminución del parámetro b^* . Es por esto que Hue y Croma disminuyeron durante el almacenamiento. Esta pérdida de color, por parte de los pasteurizados, pudo ser debida al efecto de la temperatura sobre la degradación de pigmentos como carotenoides o clorofilas, al pardeamiento enzimático o no enzimático y al desarrollo de microorganismos que deterioran el smoothie (Oey *et al.*, 2008; Sadilova *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013). En cambio, en un smoothie de frutas (Keenan *et al.*, 2012b), en porciones de nabo (Clariana *et al.*, 2011) y en trozos de repollo (Alvarez-Jubete *et al.*, 2014), TP tuvo menos diferencias de color comparado con el control que los presurizados a 400-450 MPa/20 °C/5 min.

Se ha observado, en general, que presiones moderadas a baja temperatura no afectan a los pigmentos responsables del color, y que HPP retiene mejor el color, como por ejemplo, en puré de calabaza tras 400-600 MPa (Contador *et al.*, 2014), en trozos de pepino a 400 MPa/4 min (Zhao *et al.*, 2013) o puré de zanahoria a 600 Mpa/20 °C/15 min (Patras *et al.*, 2009).

Los resultados para los parámetros físico-químicos relacionados con la estabilidad de la nube turbia se muestran en la **Tabla 33**. Para

densidad y sólidos solubles no se encontraron diferencias, sólo pequeñas variaciones en la densidad durante el almacenamiento, lo cual pudo ser debido a mínimas diferencias en la medida o entre los lotes. En los sólidos insolubles se apreciaron cambios en el contenido durante la vida útil. Se obtuvo mayor contenido en sólidos insolubles en los smoothies presurizados y éstos aumentaron durante el almacenamiento.

Los parámetros de transmitancia y turbidez fueron parecidos al smoothie control en el día 0, aunque durante el almacenamiento se produjeron cambios en la estabilidad de los smoothies. Los valores de transmitancia aumentaron y la turbidez disminuyó para ambos tratamientos, indicando la clarificación de los smoothies. Sin embargo, los smoothies HPP mostraron una clarificación más temprana, que los TP, ya que la pérdida de la estabilidad de la nube turbia, en los smoothies HPP, fue evidente transcurridos siete días. En cambio, los smoothies TP necesitaron veintiún días para apreciar los cambios en la pérdida de turbidez. Para los mismos resultados de transmitancia, en los HPP y TP, los smoothies presentaron distintos valores de turbidez, tal vez debido a las diferencias en la estabilidad entre los dos lotes de smoothies analizados. Esto parece indicar diferencias en la elaboración del smoothie, probablemente al añadir la pectina, lo que significa mayores desviaciones entre los lotes y una mayor dificultad para apreciar una tendencia en el comportamiento. La alta desviación hace que, a pesar de las aparentes diferencias, éstas no sean significativas entre los tratamientos durante el almacenamiento.

La viscosidad fue mayor y se mantuvo estable en los smoothies TP, mientras que los presurizados pierden viscosidad a partir del día catorce. Las diferencias en la viscosidad no se asociaron con cambios en el contenido de sólidos solubles totales, como también indicaron otros estudios en naranja (600 MPa/20 °C/1 min) (Bull *et al.*, 2004), zumo de manzana (350 MPa/0 °C/10 min) (Abid *et al.*, 2014) y en arándano (400 MPa/20 °C/5 min) (Barba *et al.*, 2013). La pérdida de viscosidad en los zumos turbios se puede atribuir, tanto a la degradación de la pectina por acción de la PME, como a mecanismos no enzimáticos (Sila *et al.*, 2009). Como se ha ido observando, PME hidroliza ésteres metílicos de ácido galacturónico, generando pectina de bajo metoxilo que puede reaccionar con los iones Ca^{+2} presentes en el medio, para formar pectato de calcio y otros compuestos insolubles en agua, que precipitan y supone la pérdida gradual de turbidez en los zumos (Wicker *et al.*, 2003). Podría ser también degradada cierta cantidad de pulpa por otros enzimas presentes en los smoothies, tales como poligalacturonasa, capaz de hidrolizar pectina de bajo metoxilo, que, al igual que PME, no habría sido inactivado mediante el tratamiento HPP (Eisenmenger *et al.*, 2009; Van Buggenhout *et al.*, 2009). La medida de viscosidad indicó una mayor degradación y tendencia a la clarificación en los smoothies HPP. Además, la sacarosa, con un peso molecular más alto que glucosa o fructosa, aporta mayor viscosidad que otros azúcares en la misma concentración (Chirife y Buera, 1997), lo que justificaría nuestros resultados para TP. Por otro lado, en una bebida de varios vegetales (tomate, pimiento verde, perejil, cebolla, zanahoria, limón y aceite), no se encontraron cambios en la viscosidad tras ser tratado a diferentes presiones y tiempos (100, 200,

300, 400 MPa/ 2-9 min) comparado con un tratamiento térmico (90-98 °C/ 15-21 s) (Barba *et al.*, 2010).

El hecho que el enzima PME no se encuentre inactivado y que un 20 % de la composición del smoothie sea pectina al 1 %, favorece la clarificación del mismo. Además, el smoothie está elaborado con verduras ricas en pectina, como la manzana o la zanahoria, que contiene un 1 % de pectina (Massiot *et al.*, 1987). Con el fin de mejorar la estabilidad de los zumos turbios durante periodos prolongados, Liang *et al.* (2004) estudiaron la adición de agentes espesantes, goma guar, goma xantana y carboximetilcelulosa, los cuales se emplean habitualmente en la industria alimentaria. Todos proporcionan viscosidad y estabilidad en una solución acuosa. La pectina añadida al smoothie de verduras para proporcionar turbidez al mismo, podría ser sustituida por algún otro agente espesante que proporcione estabilidad, a pesar de que los enzimas pécticos no estén inactivados.

Tabla 32. Efecto de los tratamientos de conservación sobre características físico-químicas y parámetros de color de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

	Vida útil	pH	Acidez Total (g ac.Cítrico 100ml ⁻¹)	L* (CIELab)	Hue (CIELab)	Chroma (CIELab)	Índice de pardeamiento (Abs.420nm)
Control	0	5.0±0.0 ^x	0.12±0.01	33.9±0.1 ^y	75.9±0.1 ^x	17.6±0.5	0.08±0.0
HPP	0	4.9±0.0 ^y	0.12±0.01 ^{ab}	34.5±0.1 ^x	75.3±0.4 ^x	17.3±0.6	0.07±0.0 ^{ab}
TP	0	5.0±0.0 ^x	0.11±0.00	33.7±0.2 ^y	73.2±0.3 ^{a y}	15.9±1.0 ^a	0.08±0.0 ^c
HPP	7	4.9±0.0 ^y	0.12±0.00 ^b	34.0±0.3	74.8±0.2 ^x	17.9±0.3 ^x	0.07±0.0 ^{ab}
TP	7	5.0±0.0 ^x	0.11±0.00	33.9±0.1	71.2±0.4 ^{ab y}	15.5±0.5 ^{ab y}	0.08±0.0 ^{bc}
HPP	14	4.9±0.0	0.13±0.01 ^{ab x}	34.2±0.3	72.8±2.5	16.5±1.4	0.07±0.0 ^{b y}
TP	14	5.0±0.0	0.12±0.00 ^y	33.8±0.3	69.8±0.6 ^{bc}	13.9±0.5 ^{bc}	0.09±0.0 ^{abc x}
HPP	21	4.9±0.0	0.13±0.00 ^{ab x}	33.9±0.7	75.4±1.3 ^x	16.8±1.1 ^x	0.08±0.0 ^{a y}
TP	21	4.9±0.0	0.11±0.00 ^y	33.8±0.1	68.5±1.3 ^{c y}	13.3±0.4 ^{c y}	0.10±0.0 ^{ab x}
HPP	28	4.9±0.0 ^y	0.13±0.00 ^a	34.5±0.1 ^x	74.0±0.7 ^x	16.9±0.5 ^x	0.08±0.0 ^{ab}
TP	28	5.0±0.0 ^x	0.12±0.00	34.0±0.1 ^y	66.1±0.4 ^{c y}	12.4±0.2 ^{c y}	0.10±0.0 ^a

HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Media ± Error Standard. Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$. ^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

Tabla 33. Efecto de los tratamientos de conservación sobre características relacionadas con la clarificación de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

	Vida útil	Densidad (g ml ⁻¹)	Sólidos solubles (°Brix)	Sólidos insolubles (g 100g ⁻¹)	Transmitancia (%)	Turbididez (NTU)	Viscosidad Absoluta (cP)
Control	0	1.03±0.00	6.8±0.0	9.6±1.1	0.3±0.0 ^{xy}	2843±148 ^{xy}	1.61±0.21
HPP	0	1.03±0.00	6.9±0.0	9.7±1.3 ^c	0.5±0.1 ^{b x}	2541±308 ^{a y}	1.55±0.19 ^a
TP	0	1.02±0.00 ^b	6.8±0.0	9.9±1.9	0.3±0.0 ^{b y}	2985±120 ^{a x}	1.63±0.21 ^a
HPP	7	1.02±0.00 ^y	6.9±0.1	16.7±2.0 ^b	47.8±21.3 ^a	1546±687 ^b	1.64±0.24 ^a
TP	7	1.03±0.00 ^{a x}	6.8±0.1	14.5±4.7	4.4±2.1 ^b	1084±225 ^b	1.64±0.21 ^a
HPP	14	1.02±0.00	6.9±0.0	23.7±0.7 ^{a x}	48.6±21.6 ^{a x}	1548±689 ^b	1.11±0.05 ^{b y}
TP	14	1.03±0.00 ^{ab}	6.9±0.0	13.9±4.0 ^y	5.7±2.7 ^{b y}	915.0±150 ^b	1.53±0.23 ^{b x}
HPP	21	1.03±0.00 ^x	6.8±0.0	17.7±2.4 ^{ab}	48.3±21.5 ^a	1450±645 ^b	1.10±0.03 ^{b y}
TP	21	1.03±0.00 ^{ab y}	6.8±0.0	9.87±2.5	16.2±5.7 ^{ab}	653±114 ^{bc}	1.51±0.20 ^{b x}
HPP	28	1.03±0.00 ^y	6.8±0.0	24.4±1.1 ^{a x}	47.8±21.3 ^{a x}	1576±701 ^b	1.10±0.03 ^{b y}
TP	28	1.03±0.00 ^{a.x}	6.9±0.0	13.5±4.0 ^y	47.0±20.7 ^{a y}	299±133 ^c	1.57±0.22 ^{ab x}

HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Media ± Error Standard. Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.4.4. Contenido nutricional.

El contenido en vitamina C total fue pequeño, 4.27, 3.07 y 2.34 mg 100ml⁻¹ en el control, HPP y TP, respectivamente. Estos resultados son normales, puesto que el smoothie está elaborado con verduras que aportan poco contenido en vitamina C. Por ejemplo, el calabacín tiene 20 mg 100g⁻¹, la calabaza 12 mg 100g⁻¹ o la zanahoria 7 mg 100g⁻¹ de Vitamina C (BEDCA). En el contenido total de Vitamina C, no hubo diferencias entre los tratamientos, con respecto al control, en el día 0. En cambio, durante el almacenamiento, se produjo una mayor degradación de la vitamina en el smoothie pasteurizado, llegando a ser inferior al límite de detección, a partir del día 21. El hecho de que las verduras utilizadas en la elaboración de este smoothie no contengan una cantidad alta de esta vitamina y que el proceso y almacenamiento favorezcan su degradación, hace que el contenido sea pequeño y que, como ha sucedido en otros ensayos (Ensayo II y III) y estudios (Landl et al., 2010), el ácido ascórbico (<0.5mg 100ml⁻¹) se encuentre en su forma oxidada, es decir, como ácido dehidroascórbico. Además, la vitamina C es un antioxidante bastante lábil, por lo que parece ser el más afectado y propenso a la degradación durante el procesado y almacenamiento. Por esto podría ser un indicador de la calidad de todos los antioxidantes presentes en el producto (Esteve y Frígola, 2007; Kalt, 2005).

Se ha observado que HPP retiene mejor el contenido en vitamina C, que el tratamiento térmico. Ejemplos de esto lo encontramos en zumo de naranja tratado a 300 MPa/ 20 °C y 500 MPa/35 °C/5 min (Velazquez-Estrada *et al.*, 2012; Polydera *et al.*, 2003, 2005b), en puré de fresa a

300 MPa/1, 5, 15 min y 400 MPa/20 °C/15 min (Marszalek *et al.*, 2015; Patras *et al.*, 2009) y en calabaza tratada a 450 MPa/ 20 °C/ 15 min (Zhou *et al.*, 2014). Nuestros resultados fueron coherentes con estos estudios. El tratamiento mediante HPP supone una extensión de la vida útil, con respecto al pasteurizado, en derivados de frutas y verduras con moderado contenido en vitamina C.

El contenido en fenoles y flavonoides fue alrededor de 10 mg GAE 100ml⁻¹ y 1-1.5 mg QE 100⁻¹ respectivamente, para ambos tratamientos durante todo el almacenamiento. El contenido total en compuestos fenólicos y flavonoides fue bajo comparado con otros smoothies de frutas o frutos rojos, con mayor capacidad antioxidante. Durante el almacenamiento no se produjeron cambios, posiblemente debido a la acción protectora de la vitamina C frente a la oxidación de los fenoles. Algunos estudios indicaron una mayor retención del contenido fenólico en los presurizados, que en los pasteurizados. Por ejemplo, en calabaza tratada a 400 MPa/20 °C/15 min (Contador *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2014), en smoothies de frutas tras 450 MPa/20 °C/1, 3, 5 min (Keenan *et al.*, 2010, 2012b) o en zumo de zanahoria, aumentó el contenido tras HPP (350 MPa/20 °C/10 min) y disminuyó considerablemente tras el tratamiento térmico (100 °C/ 4 min) (Jabbar *et al.*, 2014). Sin embargo, el contenido en fenoles disminuyó en mayor medida en nabo tratado a 400 MPa/20 °C/5 min que en el escaldado (90 °C/ 3 min) (Clariana *et al.*, 2011). Los flavonoides se mantuvieron iguales en el pasteurizado, que en el presurizado en zumo de manzana (300 MPa/4 °C) (Suarez-Jacobo *et al.*, 2011). Las pérdidas fenólicas debido al tratamiento térmico podrían

ser causadas por la degradación química de fenoles, siendo las pérdidas dependientes del tipo de vegetal e intensidad del tratamiento (Roy *et al.*, 2007).

La capacidad antioxidante también fue baja, ya que la respuesta en el método FRAP fue entre 40 - 30 $\mu\text{mol Fe}^{2+} 100\text{ml}^{-1}$, mientras que los resultados para DPPH estuvieron por debajo del límite de detección. Estos resultados fueron coherentes con el bajo contenido en antioxidantes. A pesar de que numerosos estudios indican una mayor capacidad antioxidante en los derivados de frutas y verduras presurizados, los resultados obtenidos para FRAP en el smoothie de verduras fueron mayores ($p < 0.05$) para los smoothies TP. Esto puede ser debido a la mayor inactivación enzimática que tiene lugar en los pasteurizados, frente a los presurizados. Para ambos tratamientos, la capacidad y status antioxidante fue bajo, a pesar de que ingredientes del smoothie de verduras, como la calabaza, tienen una actividad antioxidante de 381.39 ± 4.71 y 3102 ± 17 equivalente de Trolox $\mu\text{mol } 100\text{g}^{-1}$ para el FRAP y DPPH, respectivamente (Zhou *et al.*, 2014). En cambio, los valores de FRAP para otros ingredientes del smoothie fueron $27 \pm 4 \mu\text{mol Fe}^{2+} 100\text{g}^{-1}$ para zanahoria y $121 \pm 29 \mu\text{mol Fe}^{2+} 100\text{g}^{-1}$ para manzana (Araya *et al.*, 2006). No son valores muy elevados y la proporción que aportan al smoothie es pequeña, un 20 % zanahoria, 20 % manzana, y un 15 % calabaza. Por otro lado, además del tratamiento de conservación y almacenamiento, hay pretratamientos que influyen en el contenido de antioxidantes. En este caso, el smoothie de verduras fue elaborado con puerro y zanahoria previamente escaldados. En zanahoria cocida se

produjo una disminución del 45 % en el contenido de FRAP ($15 \pm 4 \text{ Fe}^{2+} 100\text{g}^{-1}$) (Araya *et al.*, 2006), respecto al producto en crudo.

El contenido total de azúcar (**Figura 17**) fue acorde con el resultado en sólidos solubles. Los niveles de sacarosa fueron mayores en el smoothie TP y se mantuvieron estables durante el almacenamiento. En cambio, la sacarosa en los presurizados se hidrolizó a glucosa y fructosa, llegando a estar por debajo del límite de detección, a partir del día 7. Este mismo hecho se ha observado en otros ensayos de smoothies de frutas (ensayo I, II y III) y en estudios de zumos de frutas (Butz *et al.*, 2003), donde la enzima β -fructofuranosidasa no se encontró inactivada en los productos de frutas, de manera que hidrolizó la sacarosa, llegando ésta a desaparecer. En cambio, en los smoothies TP, la hidrolasa se inactivó por el tratamiento térmico y por eso mantuvo los niveles de sacarosa.

Tabla 34. Efecto de los tratamientos de conservación en el contenido de vitamina C y otros antioxidantes de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

Vida útil		Vitamina C (mg 100ml ⁻¹)	Fenoles (mg GAE 100ml ⁻¹)	Flavonoides (mg QE 100ml ⁻¹)	FRAP (μmol Fe2+ 100ml ⁻¹)
Control	0	4.3±1.2	12.1±1.3	1.2±1.2	35.8±3.6 ^{xy}
HPP	0	3.1±1.2 ^a	10.9±1.2	1.3±0.2	31.7±3.2 ^y
TP	0	2.3±0.3 ^a	9.0±1.2	1.6±0.2	43.0±1.6 ^x
HPP	7	1.5±0.4 ^{ab x}	12.8±2.6	1.4±0.3	31.4±1.0 ^y
TP	7	0.5±0.2 ^{b.y}	11.2±0.9	1.5±0.1	39.6±1.3 ^x
HPP	14	1.1±0.3 ^{b x}	10.4±0.9	1.4±0.1	31.7±1.4 ^y
TP	14	0.5±0.2 ^{b y}	10.2±1.1	1.5±0.2	39.6±3.1 ^x
HPP	21	0.7±0.2 ^{b x}	12.0±2.2	1.3±0.1	29.1±2.4 ^y
TP	21	0.1±0.1 ^{b y}	11.0±1.5	1.7±0.3	36.3±3.2 ^x
HPP	28	0.2±0.0 ^{b x}	11.4±0.6	1.1±0.1 ^y	29.5±3.4 ^y
TP	28	0.0±0.0 ^{b y}	10.3±0.7	1.8±0.2 ^x	37.0±3.0 ^x

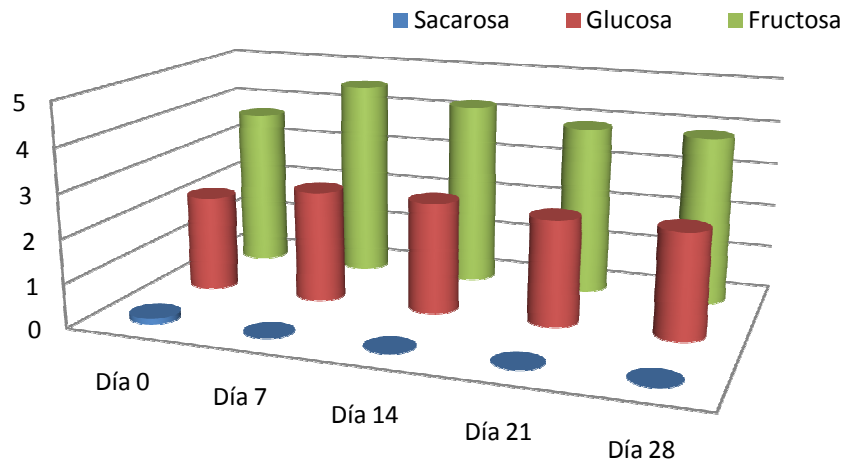
HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Media ± Error Standard.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para P≤0.05.

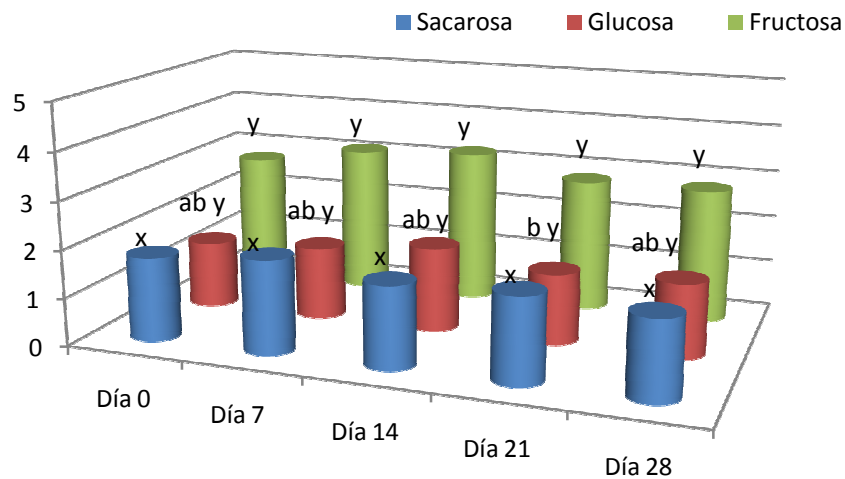
^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para P≤0.05.

Figura 17. Contenido en sacarosa, glucosa y fructosa en smoothies de verduras HPP (i) y TP (ii) durante 28 días de almacenamiento a 4°C.

i) Contenido de azúcar en smoothies HPP (g 100ml⁻¹)



ii) Contenido de azúcar en smoothies TP (g 100ml⁻¹)



HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

4.4.5. Atributos sensoriales.

Los resultados para el análisis sensorial realizado en smoothies de verduras se muestran en la **Tabla 35**. La descripción de los parámetros evaluados se encuentra en la Tabla 10. No se han encontrado grandes cambios en el olor en ambos tipos de smoothies, HPP y TP. La intensidad del olor y el olor a calabaza en el día 0, fue ligeramente superior en el HPP, que en el TP ($P>0.05$). El olor característico a cucurbitáceas (Green melón) fue parecido en los smoothies presurizados (2.3) al smoothie control (2.4) en el día 0 y, aunque disminuyó durante la vida útil para ambos tratamientos, fue puntuado superior en el smoothie HPP (0.8), que en el TP (0.2), al final de la vida útil. De la misma manera, para el olor a cocinado, el HPP (1.3) mantuvo niveles parecidos al control (0.8) y al TP (2.1). En cambio, el smoothie TP presentó mayor olor a cocinado durante los días 0, 7 y 14 (2.1-2.9).

En el momento de la compra, el consumidor relaciona la apariencia con aspectos de frescura y, por tanto, la apariencia es considerada uno de los atributos de calidad más críticos (Kasim y Kasim, 2014). El color y apariencia fue puntuado mejor en los HPP. Durante el almacenamiento, el color naranja fue superior en los HPP, mientras que los TP mostraron un aumento del pardeamiento, de 3.2 en el día 0, a 5.5 en el día 28, aunque no hubo diferencias significativas con los HPP ($P>0.05$). Estos resultados fueron análogos con los datos de color instrumental, ya que mostraron mejores retenciones de color en los smoothies HPP. La presencia de pequeñas partículas en el smoothie fue parecida en el HPP y control. Por el contrario, el contenido de partículas en el smoothie tratado

térmicamente fue inferior al control y HPP. Esto fue confirmado por el atributo de textura, donde hubo diferencias significativas en la arenosidad, ya que fue inferior para TP durante el almacenamiento. La mayor sensación de arenosidad en los HPP podría ser debido a una mayor clarificación, ya que tienen activos los enzimas pécticos y pueden dar lugar a productos con una mayor cantidad de partículas que, al estar degradadas, proporcionen una mayor sensación de arenosidad.

Un objetivo importante en el procesado de vegetales frescos es mantener los atributos de sabor y olor del producto entero original (Wasim *et al.*, 2011). En el flavor no hubo diferencias entre los tratamientos, ni durante el almacenamiento, excepto en el sabor a zanahoria y manzana. Las pequeñas diferencias entre los tratamientos, en el sabor a zanahoria, fueron debidas al sabor fresco atribuido a los HPP. El sabor a manzana se describió como el sabor a cocido del zumo y fue superior en los TP, como era de esperar, tras los resultados obtenidos. Respecto a la calidad global, fue puntuada de manera parecida y no hubo diferencias entre los tratamientos, si bien, se apreciaba una disminución de la calidad en los HPP durante el almacenamiento.

Es conocido que el sabor fresco en frutas y verduras no se altera por HPP, ya que la estructura de las moléculas pequeñas responsables del sabor no se ven afectadas por la presión (Oey *et al.*, 2008). En dos tipos de productos vegetales, calabaza y brócoli, y otro producto de calabacín, berenjena, espinaca y acelga, HPP no tuvo efectos sobre las características sensoriales tras presurizar a 400 MPa/ 1-5 min (Masegosa *et al.*, 2014). En el estudio realizado por Houska *et al.* (2006) no se

encontraron diferencias sensoriales en un zumo de brócoli y manzana, almacenado hasta 70 días, tras presurizar a 500 MPa/10 min y un zumo que se mantuvo congelado. Sin embargo, HPP puede favorecer el desarrollo de reacciones químicas y enzimáticas responsables de la aparición de sabores y olores desagradables. El impacto del tratamiento sobre las características sensoriales depende del tipo de vegetal, presión y tiempo aplicado y temperatura del almacenamiento.

Tabla 35. Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

	Vida útil	Olor				Flavor						
		Intensidad	Calabaza	Melón verde	Cocido	Intensidad	Dulce	Amargo	Zanahoria	Puerro	Manzana	Retrogusto
Control	0	5.8±0.4	3.3±0.5	2.4±0.3 ^x	0.8±0.3 ^y	6.1±0.2	3.3±0.3	1.9±0.4	2.3±0.3 ^x	2.4±0.3	0.6±0.2 ^y	1.9±0.4
HPP	0	5.6±0.3	3.2±0.5	2.3±0.3 ^{ab xy}	1.3±0.3 ^{xy}	6.1±0.3	3.2±0.3	1.6±0.4	1.9±0.3 ^{xy}	2.2±0.3	0.8±0.3 ^y	1.7±0.4
TP	0	5.3±0.3	2.7±0.4	1.3±0.3 ^{a y}	2.1±0.2 ^x	6.0±0.2	2.9±0.4	1.6±0.2	1.0±0.2 ^y	1.7±0.2	2.0±0.2 ^x	1.6±0.3
HPP	7	5.6±0.4	3.5±0.3 ^x	2.6±0.5 ^{a x}	1.0±0.3 ^y	5.9±0.3	3.0±0.4	1.6±0.5	2.2±0.3 ^x	2.8±0.4	0.6±0.3 ^y	2.0±0.5
TP	7	5.2±0.4	2.1±0.4 ^y	0.7±0.2 ^{ab y}	2.9±0.4 ^x	6.0±0.3	3.1±0.3	1.2±0.3	0.9±0.2 ^y	2.2±0.3	1.7±0.3 ^x	1.6±0.4
HPP	14	5.7±0.3	3.5±0.4	1.5±0.2 ^{ab x}	1.1±0.3 ^y	5.4±0.3	2.7±0.3	2.0±0.4	1.5±0.2	2.2±0.4	0.6±0.2 ^y	2.0±0.5
TP	14	5.5±0.3	2.7±0.5	0.6±0.2 ^{ab y}	2.7±0.4 ^x	6.0±0.2	2.9±0.2	1.4±0.3	1.1±0.3	1.9±0.3	1.4±0.2 ^x	1.6±0.4
HPP	21	5.3±0.3	2.8±0.5	1.0±0.3 ^b	1.2±0.4	5.5±0.3	2.4±0.4	1.9±0.4	1.4±0.2	2.3±0.3	0.5±0.2	1.9±0.5
TP	21	5.4±0.4	2.1±0.6	0.3±0.1 ^b	2.2±0.3	5.6±0.2	2.9±0.3	1.3±0.3	0.8±0.3	1.9±0.3	1.0±0.3	1.4±0.3
HPP	28	4.8±0.6	2.7±0.7	0.8±0.4 ^b	0.8±0.5	5.3±0.4	2.5±0.6	2.2±0.7	1.6±0.3	2.4±0.5	0.5±0.2	2.4±0.7
TP	28	5.3±0.6	2.0±0.8	0.2±0.1 ^b	2.1±0.3	5.8±0.2	2.8±0.5	1.3±0.5	0.5±0.3	1.6±0.6	0.9±0.4	2.2±0.4

Tabla 35 (continuación). Efecto de los tratamientos de conservación sobre las características sensoriales de los smoothies de verdura almacenados 28 días a 4°C.

Vida útil		Apariencia			Textura		Calidad Global
		Color Naranja	Color Pardo	Partículas	Viscosidad	Arenosidad	
Control	0	6.0±0.3	2.6±0.5	2.2±0.6 ^x	3.2±0.4	1.2±0.4	5.7±0.4
HPP	0	5.2±0.4	4.0±0.6	3.0±0.8 ^x	2.8±0.4	1.3±0.4	6.0±0.2 ^a
TP	0	5.8±0.3 ^a	3.2±0.5 ^c	0.4±0.1 ^y	2.8±0.4	0.4±0.2	5.3±0.3
HPP	7	5.0±0.4	4.0±0.6	3.9±0.8 ^x	3.3±0.4	2.2±0.6 ^x	5.1±0.4 ^{ab}
TP	7	4.8±0.4 ^{ab}	4.2±0.4 ^{bc}	1.0±0.4 ^y	2.7±0.4	0.5±0.2 ^y	5.0±0.3
HPP	14	4.2±0.3	4.4±0.5	3.7±0.8 ^x	2.5±0.3	2.5±0.5 ^x	5.0±0.3 ^{ab}
TP	14	3.7±0.4 ^{bc}	5.3±0.4 ^{ab}	1.0±0.3 ^y	2.5±0.4	0.7±0.2 ^y	4.9±0.3
HPP	21	4.1±0.2	5.2±0.5	3.7±0.7	2.5±0.3	2.3±0.5 ^x	4.5±0.3 ^b
TP	21	3.2±0.4 ^c	5.9±0.4 ^a	2.0±0.7	2.4±0.4	0.5±0.3 ^y	4.7±0.4
HPP	28	3.8±0.4	5.1±0.6	3.7±0.8 ^x	3.1±0.6	3.3±0.8 ^x	4.4±0.5 ^b
TP	28	3.4±0.5 ^{bc}	5.5±0.4 ^{ab}	0.2±0.2 ^y	2.1±0.5	0.5±0.3 ^y	4.6±0.5

HPP (350 / 10 °C / 5 min); TP (85 °C / 7 min). Medidas con diferentes superíndices son diferentes para $P \leq 0.05$.

^{abc} efecto del tiempo de almacenamiento (mismo tratamiento) para $P \leq 0.05$.

^{xy} efecto del tratamiento (mismo tiempo de almacenamiento) para $P \leq 0.05$.

5. Conclusiones.

Primera. Para conseguir un adecuado grado de inhibición microbiológica durante la vida comercial de los smoothies, no resulta necesario aplicar tratamientos de presurización intensos, que alteran la calidad sensorial de los mismos. La pasteurización fría mediante alta presión asegura la calidad microbiológica de los smoothies, inhibiendo completamente los microorganismos patógenos y manteniendo la microflora alterante en niveles irrelevantes. La pasteurización térmica es ligeramente más eficaz pero, en la práctica, no aporta ningún beneficio adicional, en lo que se refiere al control microbiológico.

Segunda. Los smoothies pasteurizados en frío mediante alta presión retienen mejor las propiedades sensoriales de la fruta y verdura fresca y carecen de sabores anómalos a mermelada o verdura cocida, lo que supone una importante diferenciación frente al producto tratado térmicamente. Por tanto, a diferencia de la pasteurización térmica, el empleo de tratamientos de presurización permite ofrecer al consumidor smoothies “como frescos”.

Tercera. La principal limitación de la pasteurización fría mediante alta presión es que no inactiva los enzimas pécticos y oxidasas de la fruta y verdura, en las condiciones estudiadas. Los smoothies presurizados presentan una mayor tendencia a la clarificación y oxidación durante el almacenamiento refrigerado, que puede ir en detrimento de su calidad sensorial y nutricional.

Cuarta. Los smoothies de frutas, frutos rojos y verduras responden de manera diferente ante las mismas condiciones de

presurización, debido a la complejidad y diversidad de las matrices vegetales. Los efectos negativos de los enzimas alterantes dependen, en general, de parámetros tales como la intensidad de color, turbidez, viscosidad o capacidad antioxidante propios de cada tipo de smoothies. La incorporación de frutos rojos a las fórmulas comerciales de smoothies de fruta mejora su estabilidad frente a la oxidación y clarificación.

Quinta. La pasteurización fría mediante alta presión permite obtener smoothies con un tiempo de vida comercial, en refrigeración, adecuado, similar al obtenido en un producto pasteurizado térmicamente. La vida comercial de los smoothies está limitada por su deterioro sensorial. En general, los smoothies de fruta y frutos rojos tratados por alta presión parten con una mejor calidad sensorial, aunque se deterioran más durante el posterior almacenamiento en refrigeración, mientras que los smoothies de verdura presurizados y tratados térmicamente, presentan pocas diferencias sensoriales.

Sexta. La pasteurización mediante altas presiones hidrostáticas es una tecnología que puede sustituir al tratamiento térmico para la conservación de los smoothies de fruta y verdura frescos, aunque será probablemente necesario aplicar estrategias adicionales para conseguir una mejor estabilización enzimática de los mismos. La utilización de variedades de frutas y verduras con un alto contenido en antioxidantes, más ricas en polisacáridos solubles y/o con una menor actividad enzimática, podría proporcionar smoothies más estables.

6. Resumen / Summary.

La presente Tesis Doctoral aborda el procesamiento mediante altas presiones hidrostáticas (HPP), como método alternativo al tratamiento térmico (TP), para la pasteurización de smoothies de fruta y verdura. El objetivo fue obtener smoothies con propiedades sensoriales similares a las de un producto no tratado y con una vida comercial parecida a la de un producto tratado por el calor. Para ello, se realizaron cuatro ensayos. En el primer ensayo se compararon tres tratamientos HPP (350 MPa/10 °C/5 min, 450 MPa/10 °C/5 min, 600 MPa/10 °C/2 min) y un tratamiento TP (85 °C/7 min) en un smoothie de fruta elaborado a base de naranja, fresa, manzana, plátano y zumo de manzana. La calidad de los smoothies fue evaluada a las 48 horas (a 4 °C) tras el procesamiento. Se determinó la calidad microbiológica (*Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli* y coliformes, bacterias mesófilas y psicrófilas totales, mohos y levaduras), actividad enzimática (pectin metil esterasa, polifenoloxidasas y peroxidasa), capacidad antioxidante (DPPH, FRAP), estabilidad física (densidad, pH, acidez, sólidos solubles, viscosidad, turbidez, color CIELab, transmitancia e índice de pardeamiento), calidad nutricional (vitamina C, azúcares, flavonoides y fenoles totales) y el flavor (test discriminatorio). Adicionalmente, se testó la calidad microbiológica de los smoothies a los 30 días de almacenamiento (4 °C e iluminación con luz fluorescente). Tras la evaluación de los smoothies, el tratamiento óptimo se estableció en 350 MPa/10 °C/5 min, ya que permite obtener smoothies con características similares a las del producto no tratado y microbiológicamente estables. En el segundo ensayo, se realizó un estudio de vida comercial (21 días) en el mismo smoothie de fruta. El tercer ensayo consistió en repetir el experimento anterior (28 días) en un smoothie elaborado con fresa, naranja, manzana, banana, mora, uva tinta y blanca, grosella y zumo de lima. El cuarto y último ensayo consistió en un estudio de vida comercial (28 días) en un smoothie elaborado con zanahoria, calabacín, manzana, pectina cítrica, calabaza y puerro.

La aplicación de 350 MPa permite conseguir una adecuada inhibición microbiológica durante la vida comercial de los smoothies. La pasteurización térmica es ligeramente más eficaz pero, en la práctica, no aporta ningún beneficio adicional en lo que respecta al control microbiológico. Por el contrario, los smoothies presurizados retienen mejor las propiedades sensoriales de la fruta y verdura fresca y carecen de sabores anómalos a mermelada o verdura cocida, lo que supone un importante rasgo diferencial frente al producto tratado por calor. La principal limitación de la pasteurización mediante alta presión es que no inactiva los enzimas pécticos y oxidasas de la fruta y verdura. Los smoothies presurizados presentan una mayor tendencia a clarificar y sufrir oxidación, lo que puede ir en detrimento de su calidad sensorial y nutricional. Los efectos negativos de los enzimas alterantes dependen, en general, de parámetros tales como la intensidad de color, turbidez, viscosidad o capacidad antioxidante propios de cada matriz vegetal. La pasteurización mediante alta presión permite obtener smoothies con un tiempo de vida comercial, en refrigeración, adecuado, similar al obtenido en un producto pasteurizado térmicamente, aunque los smoothies presurizados sufren un marcado deterioro sensorial, como corresponde a un producto fresco. El procesamiento mediante alta presión podría sustituir al tratamiento térmico para conservar los smoothies frescos, aunque será necesario desarrollar estrategias adicionales para conseguir una mejor estabilización enzimática de los mismos.

The present thesis addresses the use of High Pressure Processing (HPP) as an alternative method to the Thermal Treatment (TP) used for pasteurizing fruit and vegetable smoothies. The objective was to obtain processed smoothies with sensory properties similar to those showed by an untreated product and with a shelf life period similar to those reached in a thermally-treated product. Four experiments were performed. In the first experiment, three HPP treatments (350 MPa / 10 °C / 5 min, 450 MPa / 10 °C / 5 min, 600 MPa / 10 °C / 2 min) and one TP treatment (85 °C / 7 min) were compared in a fruit smoothie made with orange, strawberry, apple, banana and apple juice. Smoothie quality was assessed at 48 hours (4 °C) after processing. The microbial quality (*Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli* and coliform, total psychrophilic and mesophilic bacteria, moulds and yeasts), enzymatic activities (pectin methyl esterase, peroxidase and polyphenol oxidase), antioxidant status (DPPH, FRAP), physical stability (density, pH, acidity, soluble solids, viscosity, turbidity, CIELab colour, transmittance and browning index), nutritional value (vitamin C, sugars, flavonoids and total phenols) and flavour (discriminatory test) were determined. In addition, the microbial quality was checked in smoothies at 30 days of storage (4 °C and fluorescent lighting). The obtained results indicated that the most suitable HPP treatment was 350 MPa / 10 °C / 5 min, a level of pressurizing able to provide microbiologically stable and "like-fresh" smoothies. The second experiment consisted of a shelf life study (21 days) performed in the same type of fruit smoothie. In the third experiment, a shelf life study (28 days) was carried out in a red-fruit based smoothie made with strawberry, orange, apple, banana, blackberry, black and white grape, gooseberry and lime juice. The fourth and final experiment consisted of a shelf life study (28 days) performed in a vegetable smoothie made with carrots, zucchini, apple, citrus pectin, pumpkin and leek.

The application of 350 MPa achieved a suitable degree of microbial inhibition during smoothie shelf life. The TP-treatment was slightly more effective than the HPP-treatment but, in practice, the first did not provide practical benefits regarding microbial control. On the contrary, the HPP-smoothies maintained the sensory properties of fresh fruit and vegetables and were free of cooked-fruit/vegetable flavours, a differential trait with respect to the thermally-treated product. The use of HPP in smoothies was mainly limited by its low effectiveness for inactivating the pectic and oxidase enzymes present in the fruit and vegetables. The HPP-smoothies had a higher tendency towards clarification and oxidation during chill storage, which may be in detriment of their sensory and nutritional quality. These negative effects of the spoiling enzymes depend on some properties, such as colour intensity, turbidity, viscosity or antioxidant capacity, provided by the different fruit or vegetable matrices. In any case, the pasteurization by HPP allowed obtaining smoothies with a shelf life time period similar to those obtained by thermal pasteurization, although the shelf life of HPP-smoothies would be particularly limited by its sensory alteration, as corresponds to a fresh product. HPP could replace to TP for preserving "like-fresh" smoothies, although additional strategies should be performed for achieving an enzymatic stabilization of smoothies.

7. Referencias.

- A.O.A.C (1990). Official methods of analysis. Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Abbott, J. A. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest biology and technology*, 15, 207-225.
- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Wu., Z., Khan, M. A., & Zeng, X. (2014). Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 70-76.
- A.E.S.A. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) (2004). Aplicación de radiones ionizantes a los alimentos. Número de referencia 2003-04. Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/RADIACIONES_IONIZANTES_ALIMENTOS.pdf. Consultado el 15 de Enero de 2015.
- A.I.J.N. (European Fruit Juice Association) (2015) Liquid Market Report. Disponible en: <http://www.aijn.org/files/default/aijn2015-report.pdf>. Consultado el 10 de Septiembre de 2015.
- Anese, M., Nicoli, M. C., Dall'Aglio, G., & Lerici, C. R. (1995). Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Food Biochemistry*, 18, 285-293.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

- Anzaldúa-Morales, A., Lever, C., & Vernon, E. J. (1983). Nuevos métodos de evaluación sensorial y su aplicación en reología y textura. *Tecnología Alimentaria*, 18(5), 4.
- Alvarez-Jubete, L., Valverde, J., Patras, A., Mullen, A. M., & Marcos, B. (2014). Assessing the impact of high-pressure processing on selected physical and biochemical attributes of White cabbage (*Brassica oleracea L.var.capitata alba*). *Food and Bioprocess Technology*, 7, 682-692.
- Araya, L. H., Clavijo, R. C., & Herrera, C. (2006) Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56 (4), 361-365.
- Arroyo, G., Sanz, P. D., & Prestamo, G. (1999). Response to high pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 544 –556.
- Ashie, I. N. A., Smith, J. P., & Simpson, B. K. (1996). Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 87 – 121.
- Askar, A. (1998). Minimally processed tropical fruits. *Fruit Process*, 8, 339-343.
- Bajovic, B., Bolumar, T., & Heinz, V. (2012). Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science*, 92, 280–289.

- Balasubramaniam, V. M., & Farkas, D. (2008). High-pressure food processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 413-418.
- Balasubramaniam, V. M., Ting, E. Y., Stewart, C. M., & Robbins, J. A. (2007). Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 299-306.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., & Sevillo, L. (1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit. *European journal of biochemistry*, 193, 183-187.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2010). Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10070-10075.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50, 545-549.
- Barba, F. J., Jäger, H., Meneses, N., Esteve, M. J., Frígola, A., & Knorr, D. (2012). Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 18-24.
- Bárbosa-Cánovas, G. V. & Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Novel food processing technologies and regulatory hurdles. En: C. Boigrobert,

- S. Oh, A. Stjepanovic, & H. Lelieveld (Eds). Ensuring Global Food Safety: Exploring Global Harmoniation (p. 281-288). London, UK: Academic Press.
- Bárbosa-Cánovas, G. V., Góngora-Nieto, M. M., Pothakamury, U. R., & Swanson, B. G. (1999). Preservation of foods with pulsed electric fields. London, UK: Academic Press.
- Barbosa-Cánovas, G. V. & Rodriguez, J. J. (2002). Update on non-thermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Australia*, 54, 513–520.
- Barón, A., Dénes, J. M., & Durier, C. (2006). High-pressure treatment of cloudy apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 1005-1013.
- Baxter, I. A., Easton, K., Schneebeli, K., & Whitfield, F. B. (2005). High pressure processing of Australian navel orange juices: Sensory analysis and volatile flavor profiling. *Innovative food science and emerging technologies*, 6, 372-387.
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoğlu, F., & Hizal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganism and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17, 52-58.
- B.E.D.C.A. (Base de Datos Española de Composición de Alimentos). Disponible en: <http://www.bedca.net/bdpub/index.php>. Consultado el 10 de mayo de 2015.

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bett, K. L. (2002). Evaluating sensory quality of fresh-cut fruits and vegetables. En: O. Lamikanra (ed.). *Fresh-Cut fruits and vegetables: Science, Technology and Market*. (p. 427-438). New York, USA: CRC Press.
- Blasa, M., Gennari, L., Angelino, D., & Ninfali, P. (2010). Fruit and vegetable antioxidants in health. En: R. R. Watson & V. R. Preedy (eds.). *Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables* (p.37-58). El Sevier, Academic Press.
- 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, 25-30.
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, 58, 103-109.
- Brigman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9, 611-628.
- Bull, M. K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R., Sellahewa, J., Szabo, E. A., Johnson, R. L., & Stewart, C. M. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 135-149.

- Butz, P., Fernández-García, A., Lindauer, R., Dieterich, S., Bognár, A., & Tauscher, B. (2003). Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering*, 56, 233-236.
- Calderon-Miranda, M. L., González, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. *Brazilian journal of food technology*, 1, 3-11.
- Cameron, R. G., Baker, R., & Grohmann, K. (1998). Multiple forms of pectinmethylesterase from Citrus peel and their effects on juice cloud stability. *Journal of Food Science*, 63, 253-256.
- Cano, M. P., Hernandez, A., & De Ancos, B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, 62(1), 85-88.
- Cao, X., Bi, X., Huamg, W., Wu, J., Hu, X., & Liao, X. (2012). Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 181-190.
- Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2013). High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innovative Food Science and E merging Technologies*, 18, 48-56.

- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M. C., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61, 233-241.
- Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Rovere, P., & Amati A. (1997). Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts. *Food Chemistry*, 60, 647-649.
- Castro, S. M., & Saraiva, J. A. (2014). High-Pressure processing of fruits and fruit products. En D.W. Sun (ed.). *Emerging Tehnologies for Food Processing*. (p.65-73). El Sevier, Academic Press.
- Chirife, J., & Buera, M. P. 1997. A simple model for predicting the viscosity of sugar and oligosaccharide solutions. *Journal of Food Engineering*, 33, 221-226.
- Chakraborty, S., Kaishik, N., Srinivasa, P., & Misrha, H. N. (2014). High-pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 578-596.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colourimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- Cheftel, J. C. (1995). Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *International Journal of Food Science and Technology*, 1, 75-90.

- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high-pressure on meat: A review. *Meat Science*, 46, 211-236.
- Clariana, M., Valverde, J., Wijngaard, H., Mullen, A. M., & Marcos, B. (2011). High pressure processing of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties. *Innovative Food Science and Emerging technologies*, 12, 85-92.
- Comisión Europea (EC) nº 2073 (2005) (OJ L338, p1, 22/12/2005) of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
- Contador, R., Gonzalez-Cebrino, F., García-Parra, J., Lozano, M., & Ramirez, R. (2014). Effects of hydrostatic high pressure and termal treatments on two types of pumpkin pure and changes during refrigerated storage. *Journal of food processing and preservation*, 38, 704-712.
- Crossland, B. (1983). Vessels for very high pressures. En: R. W. Nichols (Ed.). *Developments in pressure vessel technology* (p. 69-109). London and New York: Applied Science Publishers.
- Dalmadi, I., Polyak-Feher, K., & Farkas, J. (2007). Effects of pressure and thermal pasteurization on volatiles of some berry fruits. *High Pressure Research*, 27, 169-172.
- Dede, S., Alpas A., & Bayindirli, H. (2007). High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 773-782.

- Di Nunzio, M., Vannini, L., Tossani, N., Patrignani, F., Lanciotti, R., & Bordoni, A. (2014). *Food and Nutrition Sciences*, 5, 27-34.
- E.F.S.A. (European Food Safety Authority) (2008). Concise database summary statistics –Total population. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm>. Consultado el 20 de Julio de 2014.
- Eisenmenger, M. J., & Reyes-de-Corcuera, J. I. (2009). High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 331-347.
- Ercan, S. S., & Soysal, C. (2013). Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science*, 5 (8), 5 - 13. <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2013.58A2002>.
- Escribano-Bailon, M. T., Beulga-Santos, C. & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal Chromatography*, 1054, 129-141.
- Esteve, M. J., & Frígola, A. (2007). Refrigerated fruit juices: Quality and safety issues. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 103-139.
- Farkas, D. F., & Hoover, D. G. (2000). High pressure processing. *Journal of Food Science*, 65, 47–64.
- Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry. Trends in *Food Science and Technology*, 14-16.
- Fellows, P. J. (2009). Food Technology: Principles and Practice. Oxford, UK: Wood head Publishing.

- Fernández-García, A., Butz, P., Bognér, A., & Tauscher, B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 290-296.
- Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J. J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1-12.
- F.I.A.B. (Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas) (2015). Informe económico 2014. Disponible en: http://www.fiab.es/archivos/documentoMenu/documentomenu_20150512081546.pdf. Consultado el 20 de Septiembre de 2015.
- Francis, F. (1995). Quality as influenced by color. *Food quality and preference*, 6, 149-155.
- Frutas y verduras de temporada en su mejor momento (2008). Disponible en: http://www.alimentacion.es/es/campanas/frutas/frutas_verduras_temporada. Consultado el 10 de Abril de 2015.
- García-González, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J. F., & Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.

- García-Palazón, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P., & Zabetakis, I. (2004). The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Food Chemistry*, 88, 7-10.
- García-Parra, J., González-Cebrino, F., Cava, R., & Ramírez, R. (2014). Effect of a different high pressure thermal processing compared to a traditional thermal treatment on a red flesh and peel plum purée. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 26-33.
- Gardner, P. T., White, T. A. C., 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, 471-474.
- Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (1998). Effect of modified atmosphere packaging on the flavonoids and vitamin C content of minimally processed Swiss chard (*Beta bulgaris Subspecies cyclo*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2007-2012.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., & Ferreres, F. (2002). Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5107-5114.
- Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M. & Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1696 (2), 245-152

- González-Cebrino, F., García-Parra, J., Contador, R., Tabla, R., & Ramírez, R. (2012). Effect of high pressure processing and thermal treatment on quality attributes and nutritional compounds of "Songold" plum purée. *Journal of Food Science*, 77(8), 866-873.
- Grecz, N., Rowley, D. B., & Matsuyama, A. (1983). The action of radiation on bacteria and viruses. En: E. S. Jpsephson & M. S. Peterson (eds.) *Preservation of foods by ionizing radiation* (p.167-218). Boca Raton, Fl: CRC. Press
- Greenway, G. M., & Ongomo, P. (1990). Determination of L-ascorbic acid in fruit and vegetable juices by flow injection with immobilised ascorbate oxidase. *Analyst*, 115(10), 1297-1299.
- Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). High hydrostatic pressure processing of peach puree with and without antibrowning agents. *Journal of food processing and preservation*, 28, 69-85.
- Hellín, P., Ros, J. M., & Laencina, J. (2001). Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. *Carbohydrate Polymers*, 45, 169-174.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 197-203.
- Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, M. D., Buzina, R., Fidanza, F., Oiampaoli, S. (1996). Flavonoid intake and long-

- term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.
- Hite, B. H. (1899). The effects of pressure in the preservation of milk. Bull. West Virginia University Agricultural Experiment Station, 58, 15-35.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F., & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43, 99-107.
- Houska, M., Strohalm, J., Kocurova, K., Totusek, J., Lefnerova, D., Tiska, J., Vrchotova, N., Fiedlerova, V., Holasova, M., Gabrovská, D., & Paulickova, I. (2006). High pressure and foods-fruit/ vegetable juices. *Journal of Food Engineering*, 77, 386-398.
- Huppertz, T., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International dairy journal*, 12, 561-572.
- Hurtado, A., Picouet, P., Jofré, A., Guàrdia, M. D., Ros, J. M., & Bañón, S. (2015). Application of High Pressure Processing for Obtaining "Fresh-Like" Fruit Smoothies. *Food and Bioprocess Technology*. In Press
- Ibarz, A., Pagán, J., & Garza, S. (2000). Kinetic models of non-enzymatic browning in apple puree. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1162-1168.
- Indrawati, Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2004). Pressure and temperature stability of water-soluble antioxidants in orange and

carrot juice: a kinetic study. *European of Food Research Technology*, 219, 161-166.

ISO 4120 (2004). Sensory analysis. Methodology. Triangle test. <http://www.iso.org>.

ISO 4121 (2003) Sensory analysis. Guidelines for the use of quantitative response scales. <http://www.iso.org>.

ISO 4831 (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms. Most probable number technique. <http://www.iso.org>.

ISO 4833 (2013). Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. <http://www.iso.org>.

ISO 6579 (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. <http://www.iso.org>.

ISO 7251 (2005). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Most probable number technique. <http://www.iso.org>.

ISO 8586 (2012). Sensory analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. <http://www.iso.org>.

- ISO 8589 (2007). Sensory analysis. General guidance for the design of test rooms. <http://www.iso.org>.
- ISO 16649-1 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuff. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. <http://www.iso.org>.
- ISO 17410 (2001). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms. <http://www.iso.org>.
- ISO 21527 (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. <http://www.iso.org>.
- ISO 21528 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method. <http://www.iso.org>.
- ISO 11290 (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. <http://www.iso.org>.
- Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Hashim, M. M., Saeeduddin, M., Lei, S.C., Wu, T., & Zeng, X. X. (2014). Influence of sonication and high

- hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2449-2457.
- Juárez-Enriquez, E., Salmeron-Ochoa, I., Gutierrez-Mendez, N., Ramaswamy, H. S., & Ortega-Rivas, E. (2015). Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 915-919.
- Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1403-1411.
- Kalt, W. (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), 11-19.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., & Butler, F. (2011). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 601-607.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., Butler, F., Tiwari, B. K., & Patras, A. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 551-556.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Mitchell, M., Gormley, T. R., & Butler, F. (2012a). Flavour profiling of fresh and processed fruit smoothies

- by instrumental and sensory analysis. *Food Research International*, 45, 17-25.
- Keenan, D. F., Rößle, C., Gormley, T. R., Butler, F., & Brunton, N. P. (2012b). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothie. *LWT-Food Science and Technology*, 45, 50-57.
- Kikas, A., & Libek, A. (2005). Influence of temperature sums on growth and fruit mass and yield of strawberry. *European Journal of Horticultural Science*, 70, 85-88.
- Kim, Y. S., Park, S. J., Cho, Y. H., & Park, J. (2001). Effects of combined treatment of high hydrostatic pressure and mild heat on the quality of carrot juice. *Food Engineering and Physical Properties*, 66, 1355-1360.
- Knockaert, G., De Roeck, A., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2011). Effect of thermal and high pressure processes on structural and health-related properties of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry*, 125(3), 903-912.
- Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47(6), 156- 161.
- Lado, B. H., & Yousef A. H. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and infection*, 4, 433-440.

- Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., & Bouvier, J. M. (1999). Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chemistry*, 67(1), 7-16.
- Landl, A., Abadias, M., Sárraga, C., Viñas, I., & Picouet, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 557-564.
- Lavinas, F. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., & Valente Mesquita, V. L. (2008). Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice preservation. *Journal of Food Science*, 73(6), 273-277.
- Lee, P. L., Lusk, K., Miroso, M., & Oey, I. (2015). Effect of information on Chinese consumers' perceptions and purchase intention for beverages processed by high pressure processing, pulsed-Electric field and heat treatment. *Food Quality and Preference*, 40, 16-23.
- Levander, O. A. (1990). Fruit and vegetable contributions to dietary mineral intake in human health and disease. *Hortscience*, 25(12), 1486-1488.
- Li, R., Wang, Y., Wang, S., & Liao, X. (2015). A comparative study of changes in microbiological quality and physicochemical properties of N₂-infused and N₂-Degassed banana smoothies after high pressure processing. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 333-342.
- Liang, H., Hong, M., Ho, R., Chung, C., Lin, Y., Chen, C. & Sung, H. (2004). Novel method using a temperature-sensitive polymer

- (methylcellulose) to thermally gel aqueous alginate as a pH-sensitive hydrogel. *Biomacromolecules*, 5, 1917-1925.
- Liavoga, A., & Matella, N. J. (2012). Enzymes in quality and processing of tropical and subtropical fruits. En: Siddiq, M. (ed.). Tropical and subtropical fruits: postharvest physiology, processing and packaging. (p. 35-51). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Lin, H. M., Chan, E. C., Chen, C., & Chen, L. F. (1991) Disintegration of yeast cells by pressurized carbon dioxide. *Biotechnology Progress*, 7, 201- 204
- Liu, F., Wang, Y., Li, R., Bi, X., & Liao, X. (2014). Effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on antioxidant activity, antioxidant compounds and color of mango nectars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 35-43.
- Lobstein, T., Baur, L., & Uauy, R. (2004). Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obesity Reviews*, 5(1), 4-85.
- Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Indrawati, Smout, C., & Hendrickx, M. (2003). Effects of combined pressure and temperature on enzymes related to quality of fruits and vegetables: from kinetic information to process engineering aspects. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(5), 527-586.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A., Fachin, D., Verlent, I., Indrawati & Hendrickx, M. (2002a). Partial purification, characterisation and Thermal and High-Pressure Inactivation of Pectin Methylsterase

- from carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 5437-5444.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A., Smout, C., Ozcan, S., Fsachin, D., Verlent, I., Truong, S.V., Duvetter, T., & Hendrickx, M. (2002b). Strawberry pectin methylesterase (PME): Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. *Biotechnology Progress*, 18, 1447-1450.
- Maestro Durán, R., & Borja Padilla, R. (1993). Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y Aceites*, 44(2), 107-111.
- M.A.G.R.A.M.A. (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). (2015). Informe del Consumo de Alimentación en España en 2014. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2014_tcm7-382148.pdf. Consultado el 10 de Septiembre de 2015.
- Marszalek, K., Mitek, M., & Skapska, S. (2015). The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and enzyme activity in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 48-56.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 6, 271-278.

- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., & Ros, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta (2000). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1), 5-18.
- Masegosa, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., Sánchez-Íñiguez, F., & Ramírez, R. (2014). Effect of processing by hydrostatic high pressure of two ready to heat vegetable meals and stability after refrigerated storage. *Food Science and Technology International*, 20, 605-15.
- Mass, J. L., Wang, S. L., & Galleta, G. G. (1995). Health enhancing properties of strawberry fruit. En: M. P. Pritts, C. K. Chandler, T. E. Crocker (eds.). Proc. IV north American strawberry growers conference (p.11-18). Fla, USA: University of Florida Press.
- Massiot, P., Rouau, X., & Thibault, J. F. (1987). Characterization of cell wall polysaccharides of carrots. *Food Hydrocolloids*, 1, 541-547.
- McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M., & Bird, A. R. (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 543-548.
- Mohamed, M. E. A., & Eissa, A. H. A. (2012). Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology. En: A. H. A. Eissa (Ed.). Structure and Function of Food Engineering. (p. 275-306). In Tech, DOI:10.5772/48678.

- Molina García, A. D., & Sanz Martínez, P. D. (2002). Anisakis simplex larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 65, 383-388.
- Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Linton, M., Patterson, M. F., Smiddy, M., & Kelly, A. L. (2005). High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 257-270.
- Nagy, S. (1980). Vitamin C Contents of Citrus Fruit and Their Products: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 8-18.
- Netzel, M., Strass, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., & Bitsch, R. (2002). In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, 35, 213-216.
- Neves, F. I. G., Vieira, M. C., & Silva, C. L. M. (2012). Inactivation kinetics of peroxidase in zucchini (Cucurbita pepo L.) By heat and UV-C radiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 158-162.
- Nienaber, U. & Shellhammer, T. H. (2001a). High-pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66(2), 328-331
- Nienaber, U. & Shellhammer, T. H. (2001b). High-pressure processing of orange juice: Combination treatments and a shelf life study. *Journal of Food Science*, 66(2), 332-336.
- Nielsen, H. B., Sonne, A. M., Grunert, K. G., Banati, D., Pollák-Tóth, A., Lakner, Z., Olsen, N. V., Zontar, T. P., & Peterman, M. (2009).

- Consumer perception of the use of high-pressure processing and pulsed electric field technologies in food production. *Appetite*, 52, 115-126.
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Journal of Nutrition*, 30, 134-144.
- Nunes, H. (2014). Procesado por altas presiones hidrostáticas. Disponible en: http://www.um.es/documents/812895/1925020/SMOOTHIES+AND+SNACK_APAPROCESSING_Helena+Nunes.pdf/b9653873-e954-4b33-9f05-a72284383c2f. Consultado el 15 de julio. 2015.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review. *Trends in Foods Science and Technology*, 19(6), 320-328.
- Office of Disease Prevention and Health Promotion (2015). Scientific report of the 2015 Dietary Guidelines Advisory Comitee. Disponible en: <http://www.health.gov/dietaryguidelines/2015-scientific-report>. Consultado el 2 de Julio de 2015.
- Orruno, E., Apenten, R. O., & Zabetakis, I. (2001). The role of beta glucosidase in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry. *Flavour and fragrance journal*, 16, 42-45.
- Otten, J. J., Hellwig, J. P., & Meyers, L. D. (Eds.) (2006). Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington D. C., USA: The National Academies Press.

- Palou, E., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G. V., Welti-Chanes, J., & Swanson, B.G. (1997). High hydrostatic pressure as a hurdle for *Zygosaccharomyces bailii* inactivation. *Journal of Food Science*, 62, 855-857.
- Pangborn, R. M. (1961). Interaction of tastes. In: Maynard A. Amerine, Rose Marie Pangborn and Edward B. Roessler (ed.). *Food Science and Technology. Principles of sensory evaluation of food* (p. 125 - 130). New York, USA: Academic Press.
- Parish, M. E. (1998). Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure. *LWT-Food Science and Technology*, 31, 439-442.
- Parish, M. E. & Higgins, D. P. (1989). Extinction of *Listeria monocytogenes* in single-strength orange juice: Comparison of methods for detection in mixed populations. *Journal of Food Safety*, 9, 267-277.
- Patazca, E., Koutchma, T., & Balasubramaniam, V. M. (2007). Quasi-adiabatic temperature increase during high pressure processing of selected foods. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 199-205.
- Patras, A., Brunton, N. P., Pieve, S. D., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 308-313.

- Perera, C. O. (2007). Minimal processing of fruits and vegetables. In M.S.Rhaman (Ed.). *Handbook of Food Preservation* (p. 137-148), CRC Press.
- Picouet, P. A., Sárraga, C., Cofán, S., Belletti, N., & Guàrdia, M. D. (2015). Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 920-926.
- Pilavtepe-Celik, M. (2013). High hydrostatic pressure (HHP) inactivation of foodborne pathogens in low-acid juices. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 673-677.
- 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.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstitutes orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60, 21-29.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2005a). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*, 91, 495–503.

- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2005b). Quality degradation kinetics of pasteurized and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 60,1-9.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4290-4302.
- Purroy Balda, F., Val Aparicio, B., & Tonello Samson, C. (2012). Industrial high pressure processing of foods: review of evolution and emerging trends. *Journal of Food Science and Engineering*, 2, 543-549.
- Qin, B. L., Pothakamury, U. R., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1996). Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 603-627.
- Ramírez Tortosa, M. C., & Quiles Morales, J. L. (2005). Vitamina C, Vitamina E y otros antioxidantes de origen alimentario. En: A. Gil Hernández (ed.). *Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición* (p. 663-823). España: Acción Médica.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitwang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.

- Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo Scalzo, R., Nani, R. C., Torregiani, D. (2003). Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, 36, 999-1005.
- Roy, M. K., Takenaka, M., Isobe, S., & Tsushida, T. (2007). Antioxidant potential, antiproliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*, 103, 106–114.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42(8), 1023–1033.
- Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martínez, P., & Cano, M. P. (2009). Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure by high pressure and pulsed electric fields. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49, 552-576.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2006). Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato purée on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 171-179.
- Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2005). Impact of high-pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant

- activity of orange juice and comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(11), 4403-4409.
- Sancho Valls, J., Botal Prieto, E., & Castro Martín, J. J. (1999). Introducción al análisis sensorial de alimentos vol.4. Barcelona, España: Edicions Universitat Barcelona.
- Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., & Lambri, M. (2015). Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control*, 47, 166-174.
- Sila, D. N., Buggenhout, S. V., Duvetter, T., Fraeye, I., Roeck, D. E., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part II — Structure–function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 86–104.
- Simpson, B. K., Rui, X., & Klomklao, S. (2012). Enzymes in food processing. En: B. K. Simpson, L. Nollet, G. Paliyath, S. Benjakul, W. K. Nip, & Y. Hui (Eds.), *Food Biochemistry and Food Processing* (p. 181-206). New York, USA: Wiley-Blackwell.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colourimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Sijtsema, S. J., Reinders, M. J., Hiller, S. R. C. H., & Guàrdia, M. D. (2012). Fruit and snack consumption related to sweet, sour and salty taste preferences. *British Food Journal*, 114 (7), 1032-1046.
- Stollewerk, K. (2012). *Food Safety in fast drying (QDS process®) of dry-cured meat products: high pressure and NaCl-free processing implementation*. (Ph. D. Thesis). Universidad de Girona, Girona, Spain.
- Suarez-Jacobo, A., Rufer, C. E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A. X., & Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, 127, 447-454.
- Sun-Waterhouse, D., Bekkour, K., Wadhwa, S. S. & Waterhouse, G. I. N. (2013). Rheological and chemical characterization of smoothie beverages containing high concentrations of fibre and polyphenols from apple. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 409-423.
- Takahashi, Y., Ohta, H., Yonei, H. & Ifuku, Y. (1993). Microbicidal effect of hydrostatic pressure on Satsuma mandarin juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 28(1), 95-102.
- Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 200, 3–13.
- Terefe, N. S., Buckow, R., & Versteeg, C. (2014). Quality-Related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food

- processing technologies, Part 1: High-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 24-63.
- Terefe, N. S., Delon, A., Buckow, R., & Versteeg, C. (2015). Blueberry polyphenol oxidase: Characterization and the kinetics of thermal and high pressure activation and inactivation. *Food Chemistry*, 188, 193-200.
- Terefe, N. S., Matthies, K., Simons, L., & Versteeg, C. (2009a). Combined high pressure-mild temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of strawberries (*Fragaria*ananassa*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 52-60.
- Terefe, N., Yang, Y., Knoerzer, K., Buckow, R., & Versteeg, C. (2010). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 52-60.
- Thomas, L. V., Ingrama, R. E., Yub, S., & Delves-Broughtona, J. (2004). Investigation of the effectiveness of Ascopyrone P as a food preservative. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 319-323.
- Ting, S. V., & Rouseff, R. L. (1986). Vitamins. En: S. V. Ting & R. L. Rouseff (Eds.), *Citrus fruits and their products: Analysis, Technology* (p. 121-136). New York, USA: Marcel Dekker.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Brunton, N. P., & Cullen, P. J. (2009). Degradation kinetics of tomato juice quality parameters by

- ozonation. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1199-1205.
- Tomas-Barberan, F. A., & Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 853-876.
- Tsironi, T., Maltezou, I., Tsevdou, M., Katsaros, G., & Taoukis, P. (2015). High-pressure cold pasteurization of gilthead seabream fillets: Selection of process conditions and validation of shelf life extension. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 681-690.
- Turgeon, S. L., & Rioux, L. E. (2011). Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 1915-1924.
- Van Buggenhout, S., Messagie, I., Plancken, I., & Hendrickx, M. (2006). Influence of high-pressure-low-temperature treatments on fruit and vegetable quality related enzymes. *European Food Research and Technology*, 223, 475-485.
- Van Buggenhout, S., Sila, D. N., Duvetter, T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part III-Texture Engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 105-117.
- Varela-Santos, E., Ochoa-Martinez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J. E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., & Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on

- physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 13-22.
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & Di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, colour, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58, 519-526.
- Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herrero, M. M., Rüfer, C. E., Guamis-López, B., & Roig-Sagués, A. X. (2013). Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 89-94.
- Vervoort, L., Van der Plancken, J., Graumet, T., Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., Matser, A. M., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. V. (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 466-477.
- Vervoort, L., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Verlinde, P., Matser, A., Hendrickx, M., & Van Loey, A. V. (2012). Thermal versus high pressure processing of carrots: A comparative pilot-scale study on

- equivalent basis. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15, 1-13.
- Vicente, A. R., Manganaris, G. A., Sozzi, G. O., & Crisosto, G. H. (2009). Nutritional quality of foods and vegetables. En: W. J. Florkowski, R. L. Shewfelt, B. Brueckner, & S. E. Prussia (Eds.) *Postharvest Handling: A Systems Approach* (p. 57-106). New York, USA: Academic Press.
- Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315-5321.
- Wang, H. Y., Hu, X. S., Chen, F., Wu, J. H., Liao, X. J., & Wang, Z. F. (2006). Kinetic analysis of non-enzymatic browning in carrot juice concentrate during storage. *European Food Research and Technology*, 223, 282-289.
- Wang, S., Lin, T., Man, G., Li, H., Zhao, L., Wu, J., & Liao, X. (2014). Effects of anti-browning combinations of ascorbic acid, nitrogen and carbon dioxide on the quality of banana smoothies. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 161-173.
- Wang, H., Reitmeier, C. A., Glatz, B. A., & Carriquiry, A. L. (2003). Mixed model analysis of sensory characteristics of irradiated apple cider. *Journal of Food Science*, 68, 1498-1503.
- Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Hendrickx, M. (1998). High pressure inactivation of polyphenoloxidases. *Journal of Food Science*, 63, 873-877.

- Wicker, L., Ackerley, J. L., & Hunter, J. L. (2003). Modification of pectin by pectinmethylesterase and the role in stability of juice beverages. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 809-814.
- Yu, Y., Lin, Y., Zhan, Y., He, J., & Zhu, S. (2013). Effect of high pressure processing on the stability of anthocyanin, ascorbic acid and colour of Chinese bayberry juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 119, 701-706.
- Zabetakis, I., Leclerc, D., & Kajda, P. (2000). The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(7), 2749-2754.
- Zhang, Z., Pang, X., Xuwu, D., Ji, Z., & Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1-2), 47-52.
- Zhao, L., Wang, Y., Qiu, D., & Liao, X. (2013). Effect of ultrafiltration combined high pressure processing on safety and quality features of fresh apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3246-3258.
- Zhou, C. I., Liu, W., Yuan, C., Song, Y., Chen, D., Ni, Y. Y., & Li, Q. H. (2014). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical-chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 24-34.

8. Anexos



ORIGINAL PAPER

Application of High Pressure Processing for Obtaining “Fresh-Like” Fruit Smoothies

Adriana Hurtado¹ · Pierre Picouet² · Anna Jofré³ · Maria Dolors Guàrdia² · José María Ros¹ · Sancho Bañón¹

Received: 12 March 2015 / Accepted: 15 September 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Three high pressure processing (HPP) treatments (350 and 450 MPa for 5 min and 600 MPa for 3 min) at cold temperature (10 °C) were assessed as an alternative to thermal pasteurization (85 °C for 7 min) to obtain multi-fruit smoothies with “fresh-like” properties destined for retailing lines. The effects of the treatments on various sensory, enzymatic, physical-chemical and nutritional properties were determined 48 h post-processing, and microbial quality (total viable and psychrophilic bacteria, coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, moulds and yeasts) was checked after 30 days of refrigerated storage. Compared with HPP, the thermal treatment only provided benefits with respect to the inactivation of oxidase and pectic enzymes but had clear disadvantages concerning the development of a cooked-fruit flavour and the loss of vitamin C. The application of 350 MPa did not alter fruit properties and ensured the microbiological quality of smoothies, while using higher pressures involved a higher risk of flavour alteration without providing other benefits. Both HPP treatments retained vitamin C, total phenols and flavonoids but also resulted in a sucrose hydrolysis. However, the antioxidant capacity and the values of lightness, turbidity, transmittance and viscosity indicated that the pressurized smoothies had a higher tendency for

clarification and oxidation than the thermally pasteurized smoothies. Thus, the resistance of spoiling enzymes to high pressure is probably the main handicap when pressurizing fruit smoothies, since these enzymes remained active in the HPP-treated smoothies and the potential sensory and nutritional benefits of using HPP could be lost during storage.

Keywords High hydrostatic pressure · Fruit · Smoothie · Flavour · Colour

Introduction

There is a general consensus that the consumption of fruit and vegetables is a key factor in a balanced diet. The Office of Disease Prevention and Health Promotion of the US Government (2015) recommends the consumption of five daily portions of fruits and vegetables. In Europe, fruit and vegetable intake varies between countries (Lobstein et al. 2004), but according to the compiled results of the European Food Safety Authority (EFSA) (2008), the average consumption (386 g per day) is below the 400 g per day recommended by the World Health Organization (WHO). Smoothies are an increasingly popular way of consuming fruit homogenates containing pulp and so may contribute to a healthier diet. Smoothies often consist of a number of ingredients including fruit (or less commonly vegetables), fruit juice, ice, yogurt and milk (Walking-Ribeiro et al. 2010). In recent years, fruit-based smoothies have gained popularity across the world and are currently one of the major segments of the soft drinks market. This is primarily driven by rising health consciousness among the public, convenience and the taste and “naturalness” offered by smoothies. High pressure processing (HPP) is used by companies, mainly small- and medium-sized ones, to obtain a high-quality product with a good

cost/benefit ratio (Sampedro et al. 2010). Industrial installations typically operate discontinuously and can attain pressures of up to 800 MPa (Barba et al. 2012b). As mentioned by several authors (Keenan et al. 2010; Landl et al. 2010; Knockaert et al. 2011; Vervoort et al. 2012), HPP has proven to be an alternative to heat treatment for processing fruit and vegetable juices and is accepted by the majority of consumers (Butz et al. 2003). HPP promotes the destruction of vegetative microorganisms and enzyme inactivation and causes little change in the sensory and nutritional properties of the food. HPP affects the viability of microbial cells (Patterson et al. 2012; Zhao et al. 2014) and the structure of proteins and/or enzymes (López-Malo et al. 1998; Rastogi et al. 2007), while hardly affecting the food compounds of low molecular weight, such as vitamins, pigments, flavouring agents and other compounds that are related to the sensory, nutritional and health properties of food products (Fernández-García et al. 2001; Butz et al. 2003; Nienaber and Shellhammer 2001; Oey et al. 2008; Barba et al. 2012b). Most HPP studies published to date have been carried out in individual fruit products, although some studies on blended fruit mixtures have been developed in recent years. Different pressurizing conditions have been tested in order to obtain products with the sensory and/or nutritional attributes normally associated with “minimally processed” fruit. Keenan et al. (2012a, b) compared two HPP treatments (450 and 600 MPa at 20 °C for 5 min) and an equivalent thermal treatment ($P_{70}>10$ min) in a similar fruit smoothie containing sterilized apple juice. The study found that HPP provided some advantages concerning colour retention, antioxidant capacity and vitamin C degradation, while its positive effect on flavour was less clear; however, the higher oxidation degree observed in the HPP-treated smoothies after chilled storage led these authors to conclude that enzymatic degradation systems were not inactivated by the pressurizing conditions tested. This finding was confirmed by Barba et al. (2014) in a study on a fruit extract containing orange, mango and papaya sweetened with *Stevia rebaudiana*. The application of 300–500 MPa for 5–15 min permitted a good retention of fruit properties such as colour, antioxidant capacity and phenol content but only resulted partially effective in inactivating oxidase enzymes. In contrast, HPP would provide a wide margin of microbial security in the blended fruit products. For example, pressurizing at 200 MPa for 5 min allowed a 5-log reduction of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage (Barba et al. 2012a). A preliminary study (Picouet et al. 2015) confirmed that the application of 600 MPa at 10 °C for 5 min widely ensured the microbial quality of a carrot juice for 29 days, which suggests that the use of lower pressures would also be considered effective for pasteurizing similar products such as smoothies.

Besides HPP, alternative methods to thermal pasteurization can be used for preserving fruit products. Walking-Ribeiro et al. (2010) researched the shelf life and sensory attributes

of a fruit smoothie-type beverage processed with moderate heat and pulsed electric fields (PEFs) and concluded that the improvement in microbiological stability obtained and generally comparable attributes obtained meant that the process could be considered a feasible alternative to treatment with mild pasteurization. Zulueta et al. (2013) also reported that alternative methods such as HPP and PEF may give new opportunities to develop an orange juice-milk beverage with an equivalent shelf life to that of thermally treated beverage in terms of microbial, physical-chemical and nutritional characteristics. However, no industrial preservation process involving pulsed electric fields exists. In contrast, food companies have ever more access to HPP equipment, and the number of HPP food products on the market is increasing, particularly blended fruit homogenates that are sold in chilling cabinets. Thus, the growing consumption of fresh-like fruit smoothies and juices requires new specific studies that simultaneously address the different aspects related with their preservation, including the inactivation of pathogens and spoiling microbes, the retention of fresh fruit flavour and colour, the inactivation of the oxidase and pectic enzymes involved in darkening, clarification and off-flavours or the preservation of major nutrients, such as vitamins, antioxidants and sugars. In addition, comparisons with equivalent conventional thermal processes are needed.

The aim of the present study was to assess the effects of three high pressure treatments (ranging from 350 to 600 MPa) on the resulting quality of a multi-fruit smoothie elaborated with fruits in proportions similar to those used in commercial smoothies. Based on the results obtained, one of the three HPP treatments will be chosen for future studies and a further full shelf life experiment will be carried out to monitor spoilage in fruit smoothies kept under refrigeration.

Materials and Methods

Experimental Design

The experimental design was based on the research published by Keenan et al. (2010, 2011, 2012a, b). After preliminary sensory trials (data not shown), a commercial formulation for smoothies containing fresh fruits was chosen. Smoothies from five different treatments (raw, HPP-treated at 350, 450 or 600 MPa and thermally treated at 85 °C) were compared. The quality of smoothies (flavour, oxidase and pectic activities, antioxidant status, different physical properties and major nutrients) was assessed 48 h post-processing. This time period represents the time elapsing from processing (pressurizing or heating) to the beginning of the trading period (including post-processing storage, transport and pre-retailing storage in the supermarket). Next, microbial counts were made after 30 days of chilled storage to determine whether the smoothies

✉ Sancho Bañón
sanchoba@um.es

¹ Department of Food Science and Technology and Human Nutrition, Faculty of Veterinary Science, University of Murcia, Espinardo, E-30100 Murcia, Spain

² IRTA-Food Technology Program, Finca Camps i Armet, Monells, E-17121 Girona, Spain

³ IRTA-Food Safety Program, Finca Camps i Armet, Monells, E-17121 Girona, Spain

complied with microbial standards for a suitable time before retail. Data were analysed by ANOVA using the Statistix 8 package for Windows (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). The statistical model included the treatments as fixed effect and the replica as a random effect. Mean differences between treatments were tested by Tukey test ($P \leq 0.05$). Sample size was 45 smoothie units (3 bottles or bags $\times$ 5 treatments $\times$ 3 manufacturing batches). All measurements and analyses were made in triplicate at least.

Sample Preparation

The smoothie formulation was based on commercial smoothies but selected for its sensory properties. Fruits were purchased from a local wholesale agent. The smoothie composition by weight (g 100 g⁻¹) was apple juice (*Pyrus malus* v. Golden delicious) (33), orange juice (*Citrus sinensis* v. Late Navel) (33), strawberry (*Fragaria ananassa* v. Pájaro) (14), whole apple (10) and banana (*Musa cavendishii* v. Pequeña enana) (10). Juices were obtained using a juicer (Robot Coupé C40, Bourgogne, France) and blended in a tank to achieve the above-mentioned composition. After mixing, the pH and total soluble solids of the different smoothies were measured in each manufacturing batch. The average values for pH and total soluble solids (°Brix) were 3.8 $\pm$ 0.0 and 12.2 $\pm$ 0.1, respectively. Untreated smoothies and the smoothies intended for HPP were packaged in 250-ml polyethylene terephthalate (PET) bottles (Sunbox, Madrid, Spain), while specific HT300 pouches (Seal Air Cryovac, Milano, Italy) were used for the thermally treated samples. These packaging types are suitable for high pressure and thermal processing, respectively, and prevent the possible negative effects of packaging materials on smoothie flavour. The packed smoothies were kept at 4 °C in darkness for up to 1 h before processing.

Thermal and High Pressure Processing

HPP consisted of pressurization at an initial temperature of 9–10 °C, a feasible industrial working temperature to prevent smoothie overheating during pressurization and limit the energetic costs derived from water chilling. A 6500/120 industrial apparatus for HPP was used (Hyperbaric, Burgos, Spain), the main characteristics of which were throughput, 555 kg per h; vessel capacity, 120 l; vessel diameter inside, 200 mm and footprint, 37 m². Pressure measurements were made with an IS-20H pressure transducers (Wika instrument, Lawrenceville, USA) able to measure pressure from 0 to 689.5 MPa ($\approx$ 100,000 psi). The initial temperature of the water located at the entrance of the vessel was measured by a temperature sensor pt100 (IFM electronic, El Prat de Llobregat, Spain). Three different pressurizing conditions were tested. For P_{max} = 350 MPa, the pressure ramp was 200 MPa min⁻¹, holding time 5 min and total processing time

7 min 18 s. For P_{max} = 450 MPa, the pressure ramp was 215 MPa min⁻¹, holding time 5 min and total processing time 7 min 40 s, while for P_{max} = 600 MPa, the pressure ramp was 230 MPa min⁻¹, holding time 3 min and total processing time 5 min 8 s. With such parameters, the quasi-adiabatic temperature increase was below 3.0 °C at 100 MPa⁻¹ (Patazca et al. 2007), indicating that sample temperature was below 25 °C at 600 MPa. For thermal processing, the samples were introduced into an Iltraplus autoclave (Ilpra Systems, Mataró, Spain) and heated to 85 °C for 7 min, including the initial ramp of 5.7 °C min⁻¹, the total heating time being 27 min. After processing, the samples were kept in a Climacell 707 cabinet (MMM Medcenter Einrichtungen, München, Germany) at 4 $\pm$ 1 °C under darkness for 48 h.

Sensory Analysis

Sensory analysis was carried out in two steps: first, screening by differences between samples, and then, a triangle test (ISO 4120 2004) between the two most similar treatments was applied for discriminating smoothie flavour. Six assessors were selected and trained according to the ISO 8586 2012. Training focused on the possible off-flavours present in smoothies, in particular, cooked-fruit “pressurized-like” flavours. In the triangle test, three samples are presented, two of which are known to be alike and the third different; the probability is 1/3 that the odd sample will be chosen by chance alone. The normal curve approximation with $P = 1/3$ may be used to obtain approximate probabilities. Samples were coded with three randomized numbers and presented with equal frequency in each of the six possible orders: ABB, BAB, BBA, AAB, ABA and BAA. At all tasting sessions, three triangle tests were presented. At a $P < 0.05$ level of significance, 18 of the 36 possible correct identifications are required to be regarded as significant. The sensory evaluation was carried out in a standardized sensory test room at 22 $\pm$ 1 °C.

Enzymatic Activities

Peroxidase enzyme (POD) was first extracted from the smoothies by mixing 10 ml sample with 10 ml 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 6.5. The mixture was centrifuged for 10 min at 15430 $\times$ g. The supernatant was mixed with 1.1 ml 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.5, 0.5 ml enzyme extract, 1 ml o-phenylenediamine (OPDA) solution (10 g l⁻¹ in 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.5) as substrate and 0.5 ml hydrogen peroxide solution (15 g l⁻¹ in 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.5) as oxidant in a 1-cm path cuvette. The formation of the coloured oxidation product (2,3-diaminophenazine) was measured as the change in absorbance at 485 nm and 25 °C after 20 min (Vervoort et al. 2011).

Polyphenol oxidase (PPO) enzymatic activity was assessed according to the procedure of Wang et al. (2014) with slight

modifications. Samples (3 g) were homogenized in 6 ml 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 g l⁻¹ insoluble polyvinylpyrrolidone (PVP) and 5 g l⁻¹ Triton X-100 and were then centrifuged at 15,430 $\times$ g for 10 min. The reaction material containing 2 ml of 7 mM 4-t-butyl catechol solution, 1 ml of distilled water and 0.2 ml of the extract supernatant was measured at 420 nm and 25 °C. The reference cuvette contained only substrate solution and distilled water. PPO activity was defined as the change in absorbance under the assay conditions (Δ absorbance min⁻¹ mol). The final results were expressed as percentage of POD and PPO relative activities and were calculated as the ratio between the treated (HPP and thermal) and the untreated smoothies.

The enzymatic activity of pectin methyl esterase (PME) was determined according to the method of Li et al. (2015) with slight modifications. PME activity was assayed by reacting 5 ml of sample with 50 ml of a 1 % (w/v) citrus pectin solution containing 0.2 M NaCl. During pectin hydrolysis, the pH was maintained constant by the addition of 0.01 N NaOH using a GLP21 pH meter (Crison, Barcelona, Spain). The results of PME activity (expressed as PME units g⁻¹) were calculated using the following formula (1):

$$PME \text{ units g}^{-1} = \frac{ml \text{ NaOH} * normal \text{ of NaOH}}{weight \text{ of sample(g)} * 30 \text{ min}} \quad (1)$$

Antioxidant Activity Assay

Free radical scavenging activity was determined using the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) method (Vega-Gálvez et al. 2014) with some modifications. The sample was diluted in an 80:20 (v/v) ethanol/water solution to obtain the extract (0.1 g ml⁻¹). Sample extract was diluted at seven different concentrations (from 0.005 to 0.1 g ml⁻¹) in an 80:20 (v/v) ethanol/water solution. Then, an aliquot of 2 ml of 0.15 mM DPPH radical in ethanol was added to a test tube with 1 ml of the sample extract. The control solution was prepared containing the same volume without any extract. The absorbance was measured at 515 nm using a UV2 Series UV/Vis spectrophotometer (Unicam, Cambridge, UK) after 20 min in darkness. The spectrophotometer was equilibrated with an 80 % (v/v) ethanol/water solution. Total antioxidant activity (*TAA*) was expressed as the inhibition percentage of the DPPH radical and was determined by the following formula (2):

$$\%TAA = \left(1 - \frac{Abs \text{ sample}}{Abs \text{ control}}\right) \times 100 \quad (2)$$

where *TAA* is the total antioxidant activity and *Abs* is the absorbance.

A polynomial regression equation between the *TTA* values obtained at different concentrations for each sample was used for quantification. The results (IC₅₀) were expressed as the

sample concentration required to scavenge half of the DPPH free radicals.

The reducing power was determined using the ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay as described by Benzie and Strain (1996) with some modifications. To prepare the FRAP reagent, a mixture of 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) solution in 40 mM HCl and 20 mM ferric chloride (10:1:1; v/v/v) was freshly prepared. Then, 3 ml reagent, 300 μ l water and 100 μ l sample were added. FRAP reagent was added at 37 °C. The reaction mixture was monitored at 593 nm versus a blank (reaction mixture without sample). Methanolic Fe²⁺ solutions in a concentration range of 100–1000 μ mol (FeSO₄) l⁻¹ were used to obtain the calibration curve. The results were expressed as μ mol equivalents Fe²⁺ 100 ml⁻¹ ($\pm$ 3 μ mol 100 ml⁻¹).

Density

Density (expressed as g ml⁻¹) was measured in shaken samples kept at 25 °C using a DMA 35N densimeter (Anton Paar, Graz, Austria) with an accuracy of $\pm$ 0.001 g ml⁻¹ and a measuring range of 0–3 g cm⁻³.

Viscosity

Absolute viscosity was measured in the supernatant from the centrifuged sample kept at 40 °C, using a No. 300 Ostwald Cannon-Fenske viscometer tube (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Absolute viscosity was calculated according to the following formula (3):

$$V = C \times T \times D \quad (3)$$

where *V* is the absolute viscosity (cP), *C* is the constant for the viscometer (0.24438 mm² s⁻¹), *T* is the holding time (s) and *D* is the density (g ml⁻¹).

Total Soluble and Insoluble Solids

Total soluble solids (g 100 g⁻¹ or °Brix, $\pm$ 0.01°Brix) were determined in shaken samples using an ATC-1e hand refractometer (Atago, Minato-ku, Tokyo, Japan) following the method of the Association of Official Analytical Chemists (1990) (AOAC 932.14). Total insoluble solids (g 100 g⁻¹) were calculated as the relative weight difference (g 100 g⁻¹) between the shaken sample and the resulting supernatant after centrifugation.

Turbidity and Transmittance

Turbidity (nephelometric unit (NTU)) was measured in the upper part of the smoothie (bottle or bag kept in vertical

position) using a 2100N turbidimeter (Hach, Loveland, USA) with an accuracy of ± 0.20 NTU. Transmittance (%) was measured at 660 nm wavelength using pure water as a blank (100 % transmittance). A UV2 Series UV/Vis spectrophotometer (UNICAM, Cambridge, UK) was used.

Instrumental Colour

Instrumental colour was measured in shaken samples using a CR-200/08 Chroma Meter II (Minolta Ltd., Milton Keynes, UK) with D65 illuminant, 2° observer angle and 50 mm aperture size. The results were expressed as CIELAB values: lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*), chroma (C^*) and hue angle (H^*) (sexagesimal degrees) values, calculated as follows: $C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$; $H^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$.

Browning Index

The browning index (absorbance units) was determined according to the method of Ting and Rouseff (1986). A solution of sample in methanol at 1:1 (v/v) was kept on ice for 15 min, and then, the solution was centrifuged at 15,430×g for 10 min in a 5804 Eppendorf centrifuge. The absorbance of the supernatant was measured at 420 nm in an UV2 Series UV/Vis spectrophotometer.

Total Acidity and pH

The total titratable acidity (g citric acid 100 g⁻¹, ± 0.01 g 100 g⁻¹) was quantified in shaken samples by potentiometric titration with 0.1 N NaOH (AOAC 924.15; 1990). The pH was measured in shaken samples with a GLP21 pH meter (Crison, Barcelona, Spain) equipped with a combined electrode Cat. No. 52-21 (Ingold Electrodes, Wilmington, USA) (AOAC 981.12; 1990).

Vitamin C

The total vitamin C content (mg 100 ml⁻¹, ± 0.5 mg 100 ml⁻¹) was calculated as the sum of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHAA) following the method of Gil et al. (1998) with slight modifications. Sample was diluted 3:8 (w/v) in methanol water at 5:95 (v/v) with 0.5 g l⁻¹ citric acid and 0.5 g l⁻¹ ethylenediaminetetraacetic acid. The sample solution was centrifuged for 10 min at 15,430×g and then filtered through syringe filter Chromafil Xtra of 0.20 µm pore size (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). The filtered sample was injected into HPLC for AA determination. For DHAA determination, 3 ml of dilution was reacted with 1 ml of an OPDA solution in a 5:95 methanol/water solution (v/v) (332.72 mg OPDA 100 ml⁻¹). The mixture was kept at 4 °C in darkness for 40 min before analysis and then filtered through a 0.20 µm pore size filter and injected into the HPLC.

The reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) system was made up as follows: L-6200 pump (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany), 2050 Plus autosampler (Jasco Inc., Easton, UK), L-7420 UV detector (Merck-Hitachi) and a Gemini C18 column (300×4.6 mm, 5 µm) connected to a C18 reverse phase guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase used was 5:95 methanol water (v/v) containing 5 mM cetrimide and 50 mM KH₂PO₄ (pH 4.5). The operating conditions were 100 µl injection volume, 260 nm (AA) or 340 nm (DHAA) nm detector wavelength and 0.9 ml min⁻¹ flow rate.

Total Phenols and Flavonoids

Total phenols (mg gallic acid equivalents (GAE), 100 ml⁻¹, ± 2.5 mg 100 ml⁻¹) were determined according to Singleton and Rossi (1965). The absorbance of a yellow compound formed from the reaction between a sample of the ethanolic extract and Folin-Ciocalteu reagent was measured at 765 nm. Total flavonoids (mg quercetin equivalents (QE), 100 ml⁻¹, ± 0.5 mg 100 ml⁻¹) were determined according to the method of Chang et al. (2002). The absorbance of a yellow compound formed by reacting 0.5 ml of a methanolic sample extract with 0.1 ml of 10 % aluminium chloride, 0.1 ml of 1 M potassium acetate and 2.8 ml of water was measured at 415 nm.

Sugars

Sugars (sucrose, glucose and fructose) were determined by HPLC using the method described by Hellin et al. (2001). A water extract sample was filtered through Chromafil Xtra syringe filters of 0.20 µm pore size (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) and then injected into the HPLC system equipped with a L-7490 Lachrome refractive index detector (Merck-Hitachi) and a Carbosep CHO682 lead column (Transgenomic, Elancourt, France). The mobile phase used was pure water (MilliQ). The operating conditions were 20 µl injection volume, 0.4 ml min⁻¹ flow rate and 80 °C temperature. Results were expressed as g 100 ml⁻¹ (± 0.02 g 100 ml⁻¹).

Microbial Analysis

Total viable counts and total psychrophilic bacteria (expressed as log CFU g⁻¹) were determined on a plate count agar (Scharlab, Barcelona, Spain) after incubation at 30 °C for 72 h (ISO 4833 2013) and 4 °C for 7 days, respectively. The detection limit was < 0.1 log CFU g⁻¹.

E. coli and total coliforms (log CFU g⁻¹) were determined in a chromogenic *E. coli*/coliform medium (ChromID Coli, Biomerieux, Madrid, Spain) using pour plating and incubation at 37 °C for 24 h. The detection limit was < 0.1 log CFU g⁻¹.

Moulds and yeasts (log CFU g⁻¹) were counted on Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (Merck, Madrid, Spain) using pour plating and incubation at 25 °C for 5 days. The detection limit was < 0.1 log CFU g⁻¹.

The presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* was investigated in 25 ml of sample, diluted 1/10 in brain-heart infusion (BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) and enriched for 48 h at 37 °C. The presence of the pathogens was determined as described by Stollewerk (2012). Chromogenic *Listeria* agar and real-time polymerase chain reaction (HLY gene) was used for *L. monocytogenes*. In the case of *Salmonella*, samples were incubated in Rappaport Vasiliadis (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) at 41.5 °C for 48 h followed by streaking in CHROMagar™ *Salmonella* plus (Scharlab Sentmenat, Barcelona, Spain) and confirmation by real-time polymerase chain reaction (trr gen).

Results and Discussion

Flavour Retention

The results of triangle sensory test are shown in Table 1. Preliminary screening (qualitative evaluation) showed that all the thermally treated samples were unequivocally characterized by a cooked-fruit flavour, while those pressurized at 600 MPa also developed an off-flavour commonly associated with HPP. All the assessors agreed that both the thermally treated samples and those treated at 600 MPa were clearly different from the others and were rejected due to flavour alterations. Then, samples treated at 350 or 450 MPa were compared with the raw samples using different triangle tests. The tasters correctly selected the odd sample six or less times of the 36 possible identifications. At a $P < 0.05$ level of significance, 18 correct identifications were required, from a total of 36, for differences to be statistically significant between samples. The conclusion was that the sensory panel did not discriminate between smoothie flavours and that the “fresh-like”

Table 1 Number of correct responses of panellists in triangle test involving the flavour of fruit smoothies

Treatments	Correct responses	% Success	<i>P</i>
HPP 350	2	6	n.s.
HPP 450	6	17	n.s.
HPP 600	36	100	***
Thermal	36	100	***

Treatments: HPP (350 and 450 MPa at 10 °C for 5 min, 600 MPa at 10 °C for 3 min), thermal (85 °C for 7 min)

Number of samples analysed per treatment, 36

P probability values; *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$, n.s. $P > 0.05$

fruit flavour was maintained in smoothies pressurized at 350 and 450 MPa.

The main differences in flavour between the smoothies subjected to HPP and the thermal treatment concern the development of a cooked-fruit flavour, as a result of thermal degradation of flavouring compounds during fruit heating (Ludikhuyze et al. 2003). Fruit flavour can also be altered by HPP, depending on the intensity of the applied treatments, among other factors. Most available data correspond to individual fruit products. For example, the application of 200–600 MPa at ambient temperature did not alter the flavour of strawberry purée (Lambert et al. 1999), mandarin juice (Takahashi et al. 1993) or orange-lemon-carrot juice (Fernández-García et al. 2001). In contrast, the application of more intense HPP treatments (500–800 MPa for up to 20 min) modified the flavour of strawberry purée (Lambert et al. 1999) and orange juice (Fernández-García et al. 2001). In other studies, the taste of HPP-treated orange juice was judged more favourably than traditional heat-pasteurized orange juice (Parish 1998; Polydera et al. 2003). In contrast, Keenan et al. (2012a) found no clear differences in the flavour profile or in the levels of some related volatiles, such as limonene or trans-2-hexanal, of thermally ($P_{70} \geq 10$ min) and HPP (450 MPa and 20 °C for 5 min or 600 MPa and 20 °C for 10 min) treated smoothies, containing apple, orange, banana and strawberry. In the above study, the use of HPP led to a partial loss of fresh fruit flavour in smoothies rested during 24 h at 4 °C. The lack of correspondence with our results may be explained by the different ingredients, including thermally treated apple juice, higher temperature and/or the sensory test used by Keenan et al. (2012a). However, our results confirmed that HPP may affect smoothie flavour, although the application of a pressure equal to or below 450 MPa at 10 °C would prevent the development of off-flavours.

Inactivation of Oxidase and Pectic Enzymes

The inactivation of the oxidase and pectic enzymes responsible for oxidation and cloud clarification is another goal in fruit processing. In this respect, there were noticeable differences in the smoothies submitted to the respective treatments. As shown in Table 2, HPP-treated smoothies maintained quite similar PPO, POD and PME enzymatic activities to those presented by raw smoothies, while heating at 85 °C for 7 min was highly effective at inactivating all three enzymes. When the HPP-treated smoothies were compared amongst themselves, no significant differences in the relative activities of POD and PPO were observed, while the application of 600 MPa reduced PME activity by about half, meaning that this enzyme cannot be inactivated without damaging flavour in the HPP-treated smoothies.

The pressure resistance of PME has been reported by others. For example, Bayındırlı et al. (2006) needed to apply

Table 2 Effect of high pressure processing (HPP) versus thermal processing on the enzymatic activities and antioxidant status of fruit smoothies stored at 4 °C for 48 h

	Raw M±SD	HPP350 M±SD	HPP450 M±SD	HPP600 M±SD	Thermal M±SD	P
Enzymatic activity						
Peroxidase (POD) (%)	100.0±1.2 ^a	100.3±2.3 ^a	102.2±5.2 ^a	101.4±4.2 ^a	7.9±3.5 ^b	***
Polyphenol oxidase (PPO) (%)	100.1±5.4 ^a	100.3±8.7 ^a	90.6±7.4 ^a	91.3±11.2 ^a	11.0±12.1 ^b	***
Pectin methyl esterase (PME) (μ g ⁻¹)	2.67±0.68 ^a	2.98±0.70 ^a	2.49±0.69 ^a	1.58±0.62 ^b	0.29±0.08 ^c	***
Antioxidant status						
FRAP (μmol Fe ⁺² eq.100 ml ⁻¹)	303.4±49.7 ^{ab}	259.4±39.0 ^b	263.8±36.8 ^b	264.7±43.0 ^b	349.1±31.1 ^a	***
DPPH (IC ₅₀)	48.9±10.7 ^a	59.1±8.7 ^a	56.0±9.8 ^a	49.2±7.9 ^a	29.8±3.5 ^b	***

Treatments: HPP (350 and 450 MPa at 10 °C for 5 min, 600 MPa at 10 °C for 3 min), thermal (85 °C for 7 min). Means with different superscripts are different at $P\leq 0.05$ (Tukey test)

M±SD mean±standard deviation of triplicate analyses

P probability values; *** $P\leq 0.001$, ** $P\leq 0.01$, * $P\leq 0.05$

450 MPa and 50 °C for 30 min in order to inactivate PME in orange juice, although the sensory quality was not assessed. PME was also partially inactivated in orange juice treated at 400 MPa and 50 °C for 12 min (Nienaber and Shellhammer 2001) and in banana treated at 600 MPa and 10 °C for 2 min (Ly Nguyen et al. 2002), while a slight activation of PME was found by Cano et al. (1997) in orange juice treated at 200 and 400 MPa at 20 °C for 15 min. PME activity in fruit juices is mainly related with cloud stability. PME enzymes hydrolyse methyl esters of galacturonic acid, generating free carboxyl groups and free methanol. The result is the formation of low-methoxyl pectin and even polygalacturonic acid, which can react with Ca⁺² ions present in the medium to form calcium pectate and other water-insoluble compounds, whose deposition leads to a gradual loss of turbidity in fruit juices (Wicker et al. 2003). This can negatively affect the appearance and so, fruit smoothies may require to be shaken before consumption.

PPO and POD enzymes were seen to be even more pressure-resistant than PME enzyme in smoothies. There is no consensus on the potential of HPP for inactivating oxidase enzymes in fruit products. Partial PPO inactivation has been reported in a similar multi-fruit smoothie pressurized at 450–600 MPa (Keenan et al. 2012b) and in a fruit extract pressurized at 300–500 MPa for 5–15 min (Barba et al. 2014). González-Cebrino et al. (2012) reported that HPP was insufficient to inactivate the PPO in plum purée, which required antibrowning ingredients or blanching pre-treatments. Similarly, both POD activation (García-Palazón et al. 2004) as partial POD inhibition (Cano et al. 1997; Barba et al. 2014) were observed in different fruit juices and/or extracts processed by HPP. In our study, PPO and POD remained fully active in the HPP-treated smoothies which were therefore exposed to the oxidizing reactions catalysed by these enzymes. Fruit can suffer browning as a result of polyphenol oxidation

catalysed by PPO (García-Palazón et al. 2004), while POD oxidizes different substrates (phenols and others) at the expense of hydrogen peroxide, resulting in the formation of different products, which may cause changes in the colour and flavour of fruits (Zhang et al. 2005).

Antioxidant Status

Enzymatic and non-enzymatic oxidation reactions can negatively affect smoothie quality. The antioxidant status results (see Table 2) confirmed that the HPP-treated smoothies had a lower antioxidant capacity (higher IC₅₀ and lower FRAP) than the thermally treated smoothies at 48 h post-processing. As can be seen, these differences between treatments may be due to oxidase activities. Keenan et al. (2010) found that the antioxidant capacity (DPPH and FRAP) in a HPP-treated (450 MPa and 20 °C for 5 min) was lost more rapidly than in thermally treated ($P_{70}\geq 10$ min) smoothies kept in refrigeration for up to 30 days and concluded that enzymatic degradation systems were not inactivated by the HPP treatment. Other studies reported no changes in antioxidant capacity immediately after processing as a result of HPP or thermal treatments in fruit extract (Barba et al. 2014), orange juice (Fernández-García et al. 2001; Sanchez-Moreno et al. 2005) and orange juice-milk beverage (Zulueta et al. 2013), while Polydera et al. (2005) found that oxidative stability was greater in HPP-treated (600 MPa and 40 °C for 4 min) than in thermally heated (80 °C for 1 min) orange juice during chilled storage. The differences in fruit matrixes and processing conditions may explain this disparity in the results. Whatever the case, the time elapsing from processing may increase the differences observed in the antioxidant capacity of smoothies treated by HPP and heating, since oxidase enzymes would be active in the former. Our data confirmed that the pressurized smoothies had a higher tendency to oxidation and so

would be less stable under refrigeration. Oxidizing reactions would be particularly favoured in smoothies compared with intact fruit, because mincing and mixing disrupt fruit structures and facilitate contact between enzymes, occluded oxygen and fruit components, which may help to explain the early loss in the antioxidant capacity of smoothies treated by HPP.

Cloud Stability and Discolouration

Smoothie tendency toward cloud clarification and discolouration was objectively assessed by reference to different physical properties. The results are shown in Tables 3 and 4. In general, the HPP-treated smoothies presented physical characteristics similar to those presented by the raw smoothies, with some exceptions. The density and soluble solid content were similar in all the smoothies after shaking, whereas the values of viscosity and turbidity measured in the supernatant were higher in the thermally treated than in the HPP-treated smoothies, indicating that the clarifying tendency may be greater in the latter. When HPP-treated samples were compared among themselves, the absolute viscosity values increased as the pressure level increased; in contrast, smoothie turbidity was not affected by the different conditions used in HPP. According to the transmittance values, translucency was significantly higher in the smoothies treated at 350 MPa than in the thermally treated smoothies, while the samples from the rest of the treatments had intermediate transmittance values. The insoluble solid content was higher in the HPP-treated and thermally treated smoothies than in the raw smoothies, which

suggests a lower tendency to flocculation in the untreated samples.

HPP resulted in a lower consistency and absolute viscosity in orange juices (Parish 1998; Polydera et al. 2005), although no clear differences in transmittance and absolute viscosity were observed in other studies (Bull et al. 2004). The loss of viscosity in cloudy juices may be attributed to pulp precipitation and pectin degradation through enzymatic and non-enzymatic mechanisms (Sila et al. 2009). It is well-known that pectin flocculation is affected by pH in fruit smoothies and juices. As can be seen, the fruit mixture used to elaborate the smoothies in our study resulted in an acidic product, and the values of total titratable acidity and pH were not affected by any preservative treatment. HPP did not result in changes of pH or titratable acidity in orange juice (Bull et al. 2004), blueberry juice (Barba et al. 2013) or an orange juice-milk beverage (Zulueta et al. 2013). Acidification is often associated to differences in the growth rate of lactic acid bacteria, which can be difficult to see at the beginning of storage in pasteurized fruit products. Our physical assessment suggests that the HPP-treated smoothies had a greater tendency towards clarification than the smoothies processed by heating. Parish (1998) reached the same conclusion when assessing cloud stability in orange juice pressurized at 500–700 MPa. In the mentioned study, thermal pasteurization was also more effective than HPP for cloud stabilization. Taking into account the high pressure resistance of PME enzymes, the use of HPP in smoothies should be combined with complementary cloud stabilization strategies. For example, Sun-Waterhouse et al.

Table 3 Effect of high pressure processing (HPP) versus thermal processing on the physical properties of fruit smoothies stored at 4 °C for 48 h

	Raw M±SD	HPP350 M±SD	HPP450 M±SD	HPP600 M±SD	Thermal M±SD	P
Density (g ml ⁻¹)	1.05±0.00	1.05±0.00	1.05±0.00	1.05±0.00	1.05±0.00	
Soluble solids (°Brix)	13.1±1.0	12.9±1.1	13.0±1.0	13.0±1.0	12.9±1.0	
Absolute viscosity (cP)	3.60±0.15 ^d	3.85±0.20 ^{cd}	4.03±0.23 ^c	4.46±0.50 ^b	4.88±0.16 ^a	***
Turbidity (NTU)	416±84 ^b	446±57 ^b	439±24 ^b	489±56 ^b	752±159 ^a	***
Transmittance (%)	26.5±5.8 ^a	24.1±4.5 ^a	21.3±4.0 ^{ab}	20.2±5.0 ^{ab}	15.9±5.4 ^b	***
Insoluble solids (g 100 g ⁻¹)	18.4±1.3 ^b	22.1±2.5 ^a	22.6±1.1 ^a	23.9±1.1 ^a	21.2±2.6 ^a	***
Lightness L* (CIE units)	37.1±3.2 ^b	37.6±2.6 ^b	37.3±2.0 ^b	38.3±2.5 ^b	42.3±2.8 ^a	***
Redness a* (CIE units)	9.7±2.1	10.7±1.6	10.7±1.4	10.6±1.7	9.1±1.9	
Yellowness b* (CIE units)	11.9±3.1	12.3±2.6	12.0±1.5	12.7±2.0	13.3±1.4	
Chroma C* (CIE units)	15.4±3.4	16.4±2.7	16.2±1.5	16.2±2.3	16.1±1.9	
Hue angle H* (CIE units)	50.7±5.8 ^{ab}	49.0±5.0 ^b	48.3±4.8 ^b	50.1±4.5 ^{ab}	55.8±5.1 ^a	*
Browning index (no units)	0.12±0.02	0.11±0.03	0.12±0.03	0.12±0.03	0.10±0.02	
pH	3.8±0.1	3.8±0.0	3.7±0.1	3.7±0.1	3.7±0.1	
Total acidity (g citric acid 100 ml ⁻¹)	0.46±0.04	0.47±0.03	0.45±0.03	0.46±0.02	0.46±0.03	

Treatments: HPP (350 and 450 MPa at 10 °C for 5 min, 600 MPa at 10 °C for 3 min), thermal (85 °C for 7 min). Means with different superscripts are different at $P\leq 0.05$ (Tukey test)

M±SD mean±standard deviation of triplicate analyses

P probability values; *** $P\leq 0.001$, ** $P\leq 0.01$, * $P\leq 0.05$

(2014) proposed the use of carboxymethyl cellulose, a stabilizing agent, to prevent clarification problems in smoothies treated by HPP. In addition, using fruit varieties rich in water-soluble polysaccharides may also help cloud stabilization in the case of fruit smoothies.

As regards colour, the CIELAB coordinates were similar in the raw and HPP-treated smoothies, and so, the “orange” colour was not altered by HPP. In contrast, the application of thermal treatment increased L* value and, to a lesser extent, the H* angle but did not affect the values of a*, b* and C*, resulting in slightly less translucent and browner smoothies. Moreover, the browning index was not affected by thermal treatment or HPP, suggesting that early oxidase activities did not affect colour in the HPP-treated smoothies. Discolouration and non-enzymatic browning following thermal treatment can result from several reactions, including Maillard condensation, caramelisation and the destruction of pigments, such as anthocyanins (Ibarz et al. 2000). Keenan et al. (2011) found the opposite results in a similar smoothie treated by HPP (450 MPa and 20 °C for 5 min) or heating. Unlike our study, HPP led to higher rates of colour change, resulting in a reduction in L*, while L* values were similar in the raw and thermally treated samples. This disparity in the results might be explained by the different raw materials and/or processing conditions used by Keenan et al. (2011). Other studies agree with the results of Keenan et al. (2011). According to Picouet et al. (2015), the use of thermal processing (80 °C for 7 min) provided a carrot juice with a higher browning index and a lower L* than those treated by HPP (600 MPa and 10 °C for 5 min). Similar colour differences were reported in an orange juice-milk beverage (Zulueta et al. 2013). In our study, the reduction in lightness observed in the HPP-treated smoothies may be explained by their greater clarification and

translucency after 48 h of storage. Whatever the case, the discolouration induced by processing might be less relevant in blended fruit homogenates than in smoothies elaborated with individual fruits, which need to have a recognizable colour to satisfy consumer expectations.

Vitamin C, Antioxidants and Sugars

Retention of the main nutrients, including vitamins, antioxidants and sugars, is another relevant aspect of fruit processing. Vitamin C degradation is often considered as a handicap for the nutritional quality of fruit derivatives. As shown in Table 4, the ascorbic acid content was low in smoothies regardless of the preservation treatment. RP-HPLC-UV analysis indicated that most of the vitamin C present in smoothies corresponded to dehydroascorbic acid. The conversion of ascorbic acid into dehydroascorbic acid is catalysed by ascorbate oxidase, although direct oxidation may also occur (Greenway and Ongomo 1990). HPP led to better vitamin C retention than thermal processing with the resulting nutritional benefits. Moreover, the total vitamin C content was not affected by any HPP treatment and had similar levels to that observed in raw smoothies. The pressure resistance of vitamin C has also been seen in other studies. Keenan et al. (2012b) reported that HPP allows better retention of vitamin C, as determined by direct titration, compared with thermally treated smoothies. Similarly, the retention of ascorbic acid was slightly higher in an orange juice-milk beverage pressurized at 400 MPa and 15 °C for 5 min than in those heated at 90 °C for 15 s (Zulueta et al. 2013). The resistance of vitamin C to HPP has also been seen in other results. For example, the use of ultra-HPP (1400 MPa and 1 °C for 4 min) did not affect the

content of ascorbic acid in an orange-lemon-carrot juice (Butz et al. 2003).

On the other hand, there were no differences between treatments in the total contents of phenols and/or flavonoids, and therefore, the use of HPP did not provide any advantage regarding the retention of these phenolic antioxidants compared with thermal treatment. Similar results have been reported in fruit smoothies (Keenan et al. 2011), fruit extract (Barba et al. 2014) and an orange juice-milk beverage (Zulueta et al. 2013), which may be explained by the different antioxidant property oxidation of ascorbic acid and phenols. Phenols can act either as antioxidants or substrates in browning reactions during fruit oxidation (Robards et al. 1999). In general, phenolic antioxidants are considered more resistant than vitamin C to fruit processing (Kalt 2005). Ascorbic acid is the primary antioxidant involved in the oxidation-reduction reactions occurring in fruit. Ascorbic acid can be oxidized to dehydroascorbic acid in the presence of oxidized phenols, converting quinones into their reduced form and protecting phenols against oxidation. Thus, the oxidation of ascorbic acid would be favoured in fruit products rich in phenolic compounds where oxidase enzymes remain active (Gandía-Herrero et al. 2007), as occurred in the HPP smoothies.

Finally, the use of HPP or heating led to changes in the sugar content. The increase observed in the glucose and fructose contents indicated that sucrose hydrolysis took place in the samples treated by HPP, which suggests that β -fructosidase enzymes followed a similar degradation pattern to that followed by oxidase and pectic enzymes. Sucrose inversion has been reported in other fruit products treated by HPP. For example, the incomplete inactivation of β -fructosidase enzymes resulted in the total disappearance of sucrose during the storage of HPP-treated raspberry purée (Butz et al. 2003). On the other hand, thermal inactivation of fruit β -fructosidase has also been well documented in fruit products (Simpson et al. 2012). Our results show that early sucrose inversion occurred in the smoothies treated by HPP, modifying the sugar profile by increasing glucose and fructose.

Microbial Quality Evaluated After 30 Days of Chilled Storage

Before being sold for consumption, smoothies must comply with microbial standards during their shelf life. For this reason, microbial quality was checked in smoothies after 30 days of chilled storage. The microbial counts of smoothies stored for 30 days are shown in Table 5. In general, spoiling and pathogenic bacteria were naturally inhibited in the fruit smoothies. Raw smoothies had total viable counts of 4.2 log CFU g⁻¹, which decreased to 2.3 and 1.3 log CFU g⁻¹ in smoothies treated by HPP and heating, respectively. Thus, pasteurizing at 85 °C for 7 min was only slightly more effective than HPP treatments in inactivating microbes. European Commission Regulation No 2073 (2005) establishes maximum total viable counts of 5 log CFU g⁻¹ for smoothies. Moreover, no counts above the detection limit were found for total psychrophilic bacteria or total coliforms, while *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* were absent in all the smoothie samples, as required by European Commission Regulation No. 2073. All the HPP treatments were also effective against moulds and yeasts, the main microbes involved in the spoilage of fruit juices and purees (Parish and Higgins 1989). Thus, microbial standards can be maintained in smoothies for 30 days without pasteurization, although both HPP and thermal treatment reduced the microbial risk.

Microbial inactivation by HPP has been demonstrated in numerous studies on fruit juices and purees. In general, pressures between 200 and 600 MPa are effective in inactivating most pathogenic and spoilage vegetative microorganisms present in fruit juices over a mild range of temperature (Parish 1998; Bull et al. 2004; Bayindirli et al. 2006; Balasubramaniam and Farkas 2008; Vega-Gálvez et al. 2014). For example, Picouet et al. (2015) reported counts from 0.3 to 3.0 log CFU g⁻¹ for total viable bacteria and counts from <0.1 to 0.8 log CFU g⁻¹ for moulds and yeasts in an HPP-treated (600 MPa and 10 °C for 5 min) carrot juice kept in refrigeration for 29 days. In this study, HPP treatment was

Table 4 Effect of high pressure processing (HPP) versus thermal processing on the major nutrients of fruit smoothies stored at 4 °C for 48 h

	Raw M±SD	HPP350 M±SD	HPP450 M±SD	HPP600 M±SD	Thermal M±SD	P
Antioxidants						
Ascorbic acid (mg 100 ml ⁻¹)	5.1±4.2	4.7±3.7	4.7±3.7	4.6±3.7	3.5±2.8	
Dehydroascorbic acid (mg 100 ml ⁻¹)	37.0±7.0 ^a	34.1±7.9 ^a	32.9±5.7 ^a	33.7±3.7 ^a	22.9±4.6 ^b	***
Vitamin C (AA + DHAA) (mg 100 ml ⁻¹)	42.1±3.5 ^a	37.7±5.3 ^a	37.6±4.6 ^a	38.4±4.2 ^a	26.4±6.0 ^b	***
Phenols (mg GAE 100 ml ⁻¹)	37.1±8.4	34.7±4.7	37.6±4.0	35.9±6.4	39.7±3.1	
Flavonoids (mg QE 100 ml ⁻¹)	6.1±1.4	7.0±1.4	6.6±1.7	7.8±1.3	7.4±1.6	
Sugars						
Sucrose (g 100 ml ⁻¹)	0.37±0.38 ^b	0.32±0.23 ^b	0.39±0.37 ^b	0.44±0.28 ^b	3.46±0.79 ^a	***
Glucose (g 100 ml ⁻¹)	4.50±0.41 ^a	4.42±0.46 ^a	4.51±0.51 ^a	4.48±0.36 ^a	3.37±1.10 ^b	**
Fructose (g 100 ml ⁻¹)	7.22±0.36 ^a	7.11±0.52 ^a	7.27±0.51 ^a	7.22±0.34 ^a	5.66±0.22 ^b	***

Treatments: HPP (350 and 450 MPa at 10 °C for 5 min, 600 MPa at 10 °C for 3 min), thermal (85 °C for 7 min). Means with different superscripts are different at $P \leq 0.05$ (Tukey test)

M±SD mean±standard deviations of triplicate analyses

P probability values; *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$

Table 5 Effect of high pressure processing (HPP) versus thermal processing on the microbial quality of fruit smoothies stored at 4 °C for 30 days

	Raw M±SD	HPP350 M±SD	HPP450 M±SD	HPP600 M±SD	Thermal M±SD	P
Total viable counts (log CFU g ⁻¹)	4.15±0.24 ^a	2.37±0.08 ^b	2.29±0.11 ^b	2.34±0.10 ^b	1.25±0.15 ^c	***
Psychrophilic bacteria (log CFU g ⁻¹)	4.13±0.35	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	
Total coliforms (log CFU g ⁻¹)	2.45±0.58	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	
Moulds and yeasts (log CFU g ⁻¹)	3.51±0.30	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	

Treatments: HPP (350 and 450 MPa at 10 °C for 5 min, 600 MPa at 10 °C for 3 min), thermal (85 °C for 7 min). Means with different superscripts are different at $P \leq 0.05$ (Tukey test). Absence of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in 25 g for all the samples

M±SD mean±standard deviation of triplicate analyses, <LoD below limit of detection

P probability values; *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$

surprisingly more effective than mild heating (80 °C for 7 min) in inhibiting microbial growth. Barba et al. (2012a) obtained a 5-log reduction of *L. plantarum* in an orange juice-milk beverage after pressurization at 200 MPa for 5 min. These authors also reported a reduction of at least 5 log cycles of *L. monocytogenes* in a buffered fruit extract treated at pressures higher than 300 MPa or for holding times in excess of 5 min (Barba et al. 2014). In a recent study, cold pressurizing at 300 MPa for 5 min inactivated *Zygosaccharomyces bailii* and *L. monocytogenes* cultures added to a multi-fruit smoothie elaborated with berries, orange, grape and apple (Scolari et al. 2015). Our results confirmed that it is possible to obtain microbiologically stable smoothies by applying 350 MPa at a cold temperature. The use of higher pressures may alter flavour and/or have no additional antimicrobial effects. As can be seen, microbial quality can be ensured without great difficulty through HPP in acidic smoothies where microbes have little chance to proliferate. It was not necessary to apply HPP, which may alter the flavour to maintain the microbial standards required for smoothies.

Conclusions

The use of “moderate” HPP can be regarded as an alternative to thermal pasteurization for preserving smoothies containing fruits, such as orange, strawberry, apple and banana, whose sensory and nutritional properties can be altered by the pasteurization temperature. Pressurizing at 350 MPa and 10 °C for 5 min retains the fresh-like fruit flavours, ensuring at the same time the microbial quality of smoothies, while the application of more intense pressuring conditions may represent a risk for flavour without providing other quality-related benefits. Moderate HPP treatment also protects vitamin C, does not affect phenol antioxidants, including flavonoids, but results in smoothies with a different sugar profile due to early sucrose hydrolysis. Compared to HPP, thermal processing provides noticeable benefits regarding enzyme inactivation but has clear sensory disadvantages due to the development of cooked-fruit flavours. The high pressure resistance of oxidase and pectic enzymes is probably the main handicap for pressurizing smoothies. These enzymes remained active in the HPP-treated smoothies, and the potential sensory and nutritional benefits of using HPP could be lost because of their potential for clarification and oxidation. Future shelf life studies should be carried out on the possible strategies to decrease the effects of these enzymes on smoothies treated by HPP.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial participation of INIA through project FRUITTECH-RTA2011-00038-C02-02. The authors would also like to acknowledge the contribution of Marta Baret and Jordi Grawia, both from IRTA Monells, Girona (Spain), in the preparation, processing and analysis of the smoothie samples.

References

- AOAC. (1990). *Official methods of analysis*. Virginia: Association of Official Analytical Chemists.
- Balasubramaniam, V. M., & Farkas, D. (2008). High-pressure food processing. *Food Science and Technology International*, 14(5), 413–418.
- Barba, F. J., Cortés, C., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2012a). Study of antioxidant capacity and quality parameters in an orange juice-milk beverage after high-pressure processing treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2222–2232.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2012b). High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(3), 307–322.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50, 545–549.
- Barba, F. J., Criado, M. N., Belda-Galbis, C. M., Esteve, M. J., & Rodrigo, D. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: processing parameter optimization. *Food Chemistry*, 148, 261–267.
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F., & Hizal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganism and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17, 52–58.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bull, M. K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., & Stockman, R. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 135–149.
- Butz, P., Fernández-García, A., Lindauer, R., Dieterich, S., Bognár, A., & Tauscher, B. (2003). Influence of ultrahigh pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering*, 56, 233–236.
- Cano, M. P., Hernandez, A., & De Ancos, B. (1997). High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, 62(1), 85–88.
- Chang, C. C., Yang, M.-H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- European Commission Regulation (EC) No 2073/2005 (OJ L338, p1, 22/12/2005) of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2008). Concise database summary statistics—total population. <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfoodcdb/datexfooddb.htm> Accessed July 2014
- Fernández-García, A., Butz, P., Bognér, A., & Tauscher, B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213(4–5), 290–296.
- Gandia-Herrero, F., Escrivano, J., & García-Carmona, F. (2007). Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1546–1551.
- García-Palazón, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P., & Zabetakis, I. (2004). The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Food Chemistry*, 88, 7–10.
- Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (1998). Effect of modified atmosphere packaging on the flavonoids and vitamin C content

- of minimally processed Swiss chard (*Beta vulgaris Subspecies cycula*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2007–2012.
- González-Cebrino, F., García-Parra, J., Contador, R., Tabla, R., & Ramírez, R. (2012). Effect of high pressure processing and thermal treatment on quality attributes and nutritional compounds of “Songold” plum purée. *Journal of Food Science*, 77(8), 866–873.
- Greenway, G. M., & Ongomo, P. (1990). Determination of L-ascorbic acid in fruit and vegetable juices by flow injection with immobilised ascorbate oxidase. *Analyst*, 115(10), 1297–1299.
- Hellin, P., Ros, J. M., & Laencina, J. (2001). Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. *Carbohydrate Polymers*, 45, 169–174.
- Ibarz, A., Pagán, J., & Garza, S. (2000). Kinetic models of non-enzymatic browning in apple purée. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1162–1168.
- ISO 4120 (2004). Sensory analysis. Methodology. Triangle test. <http://www.iso.org>. Accessed 20 February 2015.
- ISO 4833 (2013). Microbiology of the food chain—horizontal method for the enumeration of microorganisms—part 1: colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. <http://www.iso.org>. Accessed 20 February 2015.
- ISO 8586 (2012). Sensory analysis. General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. <http://www.iso.org>. Accessed 20 February 2015.
- Kalt, W. (2005). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), 11–19.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., Butler, F., Tiwari, B. K., & Patras, A. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 551–556.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., & Butler, F. (2011). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 601–607.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Mitchell, M., Gormley, T. R., & Butler, F. (2012a). Flavour profiling of fresh and processed fruit smoothies by instrumental and sensory analysis. *Food Research International*, 45, 17–25.
- Keenan, D. F., Röble, C., Gormley, T. R., Butler, F., & Brunton, N. P. (2012b). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothie. *LWT—Food Science and Technology*, 45, 50–57.
- Knockaert, G., De Roeck, A., Lemmens, L., Van Bugghenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2011). Effect of thermal and high pressure processes on structural and health-related properties of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry*, 125(3), 903–912.
- Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., & Bouvier, J.-M. (1999). Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chemistry*, 67(1), 7–16.
- Landl, A., Abadias, M., Sárraga, C., Viñas, I., & Picouet, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 557–564.
- Li, R., Wang, Y., Wang, S., & Liao, X. (2015). A comparative study of changes in microbiological quality and physicochemical properties of N₂-infused and N₂-degassed banana smoothies after high pressure processing. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 333–342.
- Lobstein, T., Baur, L., & Uauy, R. (2004). Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obesity Reviews*, 5(1), 4–85.
- López-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas, G. V., Welti-Chanes, J., & Swanson, B. G. (1998). Polyphenoloxidase activity and colour changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 31(8), 549–556.

- Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Indrawati, Smout, C., & Hendrickx, M. (2003). Effects of combined pressure and temperature on enzymes related to quality of fruits and vegetables: from kinetic information to process engineering aspects. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(5), 527–586.
- Ly Nguyen, B., Van Loey, A., Fachin, D., Verlent, I., & Hendrickx, M. (2002). Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 78(6), 683–690.
- Nienaber, U., & Shellhammer, T. H. (2001). High pressure processing of orange juice: kinetics of pectin methylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66(2), 328–331.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(6), 320–328.
- Office of Disease Prevention and Health Promotion. United States Government (2015). Scientific report of the 2015 Dietary Guidelines Advisory Committee. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/2015-scientific-report>. Accessed 10 July 2015.
- Parish, M. E. (1998). Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure. *LWT—Food Science and Technology*, 31, 439–442.
- Parish, M. E., & Higgins, D. P. (1989). Extinction of *Listeria monocytogenes* in single-strength orange juice: comparison of methods for detection in mixed populations. *Journal of Food Safety*, 9, 267–277.
- Patazca, E., Koutchma, T., & Balasubramaniam, V. M. (2007). Quasi-adiabatic temperature increase during high pressure processing of selected foods. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 199–205.
- Patterson, M. F., McKay, A. M., Connolly, M., & Linton, M. (2012). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 30, 205–212.
- Picouet, P. A., Sárraga, C., Cofán, S., Belletti, N., & Guàrdia, M. D. (2015). Effects of thermal and high-pressure treatments on the carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. *LWT—Food Science and Technology*, 62, 920–926.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstitutes orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60, 21–29.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2005). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*, 91, 495–503.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69–112.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitwang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401–436.
- Sampedro, F., Rodrigo, D., & Fan, X. (2010). High hydrostatic pressure processing of fruit juices and smoothies: research and commercial application. In C. Donna, K. Kustin, & F. Feeherry (Eds.), *Case studies in novel food processing technologies: innovations in processing, packaging, and predictive modelling* (pp. 34–72). Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing.
- Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2005). Impact of high-pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice and comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403–4409.

- Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., & Lambri, M. (2015). Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control*, 47, 166–174.
- Sila, D. N., Buggenhout, S. V., Duvetter, T., Fraeye, I., Roeck, D. E., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: part II—structure–function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 86–104.
- Simpson, B. K., Rui, X., & Klomklao, S. (2012). Enzymes in food processing. In B. K. Simpson, L. Nollet, G. Paliyath, S. Benjakul, W. K. Nip, & Y. Hui (Eds.), *Food biochemistry and food processing* (pp. 181–206). New York: Wiley-Blackwell.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Stollewerk, K. (2012). *Food Safety in fast drying (QDS process®) of dry-cured meat products: high pressure and NaCl-free processing implementation* (Ph. D. Thesis). Girona: Universidad de Girona.
- Sun-Waterhouse, D., Bekkour, K., Wadhwa, S. S., & Waterhouse, G. I. N. (2014). Rheological and chemical characterization of smoothie beverages containing high concentrations of fibre and polyphenols from apple. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 409–423.
- Takahashi, Y., Ohta, H., Yonei, H., & Ifuku, Y. (1993). Microbicidal effect of hydrostatic pressure on Satsuma mandarin juice. *International Journal of Food Science and Technology*, 28(1), 95–102.
- Ting, S. V., & Rouseff, R. L. (1986). Vitamins. In S. V. Ting & R. L. Rouseff (Eds.), *Citrus fruits and their products: analysis, technology* (pp. 121–136). New York: Marcel Dekker.
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & Di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58, 519–526.
- Vervoot, L., Van der Plancken, J., Graumet, T., Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., Matser, A. M., et al. (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 466–477.
- Vervoot, L., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Verlinde, P., Matser, A., Hendrickx, M., & Van Loey, A. V. (2012). Thermal versus high pressure processing of carrots: a comparative pilot-scale study on equivalent basis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15, 1–13.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2010). Shelf life and sensory attributes of a fruit smoothie-type beverage processed with moderate heat and pulsed electric fields. *LWT—Food Science and Technology*, 43, 1067–1073.
- Wang, S., Lin, T., Man, G., Li, H., Zhao, L., Wu, J., & Liao, X. (2014). Effects of anti-browning combinations of ascorbic acid, nitrogen and carbon dioxide on the quality of banana smoothies. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 161–173.
- Wicker, L., Ackerley, J. L., & Hunter, J. L. (2003). Modification of pectin by pectin methylesterase and the role in stability of juice beverages. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 809–814.
- Zhang, Z., Pang, X., Xuewu, D., Ji, Z., & Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1–2), 47–52.
- Zhao, L., Wang, Y., Qiu, D., & Liao, X. (2014). Effect of ultrafiltration combined high pressure processing on safety and quality features of fresh apple juice. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 3246–3258.
- Zulueta, A., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Changes in quality and nutritional parameters during refrigerated storage of an orange juice-milk beverage treated by equivalent thermal and non-thermal processes for mild pasteurization. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2018–2030.

Food and Bioprocess Technology: An International Journal
Effects of thermal and high pressure treatments on the microbiological, nutritional and sensory quality of a multi-fruit smoothie
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Effects of thermal and high pressure treatments on the microbiological, nutritional and sensory quality of a multi-fruit smoothie
Article Type:	Original Research
Keywords:	multi-fruit smoothie, high pressure, mild heat, sensory and nutritional properties, shelf-life
Corresponding Author:	Maria Dolors Guàrdia, Ph.D. IRTA Monells, Girona SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	IRTA
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Pierre A. Picouet, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Pierre A. Picouet, Ph.D. Adriana Hurtado, M.D. Anna Jofré, Ph.D. Sancho Bañón, Ph.D. José M. Ros, Ph.D. Maria Dolors Guàrdia, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Fruits juices have become an important product for the healthy food world. In the last five years, sales of industrial juices treated by non-thermal preservation technologies such as high pressure processing (HPP) have strongly increased. In the present study, the effect of the application of two stabilization treatments, mild heating (MH; 80 °C-7 min) and high pressure processing (HPP; 350 MPa-5min), on multi-fruit smoothies was compared on a wide range of quality parameters immediately after treatment and during a refrigerated storage of 21 days. From the physicochemical and instrumental colour point of view, immediately after treatment, HPP smoothies were more similar to the fresh product than those treated by MH. During storage, colour of MH smoothies was more stable although HPP ones showed lower browning index and viscosity more similar to the untreated product. Additionally, HPP provided smoothies with better sensory properties and higher nutritional quality than MH. In general, HPP smoothies were more similar to the untreated product. However, HPP smoothies kept a residual enzyme activity which is likely to limit the shelf life of this multi-fruit smoothie.

1 **Effects of thermal and high pressure treatments on the microbiological, nutritional**
2 **and sensory quality of a multi-fruit smoothie**
3
4
5

6 Pierre A. Picouet^a, Adriana Hurtado^c, Anna Jofré^b, Sancho Bañón^c, José-Maria Ros^c and M.

7 Dolors Guàrdia^{**}.

8
9 ^aFood Technology Programme, IRTA, Finca Camps i Armet 17121 Monells, Spain

10 ^bFood Safety Programme, IRTA, Finca Camps i Armet 17121 Monells, Spain

11 ^cDepartment of Food Science and Technology and Human Nutrition. Faculty of Veterinary

12 Science. University of Murcia, Espinardo, E-30100 Murcia, Spain.

13
14 * dolors.guardia@irta.cat

15 Tel +34 972 630052 ext. 1413

16 Fax +34 972 630373

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

20 Abstract

21 Fruits juices have become an important product for the healthy food world. In the last five years, sales of
22 industrial juices treated by non-thermal preservation technologies such as high pressure processing
23 (HPP) have strongly increased. In the present study, the effect of the application of two stabilization
24 treatments, mild heating (MH; 80 °C-7 min) and high pressure processing (HPP; 350 MPa-5min), on
25 multi-fruit smoothies was compared on a wide range of quality parameters immediately after treatment
26 and during a refrigerated storage of 21 days. From the physicochemical and instrumental colour point of
27 view, immediately after treatment, HPP smoothies were more similar to the fresh product than those
28 treated by MH. During storage, colour of MH smoothies was more stable although HPP ones showed
29 lower browning index and viscosity more similar to the untreated product. Additionally, HPP provided
30 smoothies with better sensory properties and higher nutritional quality than MH. In general, HPP
31 smoothies were more similar to the untreated product. However, HPP smoothies kept a residual enzyme
32 activity which is likely to limit the shelf life of this multi-fruit smoothie.

34 **Keywords:** multi-fruit smoothie, high pressure, mild heat, sensory and nutritional properties, shelf-life

36 1. Introduction

37 Fruit and vegetables are important components of a healthy diet, and their sufficient daily consumption
38 could help prevent major diseases. The World Health Organization recommends a minimum of 400g of
39 fruit and vegetables per day (excluding potatoes and other starchy tubers) for the prevention of chronic
40 diseases such as heart disease, cancer, diabetes and obesity, as well as for the prevention and alleviation
41 of several micronutrient deficiencies, especially in less developed countries. In Europe, fruit and
42 vegetable intake varies between countries (Lobstein, Baur, and Uauy, 2004) but, according to the
43 compiled results of EFSA (2008), the average consumption is 386 g per day.
44 Consumers consider lack of convenience as an important barrier for fruit consumption. According to Briz
45 et al., (2009), the need of washing, peeling, and cutting are difficulties pointed out by the consumers
46 regarding fruit consumption and, this is a reason for the growing demand of ready-to-eat or take-away
47 fruit products. In addition, over the last years there has been an increase in consumer demand for
48 minimally processed foods, more similar to fresh products, without the presence of additives. However,
49 one of the main problems in manufacturing healthy ready-to-eat products, such as those based on fresh
50 fruit and vegetables is their short shelf life. Therefore, extending the shelf life using mild processing
51 technologies that minimally affect the sensory and nutritional properties of these products is a challenge
52 for the food industry.
53 In recent years, fruit-based smoothies have gained in popularity across the world, and are currently one of
54 the major segments of the soft drinks market. This is primarily driven by rising health consciousness
55 among the public and the consumption convenience and taste and naturalness offered by smoothies. From
56 an industrial standpoint, High Pressure Processing (HPP) is used by companies, mainly small and
57 medium size ones, to obtain a high quality product with a good cost/benefit ratio (Rodrigo, Sampedro,
58 Silva, Palop and Martínez, 2010).
59 In general, HPP at low or moderate temperatures causes the inactivation of microbial vegetative cells and
60 enzymes without promoting much change in the sensory and nutritional properties of the food. HPP
61 affects the viability of microbial cells (Patterson, McKay, Comolly and Linton, 2012) and the structure of
62 proteins/enzymes (Lopez-Malo, Palou, Barbosa-Canovas, Welti-Chanes and Swanson, 1998; Rastogi,
63 Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjan and Knorr, 2007), while leaving mostly unaffected low
64 molecular weight food compounds, such as vitamins, pigments, flavouring agents and other compounds
65 related to sensory, nutritional and health properties of the product (Fernández-García, Butz, Bognér, and

Tauscher, 2001; Butz et al., 2003; Nienaber and Shellhammer, 2001a and b; Oey, Lille, Van Loey and Hendrickx, 2008; Barba, Esteve, and Frigola 2012).

Most of the studies published up to date were carried out in single fruit juices such as tomato, orange, apple, watermelon, peach, kiwi and litchi juices (for a review see Chakraborty, Kaushik, Rao and Mishra, 2014) and little research has been conducted into blended fruit products. In multi-fruit smoothies containing sterilized apple juice, Keenan et al. (2010) found that mild thermal treatment had a lower effect on antioxidant activities than HPP at 450 MPa during a storage period of 30 days. More recently, the same group (Keenan, Roble, Gormley, Butler, and Brunton, 2012) confirmed that HPP (450 and 600 MPa), unlike mild heat (MH), was hardly effective in inhibiting fruit enzymes, while all three treatments presented the same degradation pattern for vitamin C. Although the microbiological benefit of HPP treatment in fruit products is well understood, the degradation of nutrient and sensory attributes in a complex matrix including different fruits, such as in smoothies, requires further evaluation. The aim of the present work was to evaluate the effect of both, mild heating and high pressure industrial treatments on the physicochemical parameters, microbiology, nutritional content and sensory properties of a multi-fruit smoothie throughout refrigerated storage to obtain a fresh-like product.

2. Materials and Methods

2.1. Sample preparation

Smoothie formulation was based on commercial smoothies but selected for their sensory properties. Apples (*Pyrus malus* v. *Golden delicious*), strawberries (*Fragaria ananassa* v. *Pájaro*), bananas (*Musa cavendishii* v. *Pequeña enana*), and oranges (*Citrus sinensis* v. *Navel-late*) were purchased from a local stoking house. Smoothie composition by weight consisted of apple juice (33%), orange juice (33%), strawberry (14%), whole apple (10%), and banana (10%). Juices were obtained using a juicer (Robot Coupé C40, Bourgogne, France) and blended to achieve the afore-mentioned composition. Smoothies subjected to HPP were packaged in 250 mL polyethylene terephthalate (PET) bottles (Sunbox, Madrid, Spain), while a specific HT300 pouch (Seal Air Cryovac, Milano, Italy) was used in MH samples. Both packages were selected to avoid the effect of packaging materials on the quality of the smoothie.

For MH treatment, the samples were introduced into an ILRAPLUS autoclave (Ilpra Systems, Mataró, Spain) and heated to 80 °C for 7 min including an initial ramp of 5.7 °C/min, the total heating lasted 27 min. The HPP stabilisation treatment consisted in the pressurization at 350 MPa for 5 min at an initial temperature of 9 - 10 °C in a HPP system Wave 6500 of 120 l (Hiperbaric, Burgos, Spain). The pressure ramp was 200 MPa/min and the total processing time was 7.3 min. After treatments, samples were cooled and stored at 4±1 °C in darkness. Both treatments produce the 5-log reduction in the target pathogen recommended by FDA (FDA 2001, Erkmen et al. 2004).

2.3. Sampling

The different parameters studied were measured on untreated products (Day 0), after MH and HPP treatments (Day 0_{AT}) and throughout refrigerated storage at 4±1 °C (day 7, 14 and 21). Microbiological, physicochemical and nutritional analyses and instrumental colour measurements were taken on three independent samples (3 different 250 mL bottles) per day of sampling. Sensory analysis was carried out using two independent samples (2 different 250 mL bottles) per day of sampling. Two independent experiments (three in the case of microbiological studies) were performed on different days.

2.4 Microbiological analyses

Microbiological analysis was performed to enumerate spoilage (Aerobic Mesophilic Bacteria (AMB), Psychrotrophic Bacteria (PSY) and Yeasts and Moulds (YM)), hygiene (coliforms) and safety (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*). For each sample, an aliquot of 10 mL was diluted (1/10, w/w) with sterile saline peptone water, which contained 1 g/l Bacto Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and 8.5 g/l NaCl (Merck, Darmstadt, Germany). Further decimal dilutions were made using the same diluent. Undiluted fruit smoothie was also sampled. AMB and (PSY) were determined on Plate Count Agar after incubation at 30 °C for 72h and 4°C for 10 days respectively. YM were counted on Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC, Merck) after incubation at 25 °C for 5 days. *Escherichia coli* and Total Coliform Counts (log₁₀ [cfu mL⁻¹]) were determined in a chromogenic *E. coli*/coliforms medium (ChromID Coli, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) after incubation at 37 °C for 24-48 h. All determinations were performed in duplicate using the pour plate method. Counts were expressed in log₁₀ [cfu mL⁻¹]. The detection limit was 1.0 cfu mL⁻¹ (0 log₁₀ [cfu mL⁻¹]).

2.2 Thermal and high-pressure treatments

124 [J]. Additionally, at the end of storage (21 days), the presence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*
125 was investigated in 25 ml of sample (Stollewerk, Jofré, Comaposada, Arnaú and Garriga, 2012).

127 2.5. Physicochemical analyses

128 The degree of clarification in samples (bottle or pouch) kept in vertical position was determined in the
129 upper juice portion by measuring transmittance (%) at 660 nm using pure water as a blank (100%
130 transmittance) in a UV2 Series UVVis spectrophotometer (UNICAM, Cambridge, UK). Total Soluble
131 Solids (TSS), CIELAB colour, pH and total titratable acidity were determined in shaken samples. TSS
132 was determined using an ATC-1e hand refractometer (Atago, Minato-ku, Tokyo, Japan) and expressed as
133 g 100 g⁻¹ or °Brix (±0.01 accuracy and 0-32 range; AOAC 932.14). CIELAB colour was measured with a
134 CR-200/08 Chroma Meter II (Minolta Ltd., Milton Keynes, U K) with D65 illuminant, 2° observer angle
135 and 50 mm aperture size and calibrated with a standard white reflector plate. Readings were obtained
136 applying the standard CIE L*a*b* (1976) colour system, where L* is lightness value, a* indicates hue
137 on a green (-) to red (+) axis, and b* indicates hue on blue (-) to yellow (+) axis. Subsequently, samples
138 were centrifuged at 15430 ×g for 10 min in a 5804 Eppendorf centrifuge (Hamburg, Germany) to
139 determine viscosity of the supernatant and total insoluble solids as described by Ros et al. (2004).
140 Absolute viscosity was measured at 40°C using a No. 100 Ostwald Cannon-Fenske viscometer tube
141 (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Total insoluble solids (TIS) were calculated as the relative weight
142 difference between the shaken sample and the resulting supernatant after centrifugation. Finally,
143 browning index (absorbance units) was determined according the method of Ting and Rouseff (1986). A
144 solution of sample in methanol at 1:1 (v/v) was kept in ice for 15 min and then the solution was
145 centrifuged at 15430 ×g for 10 min in a 5804 Eppendorf centrifuge. The absorbance of the supernatant
146 was measured at 420 nm in a UV2 Series UVVis spectrophotometer. Triplicate measurements were
147 made for each sample. The pH was measured using a Crison pH 25 coupled to a Crison 5053 puncture
148 electrode, (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain).

150 2.6 Determination of the enzymatic activities and antioxidant status

151 Enzymatic activity of Peroxidase (POD) was first extracted in triplicate from the smoothie by mixing 10
152 ml sample with 10 ml 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.5. The mixture was centrifuged for 10 min at
153 15430 ×g. The POD activity was spectrophotometrically measured by adding 1.1 ml 0.2 M sodium
154 phosphate buffer pH 6.5, 0.5 ml enzyme extract, 1 ml o-phenylenediamine solution (10 g/l in 0.2 M

155 sodium phosphate buffer pH 6.5) as substrate (proton donor) and 0.5 ml hydrogen peroxide solution (15
156 g/l in 0.2 M sodium phosphate buffer pH 6.5) as oxidant to a 1 cm path cuvette. The formation of the
157 colored oxidation product (2,3-diaminophenazine) was measured as the change in absorbance at 485 nm
158 and 25 °C for 20 min (Vervoort et al. 2011).

159 Enzymatic activity of Polyphenol oxidase (PPO) was assessed according to the procedure of Wang, et al.
160 (2014) with slight modifications. Samples (3 g) were homogenized in 6 ml 0.2 M sodium phosphate
161 buffer, pH 7.0, containing 10 g l⁻¹ insoluble polyvinyl pyrrolidone (PVP) and 5 g l⁻¹ Triton X-100.
162 Homogenates were centrifuged at 12000 ×g for 10 min and PPO activity was determined by measuring
163 the rate of linear increase in absorbance at 420 nm and 25 °C. Reaction material contained 2 mL of 7 mM
164 4-4-butyl catechol solution, 1 ml of distilled water and 0.2 ml of the extract supernatant, containing the
165 active enzyme. The reference cuvette contained only substrate solution and distilled water. PPO activity
166 was defined as the change in absorbance under conditions of the assay (Δ absorbance min⁻¹ mol).

167 The final results were expressed as relative activities of POD and PPO expressed as percentage, which
168 were calculated as the ratio between the treated (HPP or MH) and the untreated smoothies.

169 The enzymatic activity of pectin methyl esterase (PME) was determined according the method of Li et al.
170 (2015) with slight modifications. PME activity was measured by monitoring the release of free
171 carboxylic groups of galacturonic acid during pectin methyl ester hydrolysis. PME activity was assayed
172 reacting 5ml of sample with 50ml of a 1% (w/v) Citrus pectin solution containing 0.2M NaCl. During
173 pectin hydrolysis, the pH was maintained constant by addition of 0.01 N NaOH using a GLP21 pHmeter
174 (Crison, Barcelona, Spain). The results of PME activity (expressed as PME units g⁻¹) were calculated by
175 using the following formula:

$$176 \quad PME \text{ units } g^{-1} = \frac{ml \text{ NaOH} * normality \text{ of NaOH}}{weight \text{ of sample (g)} * 30 \text{ min}}$$

177 The antioxidant status of smoothies was quantitatively assessed by using the 2,2-diphenyl-1-
178 picrylhydrazyl (DPPH) free radical (radical-scavenging activity) and the ferric ion reducing antioxidant
179 power (FRAP) methods (González-Hidalgo, Bañón and Ros, 2012). DPPH is based on electron-transfer,
180 which produces a violet solution in ethanol. The DPPH is reduced in the presence of antioxidants and the
181 ethanol solution turns yellow. A polynomial regression equation (Nuñez-Manilla, Perez-Wpn, Uribe,
182 Vega-Calvez and Di Scala, 2013) between the total antioxidant activity (TAA = [1-(Abs sample/Abs
183 blank)] x 100) and the concentration of sample was used for quantification. The results (IC₅₀) were
184 expressed as the sample concentration required for capturing half of the DPPH free radicals. The FRAP

185 assay (μmol equivalents Fe^{2+} 100 ml^{-1} ; $\pm 3 \text{ } \mu\text{mol}$ 100 ml^{-1}) was used to measure the antioxidant ability
186 against all the reagent oxidative species. The antioxidant ability was determined from the blue compound
187 formed as a result of the reaction between the sample solution and the FRAP reagent (acetate buffer,
188 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine and ferrous chloride) at 37°C . The absorbance of this compound was
189 measured at 593 nm after 2 min .
190
191 *2.7 Determination of the nutritional quality*
192 Major nutrients (vitamin C, phenols, flavonoids and sugars) were analyzed in the multi-fruit smoothies.
193 The total vitamin C content ($\text{mg } 100\text{ml}^{-1}$; $\pm 0.5 \text{ mg } 100\text{ml}^{-1}$ accuracy) was calculated as the sum of
194 ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHAA) according to the method of Gil et al. (1998) with
195 slight modifications. For AA determination, a purified extract of sample in methanol:water at 5:95 (v:v),
196 0.5g l^{-1} citric acid and 0.5 g l^{-1} ethylenediaminetetraacetic acid were used. For DHAA determination, 3 ml
197 of the above extract was reacted with 1 ml of a solution of o-phenylenediamine (OPDA) in
198 methanol:water at 5:95 (v:v) (332.72 mg OPDA per each 100 ml solution), which was kept at 4°C in
199 darkness for 40 min before analysis. The reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-
200 HPLC) system was made up as follows: L-6200 pump (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany); 2050 Plus
201 autosampler (Jasco Inc., Easton, UK); L-7420 UV detector (Merck-Hitachi); and a Gemini C18 column
202 ($300 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) connected to a C18 reverse phase guard column, both from Phenomenex,
203 Torrance, CA, USA. The mobile phase used was methanol:water containing cetrimide and KH_2PO_4 . The
204 operating conditions were: $100 \text{ } \mu\text{l}$ injection volume, 260 nm (AA) or 340 nm (DHAA) nm detector
205 wavelength and 0.9 ml min^{-1} flow rate.
206 Total phenols ($\text{mg gallic acid equivalents, GAE, } 100 \text{ ml}^{-1}$; $\pm 2.5 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$) were determined according
207 to Singleton and Rossi (1965). The absorbance of a yellow compound formed from the reaction between
208 a sample of the ethanolic extract and Folin-Ciocalteu reagent (containing phosphomolybdate and
209 phosphotungstate) was measured at 765 nm . Total flavonoids ($\text{mg quercetin equivalents, QE, } 100 \text{ ml}^{-1}$;
210 $\pm 0.5 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$) were determined according to the method of Chang et al. (2002). The absorbance of a
211 yellow compound formed by reacting a sample of the methanolic extract with aluminium chloride,
212 potassium acetate and water was measured at 415 nm . The principal sugars (sucrose, glucose and
213 fructose) were determined by HPLC using the method described by Hellin, Ros and Laencina (2001). A
214 water extract sample was directly injected into the HPLC system equipped with a L-7490 Lachrome

215 refractive index detector (Merck-Hitachi) and a Carbosep CHO682 lead column (Transgenomic,
216 Elancourt, France). The mobile phase used was pure water (MilliQ). The operating conditions were: $20 \mu\text{l}$
217 injection volume, 0.4 ml min^{-1} flow rate; and 80°C temperature. Results were expressed as $\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$
218 ($\pm 0.02 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$).
219
220 *2.8. Quantitative Descriptive Analysis (QDA)*
221 The descriptors were generated using open discussion in two previous sessions. The retained descriptors
222 are shown in Table 1. Six selected and trained assessors (ISO 8586-1:1993 and ISO 8586-146 2:1994)
223 undertook the sensory analysis on 50 mL of multi-fruit smoothie. A non-structured scoring scale
224 (Amerine, Pangborn and Roessler, 1965) was used, where 0 meant the absence of the descriptor and 10
225 meant a high intensity of the descriptor. The sensory evaluation was separately performed for each
226 sampling time in 2 sessions using 1 bottle of 250 ml of each treatment per session. A complete block
227 design was used (Steel and Torrie, 1983), where each taster assessed all the batches in each session. Eight
228 sensory sessions per assessor were performed in total. The samples were coded using three random
229 numbers and presented to the assessors, who balanced the first-order effects and the carry-over effects
230 according to MacFie Bratchell, Greenhoff, and Vallis (1989). The average score of the six assessors for
231 each sample and session was recorded and used in the data analysis.
232
233 *2.9. Data analysis*
234 Data was analyzed by means of ANOVA using the GLM procedure of SAS 9.01 (SAS Institute Inc, Cary,
235 USA). The model for microbiological, physicochemical, enzymatic activities and nutritional data
236 included the treatment (Untreated, MH, HPP) and storage time (0_{AT} , 7, 14 and 21 days) as fixed effects
237 and the replicate as random effect. For the sensory data, the model included the treatment, storage time
238 and taste session as fixed effects. Replicate was a random effect. The no significant interactions ($p > 0.05$)
239 were removed from the model. The mean differences between treatments and storage time were tested
240 using the Tukey test ($p < 0.05$).
241
242 **3. Results and discussion**
243 *3.1. Microbiological analysis*

Initial levels of AMB and PSY were ca. 4.4 and 2.5 log cfu/g while YM and coliforms were 3.4 and 2.3 log cfu/g, respectively (Table 2). The application of HPP and MH treatment resulted in significant reductions to the counts of AMB (2.9 ± 1.2 and 0.8 ± 0.9 log units, respectively). Variability in reductions after processing is probably related to differences in the endogenous microbiota of the raw matter used in each of the three independent experiments. The inhibitory effect on PSY, YM and coliforms was higher than in AMB and both treatments reduced the counts of three different groups of microorganisms below the limit of detection.

During subsequent refrigerated storage (21 days at $4 \pm 1^\circ\text{C}$) counts of AMB, PSY, YM and coliforms maintained at the level achieved after stabilization treatment (Table 2). Due to their physicochemical properties, mainly acidity ($\text{pH}=3.6$), the developed multi-fruit smoothie can be considered a refrigerated food with extended shelf life from the microbiological quality point of view. In acidic fruit products submitted to an appropriate hygienization treatment, shelf life is usually more determined by sensory than microbiological quality. The efficiency of both thermal treatments and HPP in acidified foods is widely recognized as low pH not only enhances inactivation during treatment, but inhibits outgrowth of cells sublethally injured by heat or pressure. In this regard, it has been shown for different acidic fruit juices treated at 350 MPa that the levels of aerobic mesophilic bacteria and/or yeast and moulds decreased below the detection limit and no growth was observed during refrigerated storage (Varela-Santos et al., 2012; Lavinas Miguel, Lopes and Valente-Mesquita 2008).

3.2. Instrumental colour and physicochemical analyses

The effect of HPP and MH treatments coupled to a storage of 21 days on different physical and physicochemical parameters are presented in Table 3. Stabilization treatments and storage time did not produce substantial changes on the TSS, pH, TA and TIS of the smoothies. A similar observation on TA was done by Landl, Abadías, Sárraga, Viñas and Picoet (2010) on apple purée pasteurized at 400 MPa. In contrast, the transmittance of the upper juice was not affected by the HPP and MH treatments (day 0_{UH}) but significantly increased from 4.8% at day 7 to 16.3% at day 21, showing a gradual clarification process. On the contrary, the transmittance of the upper juice of the MH samples remained mostly unchanged. For the absolute viscosity, at day 0, MH samples presented a slightly higher value (5.1 cP) with respect to the HPP (3.9 cP) and untreated (3.9 cP) samples. During storage absolute viscosity of MH

samples remained at the same level while gradually diminished from 3.9 at day 0 to 3.0 cP at day 21 and remained during the whole storage period inferior to the one measured for MH samples.

For colour parameters, small differences were found between treatments in L* values at day 0, with a minimum of 37.0 for HPP samples and a maximum of 41.5 for MH samples. For a* values, differences between treatments were observed at day 7, 14 and 21 days. Also a* values (reddish) tended to decrease during storage for MH samples and remained stable for HPP samples. MH produced a small increase in Hue angle (Figure 1) that maintained during the whole storage period and that can be associated with rust-brown tonalities (which agrees with the sensory results). Browning index (B.I.) was similar for treated and untreated samples at day 0 and at day 7 (Table 3). At day 14 and 21, the B.I. slightly increased in MH and decreased in HPP smoothies, indicating a difference ($P<0.05$) between the effect of both treatments. In general, colour changes observed are in agreement with other studies. On a fruit smoothie, Keenan et al. (2010) showed modifications in colour parameters (L* and a*) between untreated samples and HPP samples (450 MPa for 5min) while colour of thermally treated samples remained unaffected during storage. More recently, Yu et al. (2013) reported an important effect on a* values in HPP Chinese bayberry juice (400 MPa for 5 min). In this case, a* value of the control always stood at the highest indicating the most reddish of the juice. Sadlova, Stinzinger Kammerer and Carle (2009), indicated that thermal treatment enhanced the formation of degradation products that can explain colour loss. In view of the results, oxidation and clarification phenomena would have a stronger contribution to the deterioration of pressurized smoothies that browning or acidification, at least in the time period studied. From this point of view, the lesser stability of pressurized fruit derivatives may limit their shelf life compared with the equivalent products pasteurized by mild heating (Oey, Lille, Van Loey and Hendrickx, 2008).

3.3 Changes in enzymatic activities and antioxidant status

The effects of the stabilization treatments and storage time on enzymatic activities and antioxidant status of multi-fruit smoothies are shown in Table 4. Generally, HPP at 350 MPa resulted less effective than MH in inactivating spoiling enzymes. On pressurized smoothies, PPO remained as active as in untreated samples during all the storage time. On the contrary, MH treatment practically inactivated the enzyme, which remained inactive during storage. At day 0, POD enzyme was partially inactivated by the MH treatment while the HPP had no effect on it. During storage, POD activity of MH samples remained at

20% while in HPP samples slightly decreased to 80% at day 21. PME activity of HPP samples was similar to the untreated ones and was around six times higher than in the mild heated smoothies. PME activity was not affected by storage time. PME, PPO and POD are often inactivated by MH treatment but are highly resistant to HPP under commercially feasible conditions in fruit derivatives (Terefle, Buckow, and Versteeg, 2014), although few shelf-life studies have been performed on multi-fruit smoothies. Keenan, Roessle, Gormley, Butler and Brunton (2012) found no clear evolution of PPO activity in multi-fruit smoothies kept under refrigeration for up to 10 hours.

Antioxidant status assay was coherent with observed enzymatic activities. The pressurized smoothies had higher DPPH values and lower FRAP values than the MH smoothies at all sampling days. The results, in accordance to a similar shelf-life study carried out by Keenan et al. (2010), also showed a higher reduction in the antioxidant capacity in the pressurized smoothies, suggesting that oxidative enzymes may contribute to the reduction of the antioxidant capacity, while thermal inactivation of these enzymes would help to stabilize their antioxidant capacity.

3.4 Nutritional quality

The effects of the stabilization treatments and storage time on nutritional quality are shown in Table 5. Most of the vitamin C present in fruit smoothies corresponded to dehydroascorbic acid (DHAA). Fruit processing favors the oxidation of ascorbic acid to DHAA catalyzed by ascorbate oxidase enzyme, although direct oxidation may also occur (Greenway and Ongomo, 1990).

At day 0, even if MH samples presented lower values for ascorbic acid (AA), DHAA and Vitamin C than HPP and untreated samples, the difference was not significant ($P > 0.05$). During storage, a regular decrease could be observed in both sample sets. For AA, a similar reduction of 70% was observed for both HPP and MH samples all along the 21 days. For DHAA, reductions of 64% and 60% were observed in HPP and MH samples, respectively. A similar trend was observed for Vitamin C with a reduction of 65% for HPP samples and 61% for MH samples. Paradoxically, the application of high pressure did not destroy vitamin C but higher reductions in their levels were observed during subsequent storage. This fact could be correlated with the higher activity of PME, PPO and POD and, lower antioxidant capacity of HPP smoothies, although vitamin C can also be degraded by non-enzymatic pathways, in particular, in fruit derivatives treated by heating (Perera, 2007). Keenan, Roble, Gormley, Butler, and Brunton (2012) reported similar results regarding ascorbic acid in fruit smoothies stored at 4°C for up to 10 h. In

addition, Landl et al. (2010) reported a strong reduction of AA, DHAA and vitamin C in apple purée submitted to MH treatment (75°C for 10 min) and HPP (400MPa for 5 min).

In contrast, the total content of phenols and flavonoids were similar in both types of smoothies at day 0. Flavonoids content remained stable for up to 21 days of storage for both treatments. The same can be stated for total phenol content of MH samples while HPP smoothies presented a significant reduction (26%) during storage. This phenomenon was also observed by Keenan et al. (2010) who found a phenol partial degradation in both pressurized and heated fruit smoothies kept under refrigeration for up to 30 days. Phenolic compounds are responsible for antioxidant capacities in fruit, some of them being more resistant than vitamin C to fruit processing (Kalt, 2006). These facts might partially explain why the total content of phenols of MH samples did not decrease during storage.

The effect of stabilization treatments and storage on sucrose, glucose, and fructose are presented in Figure 2. At day 0, HPP and untreated samples present similar sucrose, glucose and fructose contents. During storage of HPP samples, between day 0 and day 7, sucrose content dropped drastically from 0.7 g mL⁻¹ to undetectable level while glucose and fructose remained stable over time. On the contrary, MH samples presented a different pattern; at day 0, sucrose content was 4 times higher, while glucose (-27%) and fructose (-56%) contents were lower in comparison with the values reported for HPP smoothies. During storage, values remained stable. The higher glucose and fructose contents, observed during storage, suggests that total sucrose hydrolysis took place in the pressurized smoothies.

In HPP samples, the sucrose inversion was relevant at day 7; in contrast, the levels of sucrose remained constant in the MH treated smoothies during storage, which indicates that beta-fructosidase enzymes were inactivated by the MH treatment (80°C for 7 min). Butz et al. (2003) found similar results in orange, lemon and carrot mixed juices processed by mild heating and high pressure.

3.5 Effects of processing and storage time on the sensory attributes of the fruit smoothie

The results of the Quantitative Descriptive Analysis (QDA) for untreated (Fresh), HPP and MH samples are shown in Tables 6 (odour, appearance and mouth feeling attributes) and 7 (taste, flavour and overall sensory quality).

The odour of the smoothies was described using four attributes: overall intensity, banana, strawberry and cooked odour. The results of these attributes divide the samples into two groups: untreated-HPP and MH. Untreated and HPP smoothies were characterised by higher intensity of banana and strawberry odour and

lower intensity of the off-odour cooked fruit (Table 6). These results were consistent with those obtained for orange-lemon-carrot mixed juice by Fernández *et al.* (2001), where no differences in aroma were found between non-treated and pressurised (500 MPa; 5 min) juices and Picouet Sàraga, Cofán, Beletti and Guàrdia (2015) in carrot juices (600 MPa; 5 min).

The colour of fruit and vegetable juices is an important attribute in consumer preferences and has been used as an indicator of the sensory and nutritional quality of food during processing treatment and subsequent storage. Regarding the appearance attributes, after the preservation treatment (0_{AT}), HPP samples showed no significant differences regarding those untreated. Dede, Alpaz and Bayindirli (2007) and Picouet *et al.* (2015) reported that for many fruit products, the HP processing was positively valued for the preservation of the fresh colour. Our results are consistent with this finding because on overall, the colour of the HPP samples was most similar to the untreated ones at the beginning of the storage time. Throughout the shelf life, a general deterioration of the colour has been evidenced by a decrease of the coral color intensity and, conversely, an increase of the rust-brown intensity. These changes were clearer in HPP samples and could be related with the higher activity of POD and PPO enzymes (Zabtakis, Leclerc, and Kajda, 2000; Liavoga and Matella, 2012). In addition, these results were in agreement with those of Keenan *et al.* (2010) which stated that thermally processed smoothies exhibited lower colour change than their HPP counterparts. However, at the end of storage, the colour of HPP smoothies was more similar to the untreated product than MH treated ones.

Significant differences regarding sliminess were observed between HPP and MH processed samples. The former samples were scored with lower intensity of sliminess when compared with the latter ones but none of them showed differences with the untreated ones. This result agrees with the higher viscosity showed by MH samples (Table 3). This fact can be related with the higher activity of PME enzyme (Table 4) which is involved in the breakdown of pectin network surrounding the cellulose backbone of the cell wall and thus producing low viscous products (Giovane *et al.*, 2004). Furthermore, HPP samples had lower content of sucrose (Figure 2) than the MH samples (Figure 3) and, this fact could also be related with the viscosity and sliminess attributes. It's known that sucrose might protect PME against denaturation by reducing the water activity of the medium (Chakraborty *et al.*, 2014). In contrast, the MH samples were the grittiest.

Regarding the flavour attributes (Table 7), the MH-processed samples had the lowest fresh fruit flavour (interpreting fresh fruit as higher intensity of banana, strawberry and overall flavour intensity) and the

highest cooked off-flavour, which shows the detrimental effect of the MH treatment on both odour and flavour attributes. According to Farkas and Hoover (2000) and Barbosa-Cánovas and Rodríguez (2002), high pressure levels that are normally used in the food industry cannot disrupt covalent bonds, which maintain unchanged colour, aroma and flavour compounds that are responsible for the sensory quality of food. Throughout the shelf life, MH samples remained stable from a flavour point of view while HPP samples increased in acid taste and decreased in sweet taste. The increase in acid taste may be related with the fact that HP processing is acidic in nature (Chakraborty *et al.*, 2014) and this raise could modify the perception of sweet taste of the samples, as pointed out by Pangborn (1961).

Flavour results can be related with the decrease of the overall sensory quality of HPP samples through the shelf life because most people naturally tend to prefer a sweet taste to an acidic one. Other basic tastes beside sweet (sour, salty, bitter and umami) are more complex to acquire and develop a preference (Sijtsma, Reinders, Hiller and Guàrdia, 2012). Furthermore, regarding the overall sensory quality, no significant differences were observed between untreated (fresh) and HPP smoothies at 0_{AT} (Table 7), and these samples had the highest score. Throughout the storage time, the overall sensory quality of HPP samples significantly decreased while no changes for the MH smoothies were observed. However, overall sensory quality of HPP samples was higher than that of the MH ones. HP-induced enzyme inactivation is very complex phenomenon and most times the application of high pressure without heat treatment is insufficient to achieve complete inactivation of the oxidative enzymes (Chakraborty *et al.*, 2014) which are responsible for the deterioration of colour, flavour and nutritional value of fruit juices (Liavoga and Matella, 2012) and smoothies (Keenan *et al.*, 2010) and negatively affect their hedonic score.

4. Conclusions

The lower stability of the HPP multi-fruit smoothies during storage is confirmed by the fact that HPP is unable to reduce oxidative enzyme activities and changes in instrumental colour and physicochemical parameters were observed. On the nutritional aspect, the degradation of vitamin C was mostly similar in both treatments while MH samples present higher concentration in sucrose. However, HPP better preserved the original colour and flavour of the multi-fruit smoothies and overall, HPP could be an effective alternative to thermal processing for the production of a high quality multi-fruit smoothie although it should be taken into account that the residual enzyme activity is likely to limit the shelf life of the product.

Acknowledgements

This study has been carried out with the financial support from the Spanish Government via the national project FRUITECH (INIA RTA2011- 00038-C02-01). Authors are grateful to Marta Baret and Yolanda Beltrán (IRTA) for their technical assistance.

References

- Amerine, M.A., R.M. Pangborn, E.B. Roessler. 1965. Principles of sensory evaluation of food. *In: Food Science and Technology Monographs*. pp.338-339. Academic Press, New York.
- AOAC Official Method 932.14 Solids in Syrups.
- Barba F.J., Esteve M.J. and Frigola A. (2012). High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(3), 307-322.
- Barbosa-Cánovas, G. V. and Rodríguez, J. J. (2002). Update on non-thermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. *Food Australia*, 54, 513–520.
- Briz T., Sijtsma S.J., Jasielewicz A., Kyriakidi A., Guàrdia M.D., Van Der Berg I. and Van Der Lans I.A. (2009). Barriers to fruit consumption: driving forces behind consumer behaviour. *Scripta Horticulturae*, 8, 7-18.
- Butz P., Fernández-García A., Lindauer R., Dieterich S., Bogriar A. and Tauscher B. (2003). Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *Journal of Food Engineering*, 56, 233-236.
- Chakraborty S., Kaishik N., Srinivasa P. and Mishra H.N. (2014). High-pressure inactivation of enzymes: a review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 578-596.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chem, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
- Dede, S., Alpas A., H., Bayindirli (2007). High 410 hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 773-782.
- Erkmen, O., Dogan, C. (2004) Kinetic analysis of *Escherichia coli* inactivation by high hydrostatic pressure in broth and foods. *Food Microbiology*, 21, 181-185
- European Food Safety Authority (2008). Concise Database summary statistics – Total population. <http://www.efsa.europa.eu/en/datexfooddb/datexfooddb.htm>
- Farkas, D.F., and Hoover, D.G. (2000). High pressure processing. *Journal of Food Science*, 65, 47–64.
- FDA (2001) Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice <https://www.federalregister.gov/articles/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-and-critical-control-point-haccp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and>

Fernández-García, A., Butz, P., Bognár, A., Tauscher, B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213, 290-296.

Gil, M.I., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A. (1998). Effect of modified atmosphere packaging on the flavonoids and vitamin C content of minimally processed Swiss chard (*Beta vulgaris Subspes cycota*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2007-2012.

Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, e., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M. and Camardella, L. (2004). Pectin methylsterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1696 (2), 245-152

González-Hidalgo, I., Bañón, S., and Ros, J.M.(2012). Evaluation of table olive by-product as a source of natural antioxidants. *Food Science and Technology*, 47, 674-681.

Greenway, G.M., and Ongomo, P. (1990). Determination of L-ascorbic acid in fruit and vegetable juices by flow injection with immobilised ascorbate oxidase. *Analyst*, 115, 1297-1299.

Hellin P, Ros J.M. and Laencina J. (2001). Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. *Carbohydrate Polymers*, 45, 169-174.

Juarez-Enriquez, E., Salmeron-Ochoa, I., Gutierrez-Mendez, N. Ramaswamy, H.S., Ortega-Rivas, E. (2015). Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 915-919.

Lobstein, T., Baur, L., Uauy, R. (2004). Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obesity reviews*, 5 (suppl.1), 4-85.

Kalt, W. (2006). Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70(1), 11-19.

Keenan, D.F., Brunton, N.P., Gormley, T.R., Butler, F., Tiwari, B.K., and Patras, A. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 551-556.

Keenan, D.F., Røjle, C., Gormley, R., Butler, F., and Brunton, N.P. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothie. *LWT-Food Science and Technology*, 45, 50-57.

Landl, A., Abadias, M., Sárraga, C., Vñas, I. and Piconet, P.A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 557-564.

Lavinas, F.C. , Miguel, M.A.L. , Lopes, M.L.M. , Valente Mesquita, V.L.(2008). Effect of high hydrostatic pressure on cashew apple (Anacardium occidentale L.) juice preservation. *Journal of Food Science*, 73 (6) 273-277.

Li R., Wang Y., Wang S. and Liao X. (2015). A Comparative Study of Changes in Microbiological Quality and Physicochemical Properties of N-2-Infused and N-2-Degassed Banana Smoothies After High Pressure Processing. *Food Bioprocess Technology*, 8(2), 333-342

Liavoga, A., and Matella, N.J. (2012). Enzymes in quality and processing of tropical and subtropical fruits. In: Siddiq M, editor. *Tropical and subtropical fruits: postharvest physiology, processing and packaging*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. Pp. 35-51.

Lopez-Malo A., Palou E., Barbosa-Canovas G.V., Welis-Chanes J., Swanson, B.G. (1998). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 31(8), 549-556

MacFie, H. J., Bratchell, N., Greenhoff, H., and Vallis, L. V. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall test. *Journal of Sensory Studies*, 4, 129e149.

Nienaber, U. and Shellhammer, T.H. (2001a). High-pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66(2), 328-331

Nienaber, U. and Shellhammer, T.H. (2001b). High-pressure processing of orange juice: Combination treatments and a shelf life study. *Journal of Food Science*, 66(2), 332-336

Núñez-Mancilla Y., Perez-Won M., Uribe E., Vega-Galvez A. and Di Scala K. (2013). Osmotic dehydration under high hydrostatic pressure: Effects on antioxidant activity, total phenolics compounds, vitamin C and colour of strawberry (*Fragaria vesca*). *LWT-Food Science and Technology*, 52(2), 151-156.

Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., and Hendrickx, M. (2008). Effect of high pressure processing on colour, texture and flavor of fruit and vegetable-based food products: a review. *Trends in Foods Science & Technology*, 19(6), 320-328.

Pangborn (1961). Interaction of tastes. In: Maynard A. Amerine, Rose Marie Pangborn and Edward B. Roessler (ed.). *Food Science and Technology. Principles of sensory evaluation of food*. Academic Press, New York, 1965. p. 125.

Patterson, M.F., McKay, A.M., Connolly, M. and Linton, M. (2012). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 30, 205-212.

Perera, C.O. (2007). Minimal processing of fruits and vegetables. In M.S.Rhaman (Ed.), *Handbook of Food Preservation* (pp. 137-148), 2nd ed. CRC Press.

Picouet, P.A., Sárraga, C., Cofán, S., Beletti, N., Guàrdia, M.D. (2015). Effects of Thermal and High Pressure treatments on carotene content, microbiological safety and sensory properties of acidified and of non-acidified carrot juice. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 920-926.

533 Rastogi N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K. and Knorr D. (2007).
534 Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science*
535 *and Nutrition*, 47(1), 69-112
536 Rodrigo D., Sampedro F., Silva A., Palop A. and Martinez A. (2010). New food processing technologies
537 as a paradigm of safety and quality. *British Food Journal*, 112(5), 467-475
538 Ros, J.M., Laencina, J., Hellin, P., Jordán, M.J., Vila, R., Rumpunen, K. (2004). Characterization of juice
539 in fruits of different Chaenomeles species. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37, 301–307.
540 Sadlova, E., Stinzling, F.C., Kammerer, D.R. and Carle, R. (2009). Matrix Dependent Impact of Sugar
541 and Ascorbic Acid Addition on Color and Anthocyanin Stability of Black Carrot, Elderberry and
542 Strawberry Single Strength and from Concentrate Juices upon Thermal Treatment. *Food Research*
543 *International*, 42, 1023-1033.
544 Sijtsma, J., Reinders, M.J., Hiller, S. R.C.H., Guàrdia, M.D. (2012). Fruit and snack consumption related
545 to sweet, sour and salty taste preferences. *British Food Journal*, 114 (7), 1032-1046.
546 Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. (1983). Principles and procedures of statistics. New York: McGraw-Hill,
547 ISBN 0-07-060926-8, 632 pages.
548 Singleton, V. L., and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-
549 phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–153.
550 Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J., and Garriga, M. (2012b). The impact of fast drying
551 (QDS process) and high pressure on food safety of NaCl-free processed dry fermented sausages.
552 *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 89-95.
553 Terefe, N.S., Buckow, R., and Versteeg, C. (2014). Quality-Related enzymes in fruit and vegetable
554 products: effects of novel food processing technologies, Part I: High-pressure processing. *Critical*
555 *Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 24-63.
556 Ting, S.V. and Rouseff, R.L. (1986). Undesirable substances formed during processing and storage. In
557 S.R. Tannenbaum, and P. Walstra. *Citrus Fruit and their Product. Analysis and Technology* (pp 175-
558 182). New York: Marcel Dekker Inc.
559 Varela-Santos, E., Ochoa-Martínez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J.E., Pérez-Won, M., Briones-
560 Labarca, V., Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on
561 physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative*
562 *Food Science and Emerging Technologies*, 13, 13-22.
563 Vervoort, L., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Timmerman R., Mastwijk, H. C, Mäster, A., Hendricks,
564 M., and Van Loey A (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field
565 processes for mild pasteurization of orange juice Part II: Impact on specific chemical and biochemical
566 quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(4), 466-477.

567 Wang, S., Lin, T., Man, G., Li, H., Zhao, L., Wu, J., Liao, X. (2014). Effects of anti-browning
568 combinations of ascorbic acid, nitrogen and carbon dioxide on the quality of banana smoothies. *Food*
569 *and Bioprocess Technology*, 7, 161-173.
570 Yu, Y., Lin, Y., Zhan, Y., He, J., Zhu, S. (2013). Effect of high pressure processing on the stability of
571 anthocyanin, ascorbic acid and colour of Chinese bayberry juice during storage. *Journal of Food*
572 *Engineering*, 119, 701-706.
573 Zabetakis, I., Lederc, D., Kajda, P. (2000). The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry
574 anthocyanins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48 (7), 2749-2754.

Figure Captions

Fig.1 Effects of the HPP and MH stabilization treatments on colour intensity Hue of multi-fruit smoothies kept at 4°C for 21 days. a, b and c indicate significant groups (P>0.05) of storage time and treatment

Fig. 2 Effect of HPP and MH on i) Sucrose, ii) Glucose and ii) Fructose parameters of multi-fruit smoothie kept at 4 °C for up to 21 days. For each graphic, a, b and c indicates significant groups (P>0.05) of storage time and treatment

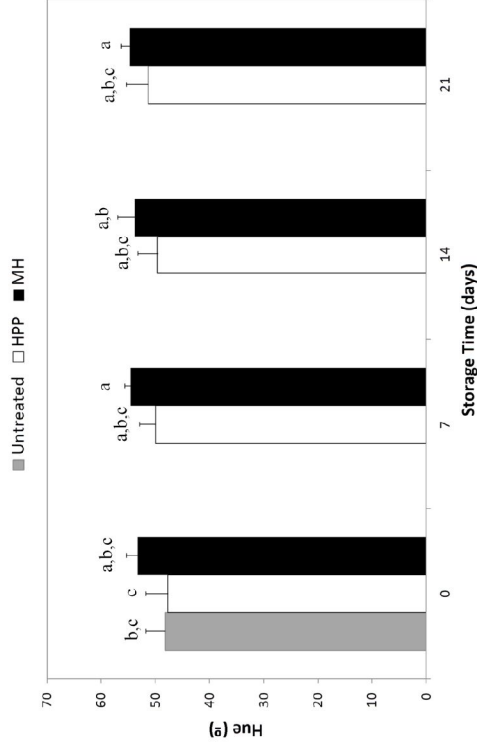


Figure 1

Table 1 Definition of the sensory attributes included in the sensory profile

Attributes	Definition
Appearance	
Coral colour	Evaluation of the intensity of the coral colour
Rust-brown colour	Evaluation of the intensity of rust-brown colour
Odour attributes	
Odour intensity	Evaluation of the intensity of overall odour
Banana odour	Evaluation of the intensity of odour characteristic of banana
Strawberry odour	Evaluation of the intensity of odour characteristic of strawberry
Cooked odour	Evaluation of the intensity of odour characteristic of cooked fruit
Taste and Flavour	
Intensity	Evaluation of the intensity of the flavour
Sweet taste	Basic taste sensation elicited by sugar
Acid taste	Basic taste sensation elicited by an acid
Bitter taste	Basic taste sensation elicited by caffeine
Banana flavour	Intensity of flavour characteristic of banana
Strawberry flavour	Intensity of flavour characteristic of strawberry
Cooked flavour	Intensity of flavour characteristic of cooked fruit
Mouth-feel	
Sliminess	Mouth-feel property rated by the degree to which the juice is thick, coats the mouth and its difficulty to swallow
Grittiness	Mouth feel sensation related with the perception of particles the size of fine sand
Overall sensory quality	Scoring of the sensory quality of the sample by reference to the standard of quality for this product

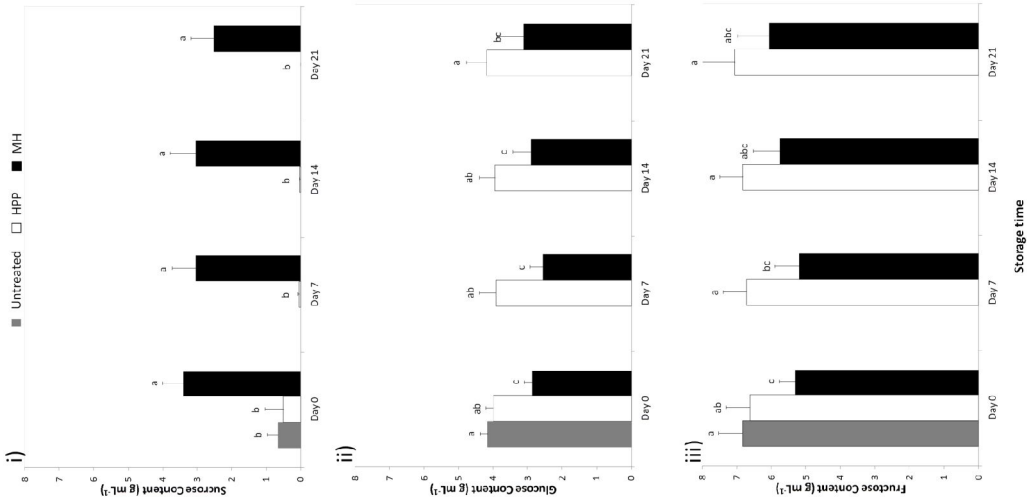


Figure 2

Table 2 Effect of HPP and MH stabilisation treatments on Aerobic Mesophilic (AMB) and Psychrotrophic (PSY) bacteria, Yeasts & Moulds (YM) and Coliforms throughout a storage of 21 days at 4°C. Counts are expressed as Log₁₀(cfu mL⁻¹) and Limit of Detection (LD) is 0 log₁₀cfu mL⁻¹

	Storage day	AMB		PSY		YM		Coliforms	
		M±S _D	M±S _D	M±S _D	M±S _D	M±S _D	M±S _D	M±S _D	M±S _D
Untreated	0	4.4±0.2 ^x		2.5±0.4 ^x		3.4±0.3 ^x		2.3±0.5 ^x	
HPP	7	2.9±1.2		0.8±0.9		0.1±0.2		<LD	
MH	7	1.9±0.6		0.3±0.5		<LD		<LD	
HPP	14	2.9±1.3		1.1±0.7		0.6±0.7		<LD	
MH	14	2.3±0.1		0.3±0.7		0.6±0.7		<LD	
HPP	21	3.0±1.4		<LD		0.3±0.5		<LD	
MH	21	1.8±0.7		<LD		0.3±0.7		<LD	

Stabilisation treatments: untreated; HPP: (High Pressure Processing); MH: (Mild Heating).

M±S_D: Mean ± Standard deviation

^{abs} storage time effects (same processing) for P<0.05.

^{xy} stabilisation treatment effects (same storage time) for P<0.05.

Table 3 Effect of the HPP and MH stabilisation treatments on the chemical-physical traits, transmittance (Trans), total soluble solids (T.SS), CIELAB colour (L*, a* and b*), pH, total titrable acidity (T.T.A.), absolute viscosity (Viscosity), total insoluble solids (T.I.S) and Browning Index (B.I.) of multi-fruit smoothies kept at 4 °C for up to 21 days

Storage day	Trans. %	T.SS. (g/100g)	Viscosity (cP)	I* (CIE units)	a* (CIE units)	b* (CIE units)	pH	T.T.A. (g CA.L ⁻¹)	T.I.S. (g/100g)	B.I. Abs. Unit
Untreated	0	0.3±0.0	12.7±0.4	38.3±2.4 ^{xy}	11.4±0.5	12.9±1.8	3.59±0.20	5.6±1.1	16±4	0.10±0.02
HPP	0 ^{AT}	0.3±0.0	12.8±0.6	37.0±2.6 ^x	10.7±0.7	11.8±1.6	3.63±0.25	5.6±1.0	16±4	0.10±0.03
MH	0 ^{AT}	0.3±0.0	12.6±0.5	41.3±2.3 ^x	10.3±1.1 ^x	14.1±2.5	3.61±0.20	5.4±1.2	16±2	0.09±0.02
HPP	7	4.8±4.1 ^{abs}	12.8±0.3	3.2±1.6 ^{xy}	39.0±2.4	11.0±0.3 ^x	3.56±0.15	5.7±1.2	16±4 ^y	0.10±0.03
MH	7	0.4±0.1 ^y	12.7±0.3	4.8±0.9 ^x	42.0±2.0	10.0±0.9 ^{xy}	3.56±0.13	5.6±1.3	18±2 ^x	0.09±0.02
HPP	14	8.7±7.1 ^{abs}	12.6±0.3	3.3±1.8 ^{xy}	39.9±3.1	11.1±0.3 ^x	3.63±0.02 ^y	5.7±0.6	15±4	0.08±0.01 ^y
MH	14	1.4±1.2 ^y	12.7±0.1	4.8±0.9 ^x	42.4±2.7	10.0±0.5 ^{xy}	3.67±0.03 ^x	5.6±1.0	17±3	0.10±0.02 ^x
HPP	21	16.3±14.1 ^{abs}	12.5±0.2	3.0±1.7 ^{xy}	40.4±3.4	10.5±0.7 ^x	3.64±0.07	6.0±0.9	15±5	0.09±0.00 ^y
MH	21	1.3±2.0 ^y	12.4±0.3	4.8±0.9 ^x	42.6±2.6	9.0±0.6 ^{xy}	3.71±0.10	5.4±0.9	18±3	0.11±0.01 ^x

Stabilisation treatments: Untreated; HPP: (High Pressure Processing); MH: (Mild Heating).

M±S_D: Mean ± Standard deviation

^{abs} storage time effects (same processing) for P≤0.05.

^{xy} stabilisation treatment effects (same storage time) for P≤0.05.

Table 4 Effects of the HPP and MH stabilisation treatments on the enzymatic (POD, PPO, PME) and antioxidant (DPPH and FRAP) activities of multi-fruit smoothies kept at 4 °C for up to 21 days

	Storage day	PPO (%)	POD (%)	PME (– g ¹)	DPPH (IC ₅₀)	FRAP (μmolFe 100mL ⁻¹)
Untreated	0	100±3 ^x	100±2 ^x	2.2±0.3 ^x	33±8	359±135
HPP	0 _{AT}	101±13 ^x	91±5 ^x	2.3±0.3 ^x	35±5	341±93
MH	0 _{AT}	5±6 ^y	23±20 ^y	0.4±0.3 ^y	30±4	424±95
HPP	7	98±7 ^x	93±5 ^x	2.3±0.3 ^x	38±2 ^x	360±73
MH	7	2±3 ^y	20±16 ^y	0.4±0.3 ^y	33±3 ^y	400±45
HPP	14	103±21 ^x	87±16 ^x	2.4±0.3 ^x	42±12	344±57
MH	14	1±2 ^y	17±11 ^y	0.4±0.2 ^y	35±7	387±73
HPP	21	96±9 ^x	78±7 ^x	2.4±0.5 ^x	41±3 ^x	328±16 ^y
MH	21	0±0 ^y	18±14 ^y	0.5±0.3 ^y	35±5 ^y	355±15 ^x

Stabilisation treatments: Untreated; HPP: (High Pressure Processing); MH: (Mild Heating).

POD: Peroxidase; PPO: Polyphenol oxidase; PME: Pectin methyl esterase; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl;

FRAP: Ferric ion reducing antioxidant power.

M±Sp: Mean ± Standard deviation

^{ab} storage time effects (same processing) for P<0.05.

^{xy} stabilisation treatment effects (same storage time) for P<0.05.

Table 5 Effects of the HPP and MH stabilisation treatments on the nutritional quality (AA, DHAA, Vitamin C, Total Phenols and Flavonoids) of fruit smoothies kept at 4 °C for up to 21 days

	Storage day	AA (mg 100mL ⁻¹)	DHAA (mg 100mL ⁻¹)	Vitamin C (mg 100mL ⁻¹)	Total Phenols (mgGAE 100mL ⁻¹)	Flavonoids (mgQE 100mL ⁻¹)
Untreated	0	3.9±0.7	30.1±9.1	34.0±9.7	44±10	10.1±0.7
HPP	0 _{AT}	5.7±1.9 ^a	31.4±11.3 ^a	37.1±13.1 ^a	49±10 ^a	9.6±0.7
MH	0 _{AT}	4.3±2.1 ^a	21.5±3.8 ^a	25.9±5.7 ^a	46±13	9.9±0.5
HPP	7	3.9±2.0 ^{ab}	19.5±6.4 ^b	23.3±7.6 ^b	43±5 ^{ab}	10.0±0.6
MH	7	4.0±0.3 ^a	22.0±8.6 ^a	26.0±8.7 ^a	45±6	10.2±1.6
HPP	14	1.5±2.3 ^b	15.4±5.0 ^{bx}	16.9±4.2 ^{bx}	42±5 ^{ab}	10.8±2.2
MH	14	0.3±0.3 ^b	9.8±1.7 ^{by}	10.1±1.7 ^{by}	43±4	10.8±3.6
HPP	21	1.7±2.7 ^b	11.3±0.7 ^b	13.1±3.0 ^b	36±3 ^b	8.8±0.8
MH	21	1.4±1.6 ^b	8.8±3.5 ^b	10.4±2.3 ^b	40±5	9.8±1.9

Stabilisation treatments: Raw: (untreated); HPP: (High Pressure Processing); MH: (Mild Heating).

AA: ascorbic acid; DHAA: dehydroascorbic acid

M±Sp: Mean ± Standard deviation

^{ab} storage time effects (same processing) for P<0.05.

^{xy} stabilisation treatment effects (same storage time) for P<0.05.

Table 6 Effects of the stabilization treatments (HPP and MH) on sensory attributes related with odour (intensity, banana, strawberry and cooked), aspect (coral colour, brown), texture (viscosity, particles) and overall quality of fruit smoothies kept at 4 °C for up to 21 days

	Storage day	Odour		Appearance		Mouth-feel	
		Intensity		Coral Colour		Rust-Brown	
		Mean±SD		Mean±SD		Mean±SD	
Untreated	0	6.7±1.0 ^a		6.8±1.4 ^a		1.4±1.2 ^a	
HPP	0 _{or}	6.0±1.0 ^a		6.2±1.2 ^a		1.8±1.3 ^b	
MH	0 _{or}	5.9±1.1 ^a		3.4±1.1 ^a		5.0±1.6 ^a	
HPP	7	6.1±0.6		5.9±1.1 ^{ab}		2.3±1.4 ^{ab}	
MH	7	6.3±0.9		3.3±1.1		5.2±1.6	
HPP	14	5.8±0.9		4.9±1.2 ^{bc}		3.5±1.6 ^a	
MH	14	6.3±0.9		2.9±1.1 ^a		5.4±1.6 ^a	
HPP	21	5.7±0.6		4.6±1.2 ^{bc}		3.4±1.5 ^a	
MH	21	6.1±1.0		2.7±1.3 ^a		6.0±1.6 ^a	

Stabilisation treatments: untreated; HPP: (High Pressure Processing); MH: (Mild Heating).

Mean±SD. Mean ± Standard deviation

^{ab} storage time effects (same processing) for P≤0.05.

^{xy} stabilisation treatment effects (same storage time) for P≤0.05.

Table 7 Effects of the stabilization treatments (HPP and MH) on sensory attributes related with taste and flavour (intensity, sweet, bitter, banana, strawberry, acid and off-flavour) and the overall sensory quality of fruit smoothies kept at 4 °C for up to 21 days

	Storage day	Taste and Flavour				Cooked	Banana	Strawberry	Acid	Overall Sensory Quality
		Intensity	Sweet	Bitter						
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
Untreated	0	6.9±0.9 ^a	4.8±1.7	0.9±0.9 ^a		0.1±0.4 ^a	4.2±1.6 ^a	3.4±1.6 ^a	2.5±1.1	7.8±0.9 ^a
HPP	0 _{or}	6.6±1.0 ^a	4.6±1.8 ^a	1.0±0.9 ^{ab}		0.2±0.4 ^a	4.5±1.6 ^a	3.3±1.5 ^a	2.8±1.1 ^b	7.5±1.1 ^a
MH	0 _{or}	6.0±0.9 ^a	3.8±1.6	1.7±1.4 ^a		4.1±1.6 ^a	2.7±1.1 ^a	2.0±1.2 ^a	2.2±1.0	4.9±1.5 ^a
HPP	7	6.3±1.0 ^{ab}	3.6±1.5 ^{ab}	1.6±1.3		0.2±0.6 ^a	3.0±1.6 ^b	2.5±1.3 ^a	3.4±0.9 ^{ab}	6.8±1.0 ^{ab}
MH	7	6.1±1.0	3.4±1.4	1.7±1.5		4.4±1.6 ^a	2.3±1.3	1.7±1.1 ^a	2.0±1.0 ^a	4.8±1.2
HPP	14	6.2±0.6 ^{ab}	3.3±1.2 ^b	1.8±1.3		0.4±0.8 ^a	2.8±1.4 ^b	2.4±1.5	3.3±0.8 ^{ab}	5.9±1.2 ^{bc}
MH	14	6.3±0.8	3.3±1.5	1.9±1.4		4.4±1.5 ^a	2.6±2.3	1.7±1.3	1.9±1.0 ^a	4.7±1.0 ^a
HPP	21	5.8±0.7 ^b	2.9±1.3 ^b	1.6±1.1		0.4±0.6 ^a	2.6±1.5 ^b	2.2±1.2	3.7±1.0 ^a	5.6±1.1 ^{bc}
MH	21	6.1±0.9	2.6±1.2	1.7±1.5		4.5±1.6 ^a	1.9±0.8	1.5±1.3	2.2±1.2 ^a	4.3±0.8 ^a

Stabilisation treatments: untreated; HPP: (High Pressure Processing); MH: (Mild Heating).

Mean±SD. Mean ± Standard deviation

^{ab} storage time effects (same processing) for P≤0.05.

^{xy} stabilisation treatment effects (same storage time) for P≤0.

Journal of Food Science and Technology

Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing. Part I.
Microbial growth, enzyme activity, oxidative and physical stability.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing. Part I. Microbial growth, enzyme activity, oxidative and physical stability.
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Sancho Bañon, Ph D. Universidad de Murcia SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad de Murcia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Adriana Hurtado, Bachellor
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Adriana Hurtado, Bachellor María Dolors Guàrdia, Ph D Pierre Picouet, Ph D Anna Jofré, Ph D José María Ros, Ph D. Sancho Bañon, Ph D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	High Pressure Processing (HPP) has been proposed as a method of stabilizing red fruit-based smoothies for retailing systems. In the first part of this article, microbial counts, enzyme activities, oxidative and physical stability were compared in smoothies treated by HPP (350 MPa for 5 min) and Thermal Processing (TP) (85 °C for 7 min), which were kept at 4 °C for up to 28 days. HPP was seen to be suitable in inhibiting aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria, coliforms, yeasts and moulds. TP was quantitatively more effective than HPP in inactivating microbes but did not provide practical benefits, since pathogenic and altering microbes have little chance to proliferate in smoothies of such low pH (4.x). The main limitation of using HPP was its low efficiency for inactivating the oxidase (polyphenol oxidase and peroxidase) and pectic (pectin methyl esterase) enzymes involved in fruit spoilage. These enzymes are highly pressure-resistant and remained active after HPP. Data concerning the antioxidant status, CIELAB colour, browning index, turbidity, transmittance and absolute viscosity confirmed that the HPP-smoothies have a greater tendency towards oxidation and clarification than the TP-smoothies over storage. This might lead to undesirable sensory and nutritional changes in smoothies, question that is treated in the second part of this article.
Suggested Reviewers:	Catherine Renard, PhD INRA Centre de Avignon, France catherine.renard@avignon.inra.fr Expertise in fruit HPP Francisco Barba, PhD Associate Professor, University of Valencia, Spain Francisco.Barba@uv.es

	Expertise in fruit HPP
	Concepción Sanchez-Moreno, PhD Lead Researcher, Food Science and technology Institute CSIC, Madrid, Spain csanchezm@ictan.csic.es Expertise in vegetable food

1 Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing. Part I.

2 Microbial growth, enzyme activity, oxidative and physical stability.

3
4 Adriana Hurtado¹, Maria Dolors Guàrdia², Pierre Picouet², Anna Jofré², José María Ros¹,
5 Sancho Bañón^{1*}.

6
7 ¹ Department of Food Science & Technology and Human Nutrition. Faculty of Veterinary
8 Science. University of Murcia. E-30071, Murcia, Spain.

9 ² IRTA-Food Technology and Safety Programme, Finca Camps i Armet, E-17121 Monells,
10 Girona, Spain.

13 Highlights

14
15 A HPP moderate treatment was proposed for the pasteurization of red fruit smoothies
16 HPP ensured the microbiological quality and safety during their shelf life
17 However, HPP did not inactivate oxidase and pectic enzymes present in fruit
18 HPP-smoothies had a greater tendency towards oxidation and clarification over storage
19 Although, the use of red fruits improved antioxidant capacity and physical stability

1 Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing. Part I.

2 Microbial growth, enzyme activity, oxidative and physical stability.

3
4 **Keywords**
5
6 Smoothie, high hydrostatic pressure, red fruit, shelf-life.

8 Abstract

9
10 High Pressure Processing (HPP) has been proposed as a method of stabilizing red fruit-based
11 smoothies for retailing systems. In the first part of this article, microbial counts, enzyme
12 activities, oxidative and physical stability were compared in smoothies treated by HPP (350
13 MPa for 5 min) and Thermal Processing (TP) (85 °C for 7 min), which were kept at 4 °C for
14 up to 28 days. HPP was seen to be suitable in inhibiting aerobic mesophilic and
15 psychrotrophic bacteria, coliforms, yeasts and moulds. TP was quantitatively more effective
16 than HPP in inactivating microbes but did not provide practical benefits, since pathogenic and
17 altering microbes have little chance to proliferate in smoothies of such low pH (4.x). The
18 main limitation of using HPP was its low efficiency for inactivating the oxidase (polyphenol
19 oxidase and peroxidase) and pectic (pectin methyl esterase) enzymes involved in fruit
20 spoilage. These enzymes are highly pressure-resistant and remained active after HPP. Data
21 concerning the antioxidant status, CIELAB colour, browning index, turbidity, transmittance
22 and absolute viscosity confirmed that the HPP-smoothies have a greater tendency towards
23 oxidation and clarification than the TP-smoothies over storage. This might lead to undesirable
24 sensory and nutritional changes in smoothies, question that is treated in the second part of this
25 article.

26
27 **Introduction**
28
29 Smoothies consist of a homogenate made with fruit (or less commonly vegetables) and fruit
30 juice, which may contain other ingredients. Many commercial smoothies are based on widely-
31 consumed fruits (e.g. orange, banana or apple) what may also incorporate red fruits, such as
32 strawberry, raspberry, blackberry, red grape or gooseberry, which, due to their high nutritional
33 and sensory values, make smoothies more attractive for consumers. The consumption of fruit
34 juices is stalling or slightly declining in the USA and European Union and the production of
35 smoothies is seen by the industry as an opportunity to offer a new generation of products that
36 can contribute to increasing fruit consumption (European Fruit Juice Association, 2014). The
37 current challenge for industry is to manufacture smoothies that can be associated by
38 consumers with products containing fresh fruit, as an alternative to the fruit smoothies
39 processed by thermal treatments (Deliza et al., 2005).
40
41 High Pressure Processing (HPP) has proven to be an alternative technology to heating for
42 processing fruit and vegetable juices and is well accepted among consumers (Butz et al.,
43 2003). HPP affects the viability of microbial cells and the structure of proteins and enzymes,
44 while leaving mostly unaffected food compounds of low molecular weight, such as vitamins,
45 pigments, flavouring agents and other compounds related to sensory, nutritional and health
46 properties of the product (Butz et al., 2003; Fernández-García et al., 2001; Nienaber and
47 Shellhammer, 2001). HPP is often effective in inactivating most of the pathogenic and
48 spoilage vegetative microorganisms present in fruit juice over a mild range of temperature,
49 while the oxidase and pectic enzymes involved in fruit spoilage are often resistant to HPP
50 (Balasubramanian and Farkas, 2008; Terefe et al., 2014).

51
52 Most of the available studies on HPP-treated products containing red fruits have been
53 performed on individual fruits, such as strawberry, raspberry and blackberry purees (Butz et
54 al., 2003; Cano et al., 1997; Patras et al., 2009), strawberry and raspberry pieces (García-
55 Palazón et al., 2004) and strawberry, blueberry and red grape juices (Barba et al., 2012; Barba
56 et al., 2013; Cao et al., 2012). In general, high pressures of 200-600 MPa at cold or room
57 temperatures have been used for preserving the above products. A preliminary study (Hurtado
58 et al., 2015) found that the application of 350-450 MPa at 10 °C for 5 min did not affect the
59 sensory properties of a multi-fruit smoothie and ensured the microbial quality for 30 days.
60 Thus, HPP moderate treatments could also be used to stabilize red fruit-based smoothies.
61 However, HPP effects are highly dependent on the physical-chemical properties of the food
62 matrix and specific studies are required for each formulation.
63
64 The objective of this study was to evaluate the effects of a moderate HPP treatment (350 MPa
65 for 5 min) and a conventional thermal treatment (85 °C for 7 min) on the quality and stability
66 of red-fruit based smoothies kept in retail conditions. The first part includes aspects such as
67 microbial growth, enzyme activities, oxidative and physical stability, while the second part
68 focuses on the sensory properties and the retention of major nutrients.
69

70 **Material and methods**

71
72 *Sample preparation* Smoothie composition by weight (g 100 g⁻¹) consisted of 20%
73 strawberries (*Fragaria ananassa* v. Pájaro), 20% oranges (*Citrus sinensis* v. Navel-late), 16%
74 apples (*Pyrus malus* v. Golden delicious), 10% bananas (*Musa cavendishii* v. Pequeña enana),
75 10% black grape (*Vitis vinifera* v. Hambuger Moscatel), 10% blackberry (*Rubus glaucus* v.

76 Boysen), 7% gooseberry (*Ribes rubrum* v. Premier Groiselle-raisin), 5% white grape (*Vitis*
77 *vinifera* v. Italy) and 2% lime (*Citrus aurantiifolia* v. acidic lime). Juices were obtained using a
78 juicer (Robot Coupé C40, Bourgogne, France) and blended in a tank to achieve the above-
79 mentioned composition. The fruit mixture resulted in smoothies with a characteristic red-
80 purplish colour and citric traits. After mincing, the pH (3.8±0.0) and total soluble solids
81 (12.2±0.1°Brix) of the different smoothies were checked in each manufacturing batch.
82 Smoothies were assigned to different treatments: (i) Untreated (raw samples); (ii) High
83 Pressure Processing (HPP-smoothies); and (iii) Thermal Processing (TP-smoothies).
84 Smoothies subjected to HPP and those untreated were packaged in 250 mL polyethylene
85 terephthalate (PET) bottles (Sunbox, Madrid, Spain), while a specific HT300 pouch (Seal Air
86 Cryovac, Milano, Italy) was used for the thermally-treated samples. The packed smoothies
87 were kept at 4 °C in darkness for up to one hour before processing.
88
89 *Thermal and high-pressure processing* HPP consisted of pressurization at an initial
90 temperature of 9-10 °C, a feasible industrial working temperature to prevent smoothie
91 overheating during pressurization and to limit the energetic costs derived from water chilling.
92 A 6500/120 industrial machine for HPP was used (Hiperbaric, Burgos, Spain), the main
93 characteristics of which were: throughput, 555 kg per h; vessel capacity, 120 l; vessel
94 diameter inside, 200 mm; and footprint, 37 m². Pressure measurements were made with IS-
95 20H pressure transducers (Wika instrument, Lawrenceville, USA) able to measure pressure
96 from 0 to 689.5 MPa ($\approx$ 100 000 Psi). The initial temperature of the water located at the
97 entrance of the vessel was measured by a pt100 temperature sensor (IFM electronic, El Prat
98 de Llobregat, Spain). For Pmax = 350 MPa, the pressure ramp was 200 MPa min⁻¹, holding
99 time 5 min and total processing time 7 min 18 s. For thermal processing, the samples were
100 introduced into an ILRAPLUS autoclave (Ilpra Systems, Mataró, Spain) and heated to 85 °C

101 for 7 min, including an initial ramp of 5.7 °C min⁻¹. The total heating time was 27 min. After
102 processing, samples were stored 28 days at 4±2 °C in a Climacell 707 cabinet (MMM
103 Medcenter Einrichtungen, München, Germany). Samples were alternatively kept under
104 lighting (100 lx) (12 h) and darkness (12 h). Three different smoothie units (bottle/pouch)
105 from each batch were sampled and analysed at 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage.
106
107 *Microbial analysis* Counts of aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria (expressed as
108 log CFU g⁻¹) were determined on Plate Count Agar (pour plating) after incubation at 30 °C for
109 72 h and 4 °C for 7 days, respectively. Yeasts and moulds (log CFU g⁻¹) were counted on
110 Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (Merck, Madrid, Spain) using pour plating and
111 incubation at 25 °C for 5 days. *E. coli* and enterobacteria (log CFU g⁻¹) were determined in a
112 Rebecca EB (Biomerieux, Madrid, Spain) using pour plating and incubation at 37 °C for 24 h.
113 In all cases the detection limit was 1 CFU g⁻¹ (0 log CFU g⁻¹). The presence of *Salmonella*
114 spp. and *L. monocytogenes* was investigated at the end of storage in 25 ml of sample, which
115 was diluted 1/10 in Brain Heart Infusion (BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey,
116 USA) and enriched for 48 h at 37 °C. Chromogenic *Listeria* agar and real-time Polymerase
117 Chain Reaction (HLY gene) was used for *L. monocytogenes*: incubation in Rappaport
118 Vasiliadis (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, United Kingdom) at 41.5 °C for 48 h, streaking in
119 CHROMagar™ Salmonella plus (Sharlabs Sentmenat, Barcelona, Spain), and confirmation by
120 real-time Polymerase Chain Reaction (trr gen) in the case of *Salmonella*.
121
122 *Enzyme activity* The activities of Peroxidase (POD) and Polyphenol Oxidase (PPO) enzymes
123 were determined at 485 and 420 nm, respectively (UV2 Series UV/Vis spectrophotometer,
124 UNICAM, Cambridge, UK). The results were expressed as percentage of POD and PPO
125 relative activities and were calculated as the ratio between the treated (HPP or TP) and the

untreated smoothies. The activity of Pectin Methyl Esterase (PME) enzyme was determined by titration with NaOH and the results (expressed as PME units g⁻¹) were calculated using the following formula:

$$PME\ units\ g^{-1} = \frac{ml\ NaOH \times normality\ of\ NaOH}{weight\ of\ sample\ (g)} \times 30\ min \quad (1)$$

Antioxidant Activity Assay Free radical scavenging activity was determined using the 2,2-Diphenyl-1-picryl-Hydrazyl (DPPH) method. Total Antioxidant Activity (TAA) was expressed as the inhibition percentage of the DPPH radical and was determined by the following formula:

$$\%TAA = \left(1 - \frac{Abs\ sample}{Abs\ control}\right) \times 100 \quad (2)$$

where TAA is the Total Antioxidant Activity and Abs is the absorbance.

The results (IC₅₀) were expressed as the sample concentration required to capture half of the DPPH free radicals. The reducing power was determined using the Ferric ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. The results were expressed as μmol equivalents Fe²⁺ 100 ml⁻¹ (±3 μmol 100 ml⁻¹).

Physical measurements The pH was measured in shaken samples with a GLP21 pHmeter (Crison, Barcelona, Spain) equipped with a combined electrode Cat. No. 52-21 (Ingold Electrodes, Wilmington, USA). CIELAB colour was measured in shaken samples using a CR-200/08 Chroma Meter II (Minolta Ltd., Milton Keynes, U K) with D65 illuminant, 2° observer angle and 50 mm aperture size. The results are expressed as CIELAB values:

lightness (*L**), redness (*a**) and yellowness (*b**). The browning index (absorbance units) was determined in a solution of sample in methanol at 1:1 (v/v) centrifuged at 15430 *G* for 10 min in a 5804 Eppendorf centrifuge. The absorbance of the supernatant was measured at 420 nm in an UV2 Series UV/Vis spectrophotometer. Turbidity (Nephelometric Units, NTU, ±0.20 NTU) was measured in the upper part of the smoothie (bottle or bag kept in vertical position) using a 2100N turbidimeter (Hach, Loveland, USA). Transmittance (%) was measured at 660 nm using pure water as a blank (100% transmittance). A UV2 Series UV/Vis spectrophotometer (UNICAM, Cambridge, UK) was used. Absolute viscosity was measured in the supernatant from the centrifuged sample kept at 40 °C, using a No. 300 Ostwald Cannon-Fenske viscometer tube (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Absolute viscosity was calculated according to the following formula:

$$V = C \times T \times D \quad (3)$$

where *V* is the absolute viscosity (cP), *C* is the constant for the viscometer (0.24438 mm² s⁻¹), *T* is the holding time (s) and *D* is the density (g ml⁻¹).

Total soluble solids (g 100 g⁻¹ or °Brix, ±0.1 °Brix) were determined in shaken samples using an ATC-1e portable refractometer (Atago, Minato-ku, Tokyo, Japan). For more details on all the analytical methodology used (including references), see Hurtado et al. (2015).

175 ANOVA. A Tukey test was used to compare the Least Significant Means. Sample size was of
176 60 smoothie units (3 bottles x 2 treatments x 5 control days x 2 manufacturing batches).

177 178 179 **Results and discussion**

180
181 *Effects on microbial growth* (Table 1) The levels of aerobic mesophilic bacteria and yeasts and
182 moulds were reduced to <1.8 and $\leq 0.2 \log \text{CFU g}^{-1}$ after the application of HPP and TP,
183 respectively, and psychrotrophic bacteria and enterobacteria decreased in both cases to levels
184 below 0.2 or the limit of detection. At the end of storage, aerobic mesophilic bacteria,
185 psychrotrophic bacteria, yeasts and moulds were 0.6, 0.2 and 0.4 $\log \text{CFU g}^{-1}$, respectively, in
186 HPP-smoothies while *E. coli* and enterobacteria were below the limit of detection, and
187 *Salmonella spp.* and *L. monocytogenes* were absent. The absence of the above mentioned
188 pathogenic bacteria at the end of shelf life is required by European Commission Regulation
189 No.2073 (2005), and levels of aerobic mesophilic bacteria and yeasts and moulds below 4-7
190 and 6 $\log \text{CFU g}^{-1}$, respectively, are generally recommended (HPA, 2009). Therefore, both
191 types of smoothie complied with the above microbial standards until the end of their shelf-
192 life. A similar conclusion was reached in a preliminary study (Hurtado et al., 2015) where the
193 microbial quality of smoothies containing orange, banana, apple and strawberry was checked
194 after 30 days of chill storage. In this study, the use of higher pressure levels (450-
195 600MPa/10°C/3-5min) did not confer any advantage regarding microbial quality, a result that
196 was used to design the present experiment. Microbial inactivation by HPP
197 (300MPa/4°C/5min) has also been achieved in smoothies containing berries, orange, grape
198 and apple that were inoculated with cultures of *Zygosaccharomyces bailii* and *L.*
199 *monocytogenes* (Scolari et al., 2015). The bactericidal effects of HPP have been widely

200 studied in food. In general, lethal high pressure treatments disrupt membrane integrity and
201 denature proteins, including key enzymes involved in food spoilage. Loss of cell viability
202 begins at approximately 180 MPa and the rate of cell inactivation increases exponentially as
203 the pressure increases. The irreversible denaturation of proteins above 300 MPa corresponds
204 to the range of pressure necessary for the inactivation of most vegetative cells (Hauben, et al.,
205 1996). As shown in the present study, the microbiological quality of red fruit smoothies can be
206 guaranteed by the combination of low pH (Table 2) and cold pressurization at 350 MPa.

207
208 *Effects on oxidase and pectic enzymes* (Table 2) The relative activities of PME, PPO and POD
209 enzymes were similar in the raw and HPP-smoothies at day 1, whereas the activities of these
210 enzymes decreased to around 16% (POD), 3.6% (PPO) and four times (PME) in the TP-
211 smoothies. Thus, pectic and oxidase enzymes remained fully active in the HPP-smoothies
212 during storage, which would result in a greater tendency towards oxidation and clarification.
213 Fruit can suffer browning as a result of polyphenol oxidation catalysed by PPO enzymes
214 (García-Palazón et al., 2004), while POD oxidizes different substrates (phenols and others) at
215 the expense of hydrogen peroxide, resulting in the formation of different products that may
216 cause changes in the colour and flavour of fruits (Zhang et al., 2005). This does not mean that
217 the complete inactivation of POD and PPO enzymes provides total stability against oxidation
218 because non-enzymatic reactions such as pigment destruction, Maillard reactions and ascorbic
219 acid degradation can also contribute to browning and the deterioration of flavour in fruit
220 products (Ibarz et al., 2000). Together with oxidation phenomena, cloud clarification, a
221 process starting with pectin demethoxylation by PME, is another major defect in juices. PME
222 enzymes hydrolyse methyl esters of galacturonic acid, generating free carboxyl groups and
223 free methanol. The result is the formation of low-methoxyl pectin and even polygalacturonic
224 acid, which can react with the Ca^{+2} ions present in the medium to form insoluble calcium

pectate and other water insoluble compounds, whose deposition leads to a gradual loss of turbidity in fruit juices (Wicker et al., 2003).

In general, there is no consensus concerning the response of oxidase and pectic enzymes to HPP treatments. The use of moderate pressurizing conditions might even activate these fruit enzymes due to reversible configuration and/or conformation changes in enzyme and/or substrate molecules (Anese et al., 1995). In HPP-smoothies, the application of 350-600 MPa at 10 °C for 3-5 min did not affect PPO or POD activities (Hurtado et al., 2015), while PPO activity was reduced to two thirds when smoothies were pressurized at higher temperature (450MPa/20°C/5min) (Keenan et al., 2012b). POD partial inactivation by HPP was also found in strawberry puree (300MPa/20°C/15°C) (Cano et al., 1997) and in whole strawberry (450MPa/20°C/6 min) (Terefé et al., 2009). Similarly, PPO partial inactivation by HPP has been reported in whole strawberry (400MPa/20°C/5min) (García-Palazón et al., 2004). In contrast, PPO was slightly activated by HPP in strawberry puree (300MPa/20°C/15°C) (Cano et al. 1997) and whole raspberry (400MPa/20°C/5min) (García-Palazón et al., 2004). PME enzymes have also been shown to be resistant to HPP. PME was not inhibited in smoothies treated at 350-400 MPa at 10 °C for 5 min, and a higher pressure (600MPa/10°C/3min) was necessary to reduce PME activity to two thirds (Hurtado et al., 2015). HPP partially inactivated PME in orange juice (450MPa/50°C/30min) (Bayindirli et al., 2006; Nienaber and Shellhammer, 2001) and banana (600MPa/10°C/0 min) (Ly-Nguyen et al., 2002a), while, in contrast, HPP resulted in a slight activation of PME in orange juice (200-400MPa/20°C/15 min) (Cano et al., 1997). The pressure-resistance of PMEs is dependent on the type of fruit; so, strawberry PME was much more stable after HPP treatment (850MPa/10°C/90s) compared with oranges and bananas (Ly-Nguyen et al., 2002b). Despite the difficulty involved in comparing different products and different pressurizing conditions, in accordance with our

results, the literature shows that oxidase and pectic enzymes remain active in fruit treated by HPP.

Effects on oxidative stability (Table 2) The antioxidant capacity of red fruit smoothies was particularly high, approximately double that mentioned for other smoothies elaborated with a lower proportion of red fruits (Keenan et al., 2012b; Hurtado et al., 2015). This result was not unexpected, since red fruits are particularly rich in phenolic antioxidants, such as flavonols, tannins and anthocyanins, among others (Netzel et al., 2002). Neither HPP nor TP affected the antioxidant status immediately (day 1), although differences in the oxidative stability of the smoothies arose during chill storage. The antioxidant capacity of smoothies decreased during the shelf life. FRAP values decreased from day 21 onwards in the TP-smoothies but not in the HPP-smoothies, while DPPH IC₅₀ values increased from day 21 onwards in both types of smoothie. Hence, the HPP-smoothies had a lower antioxidant status than the TP-smoothies at days 14 and 21, but not at day 28, as a consequence of the differences between treatments in the oxidation rate during storage. Other studies reported no change in antioxidant capacity in orange juice after HPP or TP (Fernández-García et al., 2001). Regarding shelf-life studies, Keenan et al. (2010) found that the antioxidant capacity of HPP-smoothies (450MPa/20°C/5min) diminished more rapidly than in TP-smoothies (P₇₀≥10 min) kept in refrigeration for up to 30 days, and concluded that the enzymatic degradation systems were not inactivated by the HPP treatment. Other studies reported the contrary: for example, Polydera et al. (2005) found greater oxidative stability in HPP-treated (600MPa/40°C/4min) than in TP-treated (80°C/1min) orange juice during chill storage (90 days), which would indicate that short TP may be less effective than HPP strong-treatments in inactivating oxidase enzymes in processed fruits. Our results indicate that, if oxidase enzymes are not inactivated by the pasteurization treatment, then smoothies oxidize more quickly during chill storage.

275 However, unlike other smoothies, red fruit smoothies have a high antioxidant capacity, which
 276 may contribute to reducing the effects of oxidation reactions.

277

278 *Effects on colour stability* (Table 3) CIELAB colour was similar in the raw and HPP-
 279 smoothies at day 1, while, in contrast, TP increased the values of L*, a* and b*, leading to a
 280 certain loss of purplish tonality and to the colour becoming lighter. Similarly, there were no
 281 differences in the browning index between raw and HPP-smoothies at day 1, while the TP-
 282 smoothies presented the highest browning index. Both CIELAB colour as the browning index
 283 remained stable in both types of smoothie throughout storage. Fruit browning may be
 284 associated with decreases in a* and/or b*, depending on the original colour of the fruits, while
 285 the browning index is related with the quantity of methanol-soluble brown pigments, i.e.
 286 melanoidines or quinones, formed by oxidation reactions catalysed or not by enzymes. There
 287 are different opinions as to whether HPP or TP allows better colour retention in smoothies. In
 288 smoothies with an orange colour, the use of HPP (350MPa/20°C/5min) did not affect CIELAB
 289 colour or the browning index measured after 2 days of storage (Hurtado et al. 2015); in
 290 contrast, the use of TP (85°C/5 min) decreased the value of L*, as occurred in our study. In
 291 other smoothies with a pink-orange colour, the use of HPP (450MPa/20°C/5min) resulted in
 292 samples with a lower L*, a* and b*, while TP only decreased the value of a*; moreover, in a
 293 shelf-life study (30 days) there was a gradual darkening (reduction in L*) of smoothies treated
 294 by HPP or TP during chill storage, particularly in the former (Keenan, et al., 2012a). Thus,
 295 processing treatments may lead to differences in both colour and the discolouration rate in
 296 smoothies. Whatever the case, the colour of red fruits has been seen to be quite resistant to
 297 HPP. Patras et al. (2009) found better redness retention in strawberry and blackberry purees
 298 treated by HPP (400-600MPa/15 min/10-30°C) than in those treated by TP (70°C/2min).
 299 Strawberry CIELAB colour was not affected by HPP (300MPa/20°C/2-10 min) (Terefe et al.,

300 2009), and similarly, HPP (600MPa/42°C/5min) did not change CIELAB colour in a
 301 blueberry juice (Barba et al., 2012). Regardless of the discolouration pattern of each type of
 302 fruit product, it seems widely accepted that fruit colour is little affected by high pressure,
 303 while heating may produce discolouration in fruit as a result of several reactions, including
 304 Maillard condensation, caramelisation and the destruction of pigments as anthocyanins (Ibarz
 305 et al., 2000). The most noticeable fact in our study was that the colour of red fruit smoothies
 306 remained stable during storage, in contrast to what was observed in other smoothies with a
 307 pink-orange colour (Hurtado et al., 2015; Keenan et al., 2010, 2012a).

308

309 *Effects on cloud stability* (Table 3) Cloud stability is attributed to the suspension of particles
 310 composed of a complex mixture of proteins, pectins, lipids, hemicelluloses, celluloses and
 311 other minor components (Chou and Kokini 1987). The red fruit smoothies showed higher
 312 turbidity than other smoothies elaborated with a lower proportion of red fruits (400-750
 313 NTUs) (Hurtado et al., 2015). The effect of processing on turbidity could only be quantified at
 314 day 28, when NTU decreased below the detection limit. At this storage time, the HPP-
 315 smoothies were less turbid than the TP-smoothies. The percentages of relative transmittance
 316 were very low in both types of smoothie, but confirmed the lower turbidity of the HPP-
 317 smoothies at day 28. The natural turbidity of red fruit smoothies may have contributed to
 318 masking clarification, which would explain the time elapsing until the difference in turbidity
 319 between both treatments could be measured. Other studies have shown that HPP-smoothies
 320 have a greater tendency to clarify than TP-smoothies. Hurtado et al. (2015) reported relative
 321 transmittances of 20% and 16% at 48 h post-processing in smoothies treated by HPP and TP,
 322 respectively. This observation does not contradict the results obtained in the present study,
 323 since clarification can be determined earlier in more translucent samples. Unlike our study,
 324 Bull et al. (2004) found no clear differences in the degree of clarification measured as relative

transmittance of an orange juice treated by HPP (600MPa/20°C/1min) or TP (85°C/25s) after 4 weeks of chill storage, despite the fact that PME enzyme was inactivated by TP, so that cloud clarification could not be associated with pectic activities in the fruit juice.

Absolute viscosity was lower in the HPP-smoothies than in the TP-smoothies throughout the storage period, which agrees with the higher clarification degree observed in the former. There is no agreement regarding whether HPP-smoothies become less viscous than TP-smoothies during chill storage. Keenan et al. (2012a) found no differences between smoothies treated by HPP or TP as regard the consistency coefficient (*K*) and flow (*n*) index measured after processing (24 h) and after chill-storage (30 days). In contrast, Hurtado et al. (2015) found lower absolute viscosity in HPP-smoothies than in TP-smoothies stored for 48 h although, as also occurred in red fruit smoothies, the differences in viscosity were not associated with relevant changes in the content of total soluble solids, as mentioned in other studies on fruit juices (Barba et al., 2013; Bull et al., 2004). In a shelf-life study on HPP-treated (600MPa/25°C/4min) strawberry juice, absolute viscosity decreased by 32.5% after 1 month of storage at 4 °C (Cao et al., 2012). In contrast, Bull et al. (2004) observed no clear effect of processing on the viscosity of chill-stored orange juice. The loss of viscosity in cloudy juices can be attributed to both pectin degradation and pulp precipitation, as a result of enzymatic and non-enzymatic mechanisms (Sila et al., 2009).

Conclusions

A moderate HPP treatment is suitable for the cold pasteurization of red-fruit-based smoothies. TP was quantitatively more effective than HPP in inactivating microbes but did not provide practical benefits, since pathogenic and spoilage microorganisms have little opportunity to

proliferate in smoothies of such low pH kept at chill temperatures. The main limitation of using HPP would be its low effectiveness in inactivating the oxidase and pectic enzymes involved in fruit spoilage. POD, PPO and PME enzymes are highly pressure-resistant and remain active after HPP. Data concerning the antioxidant status, CIELAB colour, browning index, turbidity, transmittance and absolute viscosity confirmed that HPP-smoothies have a greater tendency towards oxidation and clarification than the TP-smoothies. This might lead to undesirable sensory and nutritional changes in smoothies, a question that is treated in the second part of this article. However, red fruit-based smoothies have a high antioxidant capacity and a natural turbidity that may help to minimize the negative effects of the residual activities of these enzymes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial participation of INIA through project FRUTECH-RTA2011-00038-C02-02.

References

- Anese M, Nicoli, MC, Dall'Aglio G, Lericri CR (1995) Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenol oxidase activities. *J Food Biochem* 18:285-293.
- Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A (2013) Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Res Int* 50: 545-549.
- Barba FJ, Jäger H, Meneses N, Esteve MJ, Frigola A, Knorr D (2012) Evaluation of quality changes of blueberry juice during refrigerated storage after high-pressure and pulsed electric fields processing. *Innov Food Sci Emerg* 14:18-24.

375 Balasubramaniam VM, Farkas D (2008) High-pressure food processing. *Food Sci Technol Int*
376 14: 413-418.

377 Bayindirli A, Alpas H, Bozoğlu F, Hizal M (2006) Efficiency of high pressure treatment on
378 inactivation of pathogenic microorganism and enzymes in apple, orange, apricot and
379 sour cherry juices. *Food Control* 17:52-58.

380 Bull MK, Zerdin K, Howe E, Goicoechea D, Paramanandhan P, Stockman R, Sellahewa J,
381 Szabo EA, Johnson RL, Stewart CM (2004) The effect of high pressure processing on
382 the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice.
383 *Innov Food Sci Emerg* 5:135-149.

384 Butz P, Fernández-García A, Lindauer R, Dieterich S, Bognár A, Tauscher B (2003) Influence
385 of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *J Food Eng* 56: 233-
386 236.

387 Cano MP, Hernandez A, De Ancos B (1997) High pressure and temperature effects on enzyme
388 inactivation in strawberry and orange products. *J Food Sci* 62(1):85-88.

389 Cao X, Bi X, Huang W, Wu J, Hu X, Liao X (2012) Changes of quality of high hydrostatic
390 pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innov Food Sci*
391 *Emerg* 16:181-190.

392 Chou T, Kokini JL (1987) Rheological properties and conformation of tomato paste pectins,
393 citrus and apple pectins. *J Food Sci* 52:1658-1664.

394 Deliza R., Rosenthal, A, Abadio FBD, Silva CHO, Castillo C (2005) Application of high
395 pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *J*
396 *Food Eng* 67:241-246.

397 European Commission Regulation (EC) No 2073/2005 (OJ L338, p1, 22/12/2005) of 15
398 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. European Fruit Juice
399 Association (2014) Liquid fruit: Market report. Available from:

400 http://www.citrusbr.com/imgs/biblioteca/AIJN_2014_Liquid_Fruit_Market_Report.pdf
401 f. Accessed 2015 July 24.

402 Fernández-García A, Butz P, Bognér A, Tauscher B (2001) Antioxidative capacity, nutrient
403 content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product
404 after high pressure treatment and storage in different packaging. *Eur Food Res Technol*
405 213(4-5):290-296.

406 García-Palazón A, Suthanthangjai W, Kajda P, Zabetakis I (2004) The effects of high
407 hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red
408 raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Food Chem* 88:7-10.

409 Hauben KJA, Wuytak EJ, Soontjens CF, Michiels CW (1996) High-pressure transient
410 sensitization of *Escherichia coli* to lysozyme and nisin by disruption of outer-
411 membrane permeability. *J Food Protect* 59:350-355.

412 HPA (Health Protection Agency). 2009. Guidelines for assessing the microbiological safety of
413 ready-to-eat foods. London.

414 [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf)
415 [Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf)
416 [eat_foods_on_the_market.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf)

417 Hurtado A, Picouet P, Jofré A, Guàrdia MD, Ros JM, Bañon S (2015) Application of High
418 Pressure Processing for Obtaining “Fresh-Like” Fruit Smoothies. *Food Bioprocess*
419 *Technol* DOI 10.1007/s11947-015-1598-5.

420 Ibarz A, Pagán J, Garza S (2000) Kinetic models of non-enzymatic browning in apple puree. *J*
421 *Sci Food Agric* 80(8):1162-1168.

422 Keenan DF, Brunton NP, Gormley TR, Butler F, Tiwari BK, Patras A (2010) Effect of thermal
423 and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit
424 smoothies. *Innov Food Sci Emerg Tech* 11:551-556.

425 Keenan DF, Brunton NP, Mitchell M, Gormley TR, Butler F (2012a) Flavour profiling of
 426 fresh and processed fruit smoothies by instrumental and sensory analysis. Food Res Int
 427 45:17-25.

428 Keenan DF, Rößle C, Gormley TR, Butler F, Brunton NP (2012b) Effect of high hydrostatic
 429 pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit
 430 smoothie. LWT-Food Sci Technol 45:50-57.

431 Ly Nguyen B, Van Loey A, Fachin D, Verlent I, Hendrickx M (2002a) Purification,
 432 Characterization, Thermal, and High-Pressure Inactivation of Pectin Methyltransferase
 433 from Bananas (*cv Cavendish*). Biotech Bioeng 78(6):683-690.

434 Ly Nguyen B, Van Loey A, Smout C, Ozcan S, Fsachin D, Verlent I, Duvetter T, Vu ST,
 435 Smout C, Hendrickx ME (2002b) Strawberry pectin methyltransferase (PME):
 436 Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. Biotech Progress
 437 18:1447-1450.

438 Netzel M, Strass G, Kaul C, Bitsch I, Dietrich H, Bitsch R (2002) In vivo antioxidative
 439 capacity of a composite berry juice. Food Res Int 35:213-216.

440 Nienaber U, Shellhammer TH (2001) High pressure processing of orange juice: kinetics of
 441 pectinmethyltransferase inactivation. J Food Sci 66(2):328-331.

442 Patras A, Brunton NP, Pieve SD, Butler F (2009) Impact of high pressure processing on total
 443 antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of
 444 strawberry and blackberry purées. Innov Food Sci Emerg 10:308-313.

445 Polydera AC, Stoforos NG, Taoukis PS (2005) Effect of high hydrostatic pressure treatment
 446 on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. Food Chem 91:
 447 495–503.

448 Scolari G, Zaccaroni C, Busconi M, Lambri M (2015) Effect of the combined treatments of
 449 high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria*
 450 *monocytogenes* in smoothies. Food Control 47:166-174.

451 Sila DN, Buggenhout SV, Duvetter T, Fraeye I, Roeck DE, Van Loey A, Hendrickx ME
 452 (2009) Pectins in processed fruits and vegetables: Part II-Structure-function
 453 relationships. Compr Rev Food Sci F 8:86–104.

454 Terefe NS, Buckow R, Versteeg C (2014) Quality-related enzymes in fruit and vegetable
 455 products: effects of novel food processing technologies. Part 1: High-pressure
 456 processing. Crit Rev Food Sci 54:24-63.

457 Terefe NS, Matthies K, Simons L, Versteeg, C (2009) Combined high pressure-mild
 458 temperature processing for optimal retention of physical and nutritional quality of
 459 strawberries (*Fragaria*ananassa*). Innov Food Sci Emerg 11:52-60.

460 Wicker L, Ackerley JL, Hunter JL (2003) Modification of pectin by pectinmethyltransferase and
 461 the role in stability of juice beverages. Food Hydrocolloid 17:809-814.

462 Zhang Z, Pang X, Xuewu D, Ji Z, Jiang Y (2005) Role of peroxidase in anthocyanin
 463 degradation in litchi fruit pericarp. Food Chem 90(1-2):47-52.

Table 1. Effects of processing treatment on the microbial counts and pH of red fruit smoothies kept at 4 °C for up to 28 days.

	Storage day	Acrobic mesophilic bacteria		Psychrotrophic bacteria		Yeasts and moulds		pH
		M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	
Raw	1	3.5±0.3 ^x	2.5±0.4	3.3±0.12	3.3±0.0	3.3±0.0	3.3±0.0	
HPP	1	1.8±0.9 ^y	<LoD	1.5±0.12 ^a	3.3±0.0	3.3±0.0	3.3±0.0	
TP	1	0.2±0.3 ^z	<LoD	<LoD	3.3±0.0	3.3±0.0	3.3±0.0	
HPP	7	1.1±0.4 ^x	0.5±0.8	1.4±0.16 ^a	3.4±0.0	3.4±0.0	3.4±0.0	
TP	7	0.3±0.3 ^y	<LoD	<LoD	3.4±0.0	3.4±0.0	3.4±0.0	
HPP	14	0.9±0.2 ^x	0.2±0.4	0.9±0.12 ^b	3.4±0.0	3.4±0.0	3.4±0.0	
TP	14	0.1±0.2 ^y	<LoD	<LoD	3.4±0.0	3.4±0.0	3.4±0.0	
HPP	21	0.8±0.3 ^x	<LoD	0.9±0.16 ^b	3.3±0.0	3.3±0.0	3.3±0.0	
TP	21	0.4±0.3 ^y	<LoD	<LoD	3.4±0.0	3.4±0.0	3.4±0.0	
HPP	28	0.6±0.3 ^x	0.2±0.3	0.4±0.16 ^c	3.2±0.0 ^y	3.2±0.0 ^y	3.2±0.0 ^y	
TP	28	0.2±0.3 ^y	<LoD	<LoD	3.4±0.0 ^x	3.4±0.0 ^x	3.4±0.0 ^x	

Treatments: Raw (untreated); HPP: High Pressure Processing; TP: Thermal Processing.

M±SE: Mean ± Standard Error.

^{x,y,z} processing (same storage time) and ^{a,b,c,d} storage time effects (same treatment) for P≤0.05.

Units: Log CFU g⁻¹

<LoD: Below Limit of Detection.

Table 2. Effects of processing treatment on the enzymatic activity and antioxidant status of red fruit smoothies kept at 4 °C for up to 28 days.

	Storage day	POD		PPO		PME		FRAP		DPPH IC ₅₀	
		M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE
Raw	1	100.2±3.8 ^x	100.7±2.8 ^x	100.7±2.8 ^x	1.2±0.1 ^x	1.2±0.1 ^x	705.1±36.5	20.1±0.4	20.1±0.4	20.1±0.4	20.1±0.4
HPP	1	94.3±1.6 ^x	98.4±2.8 ^x	98.4±2.8 ^x	1.2±0.1 ^x	1.2±0.1 ^x	695.5±32.3	21.0±0.4 ^{bc}	21.0±0.4 ^{bc}	21.0±0.4 ^{bc}	21.0±0.4 ^{bc}
TP	1	16.2±4.4 ^y	3.6±1.6 ^y	3.6±1.6 ^y	0.3±0.0 ^y	0.3±0.0 ^y	757.6±57.3 ^a	19.6±0.5 ^b	19.6±0.5 ^b	19.6±0.5 ^b	19.6±0.5 ^b
HPP	7	103.8±2.6 ^x	106.2±4.6 ^x	106.2±4.6 ^x	1.3±0.1 ^x	1.3±0.1 ^x	624.4±53.9	19.5±0.3 ^c	19.5±0.3 ^c	19.5±0.3 ^c	19.5±0.3 ^c
TP	7	9.5±1.4 ^y	5.9±3.0 ^y	5.9±3.0 ^y	0.4±0.0 ^y	0.4±0.0 ^y	667.6±69.9 ^{ab}	18.8±0.6 ^b	18.8±0.6 ^b	18.8±0.6 ^b	18.8±0.6 ^b
HPP	14	99.6±2.7 ^x	103.0±4.1 ^x	103.0±4.1 ^x	1.5±0.1 ^x	1.5±0.1 ^x	633.7±30.4 ^y	22.7±1.4 ^{abx}	22.7±1.4 ^{abx}	22.7±1.4 ^{abx}	22.7±1.4 ^{abx}
TP	14	11.8±2.1 ^y	4.9±2.2 ^y	4.9±2.2 ^y	0.4±0.0 ^y	0.4±0.0 ^y	713.3±35.4 ^{abx}	21.2±0.7 ^{by}	21.2±0.7 ^{by}	21.2±0.7 ^{by}	21.2±0.7 ^{by}
HPP	21	97.7±2.7 ^x	111.4±4.9 ^x	111.4±4.9 ^x	1.2±0.1 ^x	1.2±0.1 ^x	611.2±23.7 ^y	24.0±0.5 ^{ax}	24.0±0.5 ^{ax}	24.0±0.5 ^{ax}	24.0±0.5 ^{ax}
TP	21	9.7±3.1 ^y	0.37±0.4 ^y	0.37±0.4 ^y	0.3±0.1 ^y	0.3±0.1 ^y	658.5±25.2 ^{bx}	25.2±1.2 ^{ay}	25.2±1.2 ^{ay}	25.2±1.2 ^{ay}	25.2±1.2 ^{ay}
HPP	28	101.3±3.4 ^x	105.1±1.6 ^x	105.1±1.6 ^x	1.2±0.1 ^x	1.2±0.1 ^x	627.2±34.8	23.9±1.3 ^a	23.9±1.3 ^a	23.9±1.3 ^a	23.9±1.3 ^a
TP	28	9.4±3.1 ^y	0.0±0.0 ^y	0.0±0.0 ^y	0.3±0.1 ^y	0.3±0.1 ^y	666.1±26.7 ^b	24.3±1.5 ^a	24.3±1.5 ^a	24.3±1.5 ^a	24.3±1.5 ^a

Treatments: Raw (untreated); HPP: High Pressure Processing; TP: Thermal Processing.

M±SE: Mean ± Standard Error.

^{x,y,z} processing (same storage time) and ^{a,b,c,d} storage time effects (same treatment) for P≤0.05.

Units: Polyphenol Oxidase (POD): % relative activity; Pectin methyl esterase (PME): PMEu g⁻¹; Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP): µmol Fe²⁺ 100ml⁻¹; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical: IC₅₀.

Table 3. Effects of processing treatment on the colour and cloud stability of fruit smoothies kept at 4 °C for up to 28 days.

Storage day	L*		a*		b*		Browning index		Turbidity	Transmittance		Viscosity		Soluble solids	
	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE		M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE	M±SE
Raw 1	23.1±0.61 ^y	20.0±0.51 ^y	-1.9±0.4 ^y	0.32±0.02 ^y	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	0.27±0.00	0.27±0.00	4.8±0.3 ^y	12.8±0.1	12.8±0.1	12.8±0.1
HPP 1	24.1±1.08 ^y	20.7±0.56 ^y	-1.6±0.4 ^y	0.29±0.01 ^y	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	0.27±0.00	0.27±0.00	4.3±0.1 ^{ay}	12.7±0.1 ^b	12.7±0.1 ^b	12.7±0.1 ^b
TP 1	28.5±0.79 ^x	26.7±0.34 ^x	3.0±1.1 ^x	0.37±0.03 ^x	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	0.27±0.00	0.27±0.00	6.4±0.2 ^{ax}	12.8±0.2	12.8±0.2	12.8±0.2
HPP 7	24.3±0.98 ^y	21.9±1.51 ^y	-1.3±1.0 ^y	0.27±0.02 ^y	3728±187	3728±187	3728±187	3728±187	3728±187	0.41±0.07	0.41±0.07	2.9±0.2 ^{by}	13.0±0.0 ^a	13.0±0.0 ^a	13.0±0.0 ^a
TP 7	28.2±0.64 ^x	25.7±0.43 ^x	2.5±0.4 ^x	0.36±0.01 ^x	>4000	>4000	>4000	>4000	>4000	0.27±0.08	0.27±0.08	5.8±0.1 ^{bx}	12.9±0.1	12.9±0.1	12.9±0.1
HPP 14	24.5±0.64 ^y	21.7±1.49 ^y	-1.7±0.6 ^y	0.26±0.02 ^y	3460±540	3460±540	3460±540	3460±540	3460±540	0.81±0.33	0.81±0.33	2.4±0.1 ^{by}	13.0±0.0 ^{ab}	13.0±0.0 ^{ab}	13.0±0.0 ^{ab}
TP 14	28.7±0.84 ^x	26.2±1.06 ^x	2.3±0.4 ^x	0.33±0.02 ^x	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	0.33±0.36	0.33±0.36	5.9±0.1 ^{bx}	13.0±0.0	13.0±0.0	13.0±0.0
HPP 21	25.3±0.00 ^y	21.0±0.90 ^y	-1.2±0.4 ^y	0.27±0.01 ^y	3433±566	3433±566	3433±566	3433±566	3433±566	1.27±0.01 ^x	1.27±0.01 ^x	2.1±0.1 ^{by}	12.8±0.1 ^{ab}	12.8±0.1 ^{ab}	12.8±0.1 ^{ab}
TP 21	28.7±0.84 ^x	24.8±0.49 ^x	2.3±0.4 ^x	0.35±0.01 ^x	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	>LoD	0.27±0.01 ^y	0.27±0.01 ^y	5.9±0.3 ^{bx}	12.9±0.1	12.9±0.1	12.9±0.1
HPP 28	25.2±0.39 ^y	21.2±0.55 ^y	-1.3±0.4 ^y	0.24±0.01 ^y	2167±551 ^y	2167±551 ^y	2167±551 ^y	2167±551 ^y	2167±551 ^y	1.36±0.36 ^z	1.36±0.36 ^z	1.9±0.1 ^{by}	12.8±0.1 ^{ab}	12.8±0.1 ^{ab}	12.8±0.1 ^{ab}
TP 28	28.2±0.85 ^x	24.6±0.95 ^x	2.1±0.4 ^x	0.37±0.01 ^x	3570±503 ^x	3570±503 ^x	3570±503 ^x	3570±503 ^x	3570±503 ^x	0.30±0.33 ^y	0.30±0.33 ^y	5.6±0.2 ^{bx}	12.8±0.1	12.8±0.1	12.8±0.1

Treatments: Raw (untreated); HPP: High Pressure Processing; TP: Thermal Processing.

M±SE: Mean ± Standard Error.

^y: processing (same storage time) and ^{ab}: storage time effects (same treatment) for P≤0.05.

Units: L*, a*, b*: CIE units; Browning index: Absorbance at 420nm; Turbidity: NTU; Transmittance: %; Absolute viscosity: cP; Soluble solids: °Brix.

>LoD: Above Limit of Detection.

Manuscript Number:	Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing. Part II.
Full Title:	Sensory and nutritional quality.
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	Sancho Bañón, Ph D, Universidad de Murcia SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad de Murcia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Adriana Hurtado, Ph D
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Adriana Hurtado, Ph D María Dolores Guàrdia, Ph D Pierre Picouet, Ph D Anna Jofre, Ph D José María Ros, Ph D Sancho Bañón, Ph D.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	In this second part, the sensory attributes and major nutrients were compared in red fruit-based smoothies treated by High Pressure Processing (HPP) (350 MPa at 10 °C for 5 min) and Thermal Processing (TP) (85 °C for 7 min) and kept at 4 °C for up to 28 days. HPP retained the odour and flavour of fresh fruit, while TP resulted in a persistent odour and flavour of cooked-fruit that were not associated with a fresh fruit product. "Fresh-like" smoothies, free of marmalade flavour, could be offered to consumers for at least 14 days. The loss of fresh fruit odour and banana odour, and, to a lesser extent, the reduction in sliminess, were the clearest indicators of the sensory deterioration that occurred in the HPP-smoothies, which, however, presented a superior or, at least, equal sensory quality to the TP-smoothies throughout the storage period. HPP also permitted a higher retention of vitamin C, although this vitamin and, to a lesser extent, total phenols, had a higher degradation rate in the HPP-smoothies during storage. Regardless of the preservation treatment, all smoothies suffered complete sucrose hydrolysis during their elaboration and/or processing. HPP treatment had a lower sensory impact than might be expected, probably due to the high level of antioxidants and the natural turbidity of red fruit-based smoothies.
Suggested Reviewers:	Catherine Renard, PhD Head Researcher, INRA Centre de Avignon, France catherine.renard@avignon.inra.fr Expertise in fruit HPP Francisco Barba, PhD Associate Professor, University of Valencia, Spain Francisco.Barba@uv.es

Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing.

Part II. Sensory and nutritional quality.

Adriana Hurtado¹, Maria Dolors Guàrdia², Pierre Picouet², Anna Jofré², José María Ros¹,
Sancho Bañón^{1*},

¹ Department of Food Science & Technology and Human Nutrition. Faculty of Veterinary
Science. University of Murcia. Espinardo, 30071, Murcia, Spain.

² IRTA-Food Technology and Safety Programme, Finca Camps i Arnet, E-17121 Monells,
Girona, Spain.

Highlights

A HPP moderate treatment was proposed for the pasteurization of red fruit smoothies

HPP maintained “fresh-like” fruit flavors and cooked off-flavors were absent

HPP did not degrade vitamin C or phenols and resulted in a sucrose inversion

Red fruit smoothies had a high level of antioxidants and a natural turbidity

And therefore, HPP had a lower sensory and nutritional impact than might be expected

1 Stabilization of Red Fruit-Based Smoothies by High Pressure Processing.

2 Part II. Sensory and nutritional quality.

3

4 **Keywords**

5 Smoothie, high hydrostatic pressure, red fruit, sensory, vitamin C, sugars.

6

7 **Abstract**

8

9 In this second part, the sensory attributes and major nutrients were compared in red fruit-
10 based smoothies treated by High Pressure Processing (HPP) (350 MPa at 10 °C for 5 min) and
11 Thermal Processing (TP) (85 °C for 7 min) and kept at 4 °C for up to 28 days. HPP retained

12 the odour and flavour of fresh fruit, while TP resulted in a persistent odour and flavour of

13 cooked-fruit that were not associated with a fresh fruit product. “Fresh-like” smoothies, free

14 of marmalade flavour, could be offered to consumers for at least 14 days. The loss of fresh

15 fruit odour and banana odour, and, to a lesser extent, the reduction in sliminess, were the

16 clearest indicators of the sensory deterioration that occurred in the HPP-smoothies, which,

17 however, presented a superior or, at least, equal sensory quality to the TP-smoothies

18 throughout the storage period. HPP also permitted a higher retention of vitamin C, although

19 this vitamin and, to a lesser extent, total phenols, had a higher degradation rate in the HPP-

20 smoothies during storage. Regardless of the preservation treatment, all smoothies suffered

21 complete sucrose hydrolysis during their elaboration and/or processing. HPP treatment had a

22 lower sensory impact than might be expected, probably due to the high level of antioxidants

23 and the natural turbidity of red fruit-based smoothies.

24

25 Introduction

26
27 The retention of sensory and nutritional properties is an important feature of using high
28 pressure processing (HPP) in fruit products. The direct impact of HPP treatments on the
29 sensory properties of fresh fruit products is considered to be of little relevance, and it is
30 generally assumed that the odour and flavour of fresh fruits is hardly altered by HPP due to its
31 limited effect on the covalent bonds of low molecular weight compounds (Tauscher, 1995).
32 However, depending of the pressurizing conditions, HPP treatments might modify enzymatic
33 and chemical reactions that could result in the formation of compounds associated with
34 undesirable changes in colour, odour and flavour (Oey et al., 2008). The resulting sensory
35 stability is a crucial aspect of using high pressures in fruit products, since they are exposed to
36 altering reactions catalysed by enzymes, which are often not inactivated by the HPP
37 treatments (Terefe et al., 2014). The sensory effects of using HPP have been assessed in
38 different fruit products, such as strawberry puree (Lambert et al., 1999), mandarin juice
39 (Takahashi et al., 1993), orange–lemon–carrot juice (Fernández-García et al., 2001) and
40 multi-fruit smoothies (Hurtado et al., 2015; Keenan et al., 2012a). Although the experimental
41 conditions were different, in general, these works mention the risk for the fresh fruit odour
42 and flavour of using 450-600 MPa at room temperature or higher pressures at cold
43 temperatures, concluding that moderate pressurization conditions should be used to
44 pasteurize “fresh-like” fruit products.

45
46 The degradation of major nutrients, such as antioxidants or sugars, could follow a similar
47 pattern to that observed for flavour compounds. HPP treatments have only a slight effect on
48 fruit nutrients, depending on the pressurizing conditions and type of fruit matrix (Keenan et

al. 2012b; Oey et al., 2008). However, the remaining enzymatic activities may lead to a
greater destruction of nutrients during storage. Vitamin C loss is traditionally considered as a
handicap for the nutritional quality of fruit derivatives, in particular, in products made from
fruits rich in vitamin C, such as orange or strawberry. Fruits and, in particular, red fruits
contain high levels of phenolic antioxidants, such as flavonols, tannins and anthocyanins, with
potential positive effects for human health (Nile and Park, 2014), but these, too, may be
degraded during storage. Similarly, the inability of HPP treatments to inactivate some
enzymes, such as β -fructosidase, might modify the sugar profile in fruit products (Butz et al.,
2003). Several studies have reported that HPP treatments do not affect the levels of vitamin C,
phenols, carotenoids and sugars in some fruit juices (Butz et al., 2003; Fernández-García et
al., 2001), while the content of total phenols increased in others (Patras et al., 2009; Vega-
Galvez et al., 2014). This last mentioned phenomenon might be due to an increase in the
extractability of some antioxidant components after HPP (Cao et al., 2012). In any case, it
would be of interest to know if HPP treatments permit, or not, a better retention of nutrients in
chill-stored fruit products than thermal treatments, which often alter the sensory and
nutritional properties of fruit (Deliza et al., 2005). As was shown in Part I of this study, the
enzymes involved in fruit spoilage may produce noticeable sensory and nutritional changes,
an aspect which requires further evaluation.

The objective of the second part of this study, therefore, was to compare the effects of two
industrial treatments (HPP at 350 MPa for 5 min and a thermal treatment at 85°C for 7 min)
on the sensory stability and retention of major nutrients of red-fruit based smoothies kept in
retailing conditions.

Material and methods

Smoothie preparation and processing A commercial formulation for red-fruit based smoothies containing 20% strawberries, 20% oranges, 16% apples, 10% bananas, 10% red grape, 10% blackberry, 7% gooseberry, 5% white grape and 2% lime, was elaborated. Detailed information on the smoothie composition and elaboration procedure is available in part I of this work (Hurtado et al., 2015). Smoothies were assigned to three different treatments: (i) Untreated (raw samples); (ii) High Pressure Processing (HPP-smoothies); and (iii) Thermal Processing (TP-smoothies). Smoothies subjected to HPP and those untreated were packaged in 250 ml polyethylene terephthalate (PET) bottles (Sunbox, Madrid, Spain), while a specific HT300 pouch (Seal Air Cryovac, Milano, Italy) was used for the thermally-treated samples. HPP consisted of pressurization at an initial temperature of 9-10 °C in an HPP System 6500/120 of 120 l (Hiperbaric, Burgos, Spain). For P_{max} = 350 MPa, the pressure ramp was 200 MPa min⁻¹, the holding time 5 min and total processing time 7 min 18 s. For thermal processing, the samples were introduced into an ILRAPLUS autoclave (Ilpra Systems, Mataró, Spain) and heated to 85 °C for 7 min, including the initial ramp of 5.7 °C min⁻¹, the total heating time being 27 min. After processing, samples were stored for 28 days at 4±2 °C in a Climacell 707 cabinet (MMM Medcenter Einrichtungen, München, Germany) and kept under light (100 lx) (12 h) and darkness (12 h). Three different smoothie units (bottle/pouch) from each batch were analysed at day 1, 7, 14, 21 and 28 of storage.

Quantitative Descriptive Analysis (QD4) The sensory descriptors were generated by open discussion in two previous sessions (Table 1). Six selected trained assessors undertook the sensory analysis of 50 ml of smoothie sample. A non-structured scoring scale was used, where

0 meant the absence of the descriptor and 10 meant a high intensity of the descriptor. The sensory evaluation was separately performed for each sampling time in 2 sessions (per sampling time) using 1 bottle of 250 ml from each treatment per session. A complete block design was used, where each assessor assessed all of the batches in each session. Eight sensory sessions per assessor were performed in total. The samples were coded using three random numbers and presented to the assessors. The first-order and the carry-over effects were balanced according to MacFie et al., (1989). The average score of the six trained assessors for each sample and session was recorded and used in the data analysis.

Vitamin C The total vitamin C content (mg 100 ml⁻¹, ±0.5 mg 100 ml⁻¹) was calculated as the sum of Ascorbic Acid (AA) and Dehydroascorbic Acid (DHAA). A Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) system was used: L-6200 pump (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany); 2050 Plus autosampler (Jasco Inc., Easton, UK); L-7420 UV detector (Merck-Hitachi); and a Gemini C18 column (300 x 4.6 mm, 5 µm) connected to a C18 reverse phase guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Total phenols Total phenols (mg Gallic Acid Equivalents, GAE, 100 ml⁻¹, ±2.5 mg 100 ml⁻¹) were determined by VIS spectrophotometry. The absorbance of a yellow compound formed from the reaction between a sample of the ethanolic extract and Folin-Ciocalteu reagent was measured at 765 nm.

Sugars Sugars (sucrose, glucose and fructose) were determined by HPLC. A HPLC system equipped with a L-7490 Lachrome refractive index detector (Merck-Hitachi) and a Carbosep CHO682 lead column (Transgenomic, Elancourt, France) were used.

For more details on all the analytical methodology used (including references) for the determination of sugars and antioxidants, see Hurtado et al. (2015).

Statistical analysis Data were analysed using the Statistix 8 package for Windows (Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA). The model design and statistical procedures are described in detail in part I of this work.

Results and discussion

Effects on sensory quality (Tables 2 and 3) Unlike TP, HPP did not alter the sensory quality of the smoothies. There were no significant differences between the raw and the HPP-smoothies for any sensory score at day 1, while the use of TP led to changes in the scores for odour and flavour (freshness, cooked and banana), appearance (darkness) and overall quality at day 1. In contrast, the odour and flavour of strawberry or red fruit were not affected by the TP treatment. When HPP-smoothies and TP-smoothies were compared, the main sensory differences observed between treatments were related with odour and flavour. The intensity of overall odour and flavour scored similar in smoothies from both treatments, although overall flavour decreased in the HPP-smoothies as from day 21. A first relevant aspect was that the odour of fresh fruit (freshness) scored higher in the HPP-smoothies than in the TP-smoothies throughout the storage period, although the intensity decreased in the former as from day 21. In contrast, the flavour of fresh fruit was perceived less intensely than the odour of fresh fruit and was not affected by the treatment or storage time. Similarly, no differences between HPP-smoothies and TP-smoothies were scored for the odour and flavour of strawberry at any

storage time, whereas the odour and flavour of banana scored higher in HPP, although the differences between them gradually disappeared during storage. Banana flavour was less intense than banana odour and the effect of treatment on the first was therefore less clear. The contribution of other fruits (apple, orange, blackberry, gooseberry, white and red grape and lime) to smoothie flavour could not be appreciated by the assessors with sufficient intensity to be quantified. Another relevant aspect is the fact that the HPP-smoothies were free of the off-odours and off-flavours associated with the pressurized fruit, while the TP-smoothies developed the persistent odour and flavour of cooked fruit, which explains their lower score for freshness. Moreover, the HPP-smoothies were scored as more acidic than the TP-smoothies as from day 14.

HPP treatments have little possibility of affecting the structure of small molecular flavour compounds, although they may modify enzymatic and chemical reactions that could result in the formation of compounds associated with undesired changes in flavour (Oey et al., 2008). When this occurs, flavour deterioration will depend of the pressurizing conditions and the aromatic properties of fruit. A preliminary triangle test (Hurtado et al., 2015) performed on smoothies containing orange (33%), apple fresh juice (33%), strawberry (14%) banana (10%) and whole apple (10%), confirmed that the application of 600 MPa at 10 °C for 3 min generated an off-flavour commonly associated with the application of high pressure, while the use of lower pressures (350-450/MPa/10°C/5min) did not affect the odour and flavour of fresh fruit. In contrast, Keenan et al., (2012a) found no clear retention of the odour and flavour of fresh fruit in HPP-smoothies (450MPa/20°C/5min) containing apple, apple juice from concentrate, orange, banana and strawberry. The use as ingredient of sterilized apple juice (at a level of 29%) might explain these results. In other fruit products, the application of 200–600

MPa at room temperature did not alter the flavour of strawberry puree (Lambert et al., 1999), mandarin juice (Takahashi et al., 1993) or orange–lemon–carrot juice (Fernández-García et al., 2001), while, the application of more intense HPP treatments (500-800MPa/20min/20°C) modified the flavour of strawberry puree (Lambert et al., 1999) and orange juice (Fernández-García et al., 2001). Lambert et al., (1999) reported that HPP resulted in the formation of new volatiles, such as δ -lactone, together with a reduction in some esters which are responsible for strawberry flavour. Similarly, Zabetakis et al., (2000) found a certain pressure-dependency in the degradation of some volatiles contributing to strawberry flavour, such as nerolidol, furaneol, linalool and some esters.

The development of cooked-fruit flavour would be the most relevant sensory difference between fruit products pasteurized by using heat or high pressure. The HPP-smoothies and TP-smoothies were easily discriminated by alterations in fruit flavour after heating (Hurtado et al., 2015). Many flavour compounds present in fruit juices are degraded by thermal treatments, resulting in significant losses in the natural fruity flavours and in the development of cooked fruit flavour. A study on strawberry puree performed with an electronic nose concluded that the changes in the volatile profile were more intense in TP-puree (80°C/5min) than in HPP-puree (600MPa/room temperature/5min) (Dalmadi et al., 2007), a conclusion coherent with our flavour assessment. In any case, monitoring flavour changes in fruit products through volatile profiles involves great difficulty due to the complexity of flavour chemistry, particularly when different fruits are interacting. Our sensory quantification confirmed that the elimination of cooked-fruit flavours is probably the main advantage of using HPP with respect to TP in smoothies.

The stabilization of sensory properties is another crucial aspect for smoothie shelf life. In our study, the reduction in the intensity of the odour of fresh fruit, and, in particular, of the banana odour, was the most relevant aromatic change assessed in the HPP-smoothies kept under refrigeration. This might be because banana odour predominated over strawberry/red fruit odour in this type of smoothies, even though they were elaborated with 37% of berries. The more intense acid flavour of HPP-smoothies seems to be better explained by the absence of cooked-fruit flavours, which would reduce the acid taste perception, than with the slight differences in pH (see part I). The flavour changes occurring in HPP-treated fruit products have been explained by changes in some volatile compounds such as limonene and others associated with fruity flavours (orange, banana and apple) (Keenan et al. 2012a). Other studies confirmed that oxidation reactions modify the volatile profile of HPP-treated strawberry puree (kept at 4 °C for 30 days) and banana pieces (kept at 4 °C for 24 days) during chill storage, although a sensory assessment was not performed (De Vasconcelos et al., 2012; Navarro et al., 2002). Our results show that the flavour deterioration would be more pronounced in the HPP-smoothies than in the TP-smoothies for two possible reasons: (i) HPP did not initially alter the original fresh fruit flavour, and therefore, flavour changes over time would be more evident; (ii) Oxidase enzymes (see Part I) may degrade flavour compounds in smoothies.

The deterioration of appearance may also limit smoothie shelf life. The sensory evaluation confirmed the differences observed between treatments in CIELAB colour (see Part I). Smoothie colour (darkness) was not directly affected by HPP, while TP resulted in slightly lighter smoothies during the whole storage period. The rust colour associated with pigment oxidation could not be quantified because of the strong predominance of red-purplish

217 tonalities provided by berries and red grape. In agreement with the optical measurements
 218 made in Part I, greater clarification was evident in the HPP-smoothies during storage, and, as
 219 a consequence, turbidity scored lower in the HPP-smoothies than in the TP-smoothies as from
 220 day 21. This can be considered a positive aspect for the stability of HPP-smoothies, since
 221 much time needs to pass before cloud clarification, which could be visually appreciated and
 222 was not associated with changes in colour. Keenan et al. (2012a) found more pronounced
 223 changes in colour during storage in HPP-smoothies than in TP-smoothies, which were
 224 characterized by a pink-orange colour. Our results suggest that the natural turbidity (see Part
 225 I) of red fruit smoothies might have contributed to masking cloud clarification and the
 226 possible negative effects on appearance. Cloud clarification also resulted in some changes of
 227 mouth-feel texture attributes. The HPP-smoothies presented lower scores of sliminess than the
 228 TP-smoothies at days 14 and 21, but not at day 28, while grittiness scored similar in both
 229 types of smoothies over time. Keenan et al., (2012a) found no clear differences in viscosity,
 230 graininess or phase separation between smoothies treated by HPP and TP, although viscosity
 231 decreased slightly in the former with time. Mouth-feel appreciation confirmed that sliminess
 232 decreased in the HPP-smoothies as clarification progressed. Smoothies containing the
 233 complete fruit pulp are more dense and viscous than the equivalent juices, and any changes in
 234 texture associated with pectin methyl esterase activity would be more difficult to perceive. In
 235 any case, sliminess scores were coherent with the values of absolute viscosity measured in
 236 smoothies (see Part I), despite the difficulty posed by the sensory assessment of texture
 237 changes in a liquid matrix.
 238
 239 The scores of overall sensory quality decreased from 8.5 to 5.3 and from 6.7 to 5.6 during
 240 storage in the smoothies treated by HPP and TP, respectively, which indicates that the sensory

241 quality of HPP-smoothies was superior to or, at least, no different from that presented by the
 242 TP-smoothies at any storage time. As seen in Part I, red fruit smoothies had a high antioxidant
 243 capacity and a natural turbidity, which may have contributed to reducing the adverse sensory
 244 effects of oxidation and clarification phenomena. In other studies, the loss of sensory quality
 245 became evident at 30 days of storage in HPP-smoothies (450MPa/20°C/5min) (Keenan et al.,
 246 2011) or at 89 days in HPP-treated orange juice (600MPa/40°C/4min) (Polydera et al., 2005).
 247 These differences may be explained by the higher pressures and higher temperatures used as
 248 well as the use of sterilized apple juice. As can be seen, the products that best retained the
 249 properties of fresh fruit suffered greater sensory changes during storage. In our study, the loss
 250 of sensory quality began to be relevant at 21 days of chill storage and, therefore, “fresh-like”
 251 red fruit-based smoothies, free of marmalade flavour, could be offered to consumers for at
 252 least 14 days.
 253
 254 *Effects on antioxidants and sugars* (Table 4) The vitamin C present in smoothies was mainly
 255 dehydroascorbic acid, while the ascorbic acid content was below the detection limit (0.5 mg
 256 100 ml⁻¹) in all the samples. Hurtado et al. (2015) also found lower quantities of ascorbic acid
 257 (<5 mg 100 ml⁻¹) than dehydroascorbic acid (<30 mg 100 ml⁻¹) in fruit smoothies analysed by
 258 HPLC-UV at 48 h post-processing. Ascorbic acid is the primary antioxidant involved in the
 259 oxidation-reduction reactions occurring in fruit and this acid would be rapidly oxidized to
 260 dehydroascorbic acid during smoothie processing. Dehydroascorbic acid has lower biological
 261 activity than ascorbic acid and, therefore, a lower nutritional value, although dehydroascorbic
 262 acid can be converted into ascorbic acid and may exhibit vitamin C activity (Suárez-Jacobo et
 263 al., 2011). The initial (day 1) content of vitamin C was not affected by HPP but decreased
 264 from 21 (day 1) to 3 mg 100 ml⁻¹ (day 28) as a consequence of the further oxidation that

occurred during storage. In contrast, TP reduced the initial content of vitamin C to 13 mg 100
 ml⁻¹, so this vitamin was completely degraded during storage. The level of vitamin C was
 similar in both types of smoothies at day 14, after which, the use of HPP was seen to have no
 nutritional benefits regarding vitamin C retention. Several other studies also reported that HPP
 leads to lower degradation of ascorbic acid than TP in fruit products (Butz et al., 2003;
 Hurtado et al., 2015; Keenan et al., 2012b; Polydera et al., 2003). Vitamin C degradation may
 correspond to both oxidative reactions catalysed by oxidase enzymes and aerobic and non-
 enzymatic anaerobic reactions. The loss of fruit antioxidants is enhanced in minced fruit
 products containing occluded oxygen - such as smoothies - particularly when enzymatic
 degradation systems are not inactivated by HPP (Keenan et al., 2010). The higher degradation
 rate of vitamin C observed in the HPP-smoothies during storage would be coherent with their
 lower antioxidant status and their higher oxidase activities (see Part I).
 Unlike vitamin C, fruit phenols are quite resistant to HPP (Hurtado et al., 2015; Keenan et al.,
 2012b) and TP (Marszałek et al., 2015; Parras et al., 2009), although phenol degradation can
 occur in fruit products depending on the processing and storage conditions. The evaluated red
 fruit smoothies were particularly rich in total phenols, their content being similar whether
 treated by HPP or TP, around 85 mg GAE 100 ml⁻¹, although the phenol content decreased in
 the HPP-smoothies after 28 days of storage. Thus, a long storage period and/or a high degree
 of oxidation were necessary to observe a significant reduction in the total phenol content of
 these smoothies. Keenan et al. (2010) also reported an additional loss of total phenols during
 storage (30 days) in HPP-smoothies (450MPa/20°C/3min) compared with TP-smoothies
 (P₁₀≥10min). Phenol degradation during storage has also been reported in other shelf-life
 studies of different HPP-juices (Barba et al., 2013; Cao et al. 2012). Fruit phenols can act

either as antioxidants or substrates in different reactions during fruit oxidation (Robards et al.,
 1999). Ascorbic acid can be oxidized to dehydroascorbic acid in the presence of oxidized
 phenols, converting quinones into their reduced form and protecting phenols against
 oxidation. Thus, the oxidation of ascorbic acid would be favoured in fruit products rich in
 phenolic compounds where oxidase enzymes remain active (Gandia-Herrero et al., 2007), as
 occurred in the HPP-smoothies. In agreement with our results, Gil-Izquierdo et al., (2002)
 found a lower degree of flavonol stability in orange juice when enzyme activities were not
 inhibited by thermal treatments.
 The sugar profile can also be affected by enzyme activities. Unexpectedly, the sucrose content
 was below the detection limit (<0.5 mg 100 ml⁻¹) in all the samples as from day 1, suggesting
 that, regardless of the treatment applied, early sucrose hydrolysis took place in the red fruit
 smoothies. Mincing and mixing would have favoured the extraction and the contact between
 sucrose and β -fructosidase. The levels of fructose and glucose were around 6 g 100 ml⁻¹ and
 there were no differences between treatments. However, the level of glucose and fructose
 slightly increased in the HPP smoothies at days 1 and 21, respectively, which might indicate
 than β -fructosidase hydrolysed the sucrose residues of the HPP-smoothies. A previous study
 (Hurtado et al., 2015) found that TP (85°C/7min) reduces sucrose hydrolysis in fruit
 smoothies compared with HPP (350MPa/10°C/5min). In this study, the sucrose, fructose and
 glucose contents determined 48 h after processing were 0.3, 4.4 and 7.1 g 100 ml⁻¹ and 3.5,
 3.4 and 4.7 g 100 ml⁻¹ in the HPP-samples and TP-samples, respectively. Similarly, the
 incomplete inactivation of β -fructosidase resulted in the total disappearance of sucrose in a
 HPP-treated (600MPa/25°C/6min) raspberry puree refrigerated for 30 days, while, in contrast,
 β -fructosidase enzyme was inactivated by TP (95°C/4min) (Butz et al., 2003). Our results

313 suggest that sucrose is completely hydrolysed by β -fructosidase during the elaboration and/or
 314 processing of red fruit-based smoothies, while the monosaccharides fructose and glucose are
 315 the sugars which remain throughout the shelf life of the smoothie.
 316

317 **Conclusions**
 318

319 Red fruit-based Smoothies with a “fresh-like” odour and flavour can be obtained through HPP
 320 moderate treatment, while TP results in a persistent odour and flavour of cooked-fruit that
 321 should not be associated with a product elaborated with fresh fruit. The negative sensory
 322 consequences caused by the lack of inactivation of oxidase and pectic enzymes by HPP were
 323 less than expected. As shown in Part 1, red fruit-based smoothies have a high antioxidant
 324 capacity and a natural turbidity that may help to minimize the negative effects of these
 325 enzymes. The sensory quality of HPP-smoothies was superior to or, at least, not different from
 326 that presented by the TP-smoothies during storage. The loss of the odour of fresh fruit and
 327 banana, and, to a lesser extent, the reduction in sliminess, seems to be the main markers of the
 328 sensory deterioration that took place in the HPP-smoothies kept in retailing conditions.
 329 “Fresh-like” red fruit-based smoothies, free of marmalade flavour, could be offered to
 330 consumers for at least 14 days. The use of high pressure also permitted better retention of
 331 vitamin C after processing, although there was a tendency for vitamin C and, to a lesser
 332 extent, total phenols to be degraded in the HPP-smoothies during storage. Regardless of the
 333 preservation treatment used, red fruit-based smoothies suffer total sucrose hydrolysis during
 334 their elaboration and/or processing. Futures studies will focus on new strategies to improve
 335 the stability of fruit smoothies treated by HPP. The problems arising from their greater
 336 tendency towards oxidation and clarification might be corrected by using fruit varieties

337 particularly rich in antioxidants and/or water-soluble polysaccharides.
 338

339 **Acknowledgements**
 340

341 The authors gratefully acknowledge the financial participation of INIA through project
 342 FRUTECH-RTA2011-00038-C02-02.
 343

344 **References**
 345

346 Barba FJ, Esteve MJ, Frigola A (2013) Physicochemical and nutritional characteristics of
 347 blueberry juice after high pressure processing. *Food Res Int* 50: 545-549.
 348 Butz P, Fernández-García A, Lindauer R, Dieterich S, Bognár A, Tauscher B (2003) Influence
 349 of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *J Food Eng* 56: 233-
 350 236.
 351 Cao X, Bi X, Huang W, Wu J, Hu X, Liao X (2012) Changes of quality of high hydrostatic
 352 pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innov Food Sci
 353 Emerg* 16:181-190.
 354 Dalmadi I, Polyak-Feher K, Farkas J (2007) Effects of pressure and thermal pasteurization on
 355 volatiles of some berry fruits. *High Pressure Res* 27:169-172.
 356 De Vasconcelos, HV, Dos Santos D, Dos Santos CT, Cordenunsi BR, Lajolo FM (2012)
 357 Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold
 358 storage. *Food Res Int* 49:626-633.

359 Deliza R., Rosenthal, A., Abadio FBD, Silva CHO, Castillo C (2005) Application of high
360 pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. J
361 Food Eng 67:241-246.

362 Fernández-García A, Butz P, Bognér A, Tauscher B (2001) Antioxidative capacity, nutrient
363 content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product
364 after high pressure treatment and storage in different packaging. Eur Food Res Technol
365 213(4-5):290-296.

366 Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2007) Characterization of the activity of
367 tyrosinase on betanidin. J Agr Food Chem 55:1546-1551.

368 Gil-Izquierdo A, Gil, MI, Ferreres, F. (2002). Effect of processing techniques at industrial
369 scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. J Agr Food Chem
370 50:5107-5114.

371 Hurtado A, Picouet P, Jofré A, Guàrdia MD, Ros JM, Bañón S (2015) Application of High
372 Pressure Processing for Obtaining “Fresh-Like” Fruit Smoothies. Food Bioprocess
373 Tech DOI 10.1007/s11947-015-1598-5.

374 Keenan DF, Brunton NP, Gormley TR, Butler F (2011) Effect of thermal and high hydrostatic
375 pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality
376 attributes of fruit smoothies. J Agr Food Chem 59:601-607.

377 Keenan DF, Brunton NP, Gormley TR, Butler F, Tiwari BK, Patras A (2010) Effect of thermal
378 and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit
379 smoothies. Innov Food Sci Emerg 11:551-556.

380 Keenan DF, Brunton NP, Mitchell M, Gormley TR, Butler F (2012a) Flavour profiling of
381 fresh and processed fruit smoothies by instrumental and sensory analysis. Food Res Int
382 45:17-25.

383 Keenan DF, Røffle C, Gormley TR, Butler F., Brunton NP (2012b) Effect of high hydrostatic
384 pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit
385 smoothie. LWT-Food Sci Technol 45:50-57.

386 Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier JM (1999) Changes in aromatic volatile
387 composition of strawberry after high pressure treatment. Food Chem 67:7-16.

388 MacFie HJ, Bratchell N, Greenhoff K, Vallis LV (1989) Designs to balance the effect of order
389 of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. J Sens Stud 4:129-148.

390 Marszałek K, Mitek M, Skapska, S (2015) The effect of thermal pasteurization and high
391 pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition,
392 microbial and enzyme activity in strawberry puree. Innov Food Sci Emerg 27:48-56.

393 Navarro M, Verret C, Pardon P, El Moueffak A (2002) Changes in volatile aromatic
394 compounds of strawberry puree treated by high-pressure during storage. High Pressure
395 Res 22:693-696.

396 Nile SH, Park SW (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human
397 health. J Nutr 30:134-144.

398 Oey I, Lille M, Van Loey A, Hendrickx M (2008) Effect of high pressure processing on
399 colour, texture and flavor of fruit and vegetable-based food products: a review. Trends
400 Food Sci Technol 19(6):320-328.

401 Patras A, Brunton NP, Pieve SD, Butler F (2009) Impact of high pressure processing on total
402 antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of
403 strawberry and blackberry purées. Innov Food Sci Emerg 10:308-313.

404 Polydera AC, Stoforos NG, Taoukis PS (2003) Comparative shelf life study and vitamin C
405 loss kinetics in pasteurized and high pressure processed reconstitutes orange juice. J
406 Food Eng 60:21-29.

407 Polydera AC, Stoforos NG, Taoukis PS (2005) Effect of high hydrostatic pressure treatment
408 on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. Food Chem
409 91:495-503.

410 Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitwang P, Glover W. (1999) Phenolic compounds
411 and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem 66(4):401-436.

412 Takahashi Y, Ohta H, Yonet H, Ifuku, Y (1993) Microbicidal effect of hydrostatic-pressure on
413 Satsuma mandarin juice. Int J Food Sci Tech 28:95-102.

414 Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. Z
415 Lebensm Unters Forsch 200:3-13.

416 Terefe NS, Buckow R, Versteeg C (2014) Quality-related enzymes in fruit and vegetable
417 products: effects of novel food processing technologies, Part 1: High-pressure
418 processing. Crit Rev Food Sci 54:24-63.

419 Vega-Gálvez A, López J, Torres-Ossandón MJ, Galotto MJ, Puente-Díaz L, Quispe-Fuentes I,
420 Di Scala K (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color,
421 phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana*
422 L.). LWT-Food Sci Technol 58:519-526.

423 Zabetakis I, Koulentianos A, Orruno E, Boyes I (2000) The effect of high hydrostatic pressure
424 on strawberry flavor compounds. Food Chem:71, 51-55.

425

426 Table 1. Definition of the sensory attributes included in the sensory profile.
427

Attributes	Definition
Appearance	
Darkness	Evaluation of the intensity of the darkness
Turbidity	Evaluation of the lack of cloud translucency
Odour	
Intensity	Evaluation of the intensity of overall odour
Fresh fruit	Evaluation of the intensity of the characteristic odour of fresh fruits
Cooked fruit (marmalade)	Evaluation of the intensity of odour characteristic of cooked fruit
Strawberry /red fruit	Evaluation of the intensity of odour characteristic of strawberry and other red fruit
Banana	Evaluation of the intensity of odour characteristic of banana
Flavour	
Intensity	Evaluation of the overall intensity of flavour
Fresh-fruit	Basic taste sensation elicited by sugar and freshness
Cooked fruit (marmalade)	Intensity of flavour characteristic of cooked fruit
Strawberry/red fruit	Intensity of flavour characteristic of strawberry
Banana	Intensity of flavour characteristic of banana
Acid	Basic taste sensation elicited by an acid
Mouth-feel texture	
Sliminess	Mouth-feel property rated by the degree to which the juice is thick, coats the mouth and its difficulty to swallow
Grittiness	Mouth feel sensation related with the perception of particles the size of fine sand
Overall sensory quality	Scoring of the sensory quality of the sample by reference to the standard of quality for this product

Table 3. Effects of the processing treatment on the appearance and texture attributes of red fruit smoothies kept at 4 °C for up to 28 days.

Storage day	Appearance		Mouth-feel		Overall	
	M±SE	Darkness	Turbidity	Sliminess	Grittiness	M±SE
Raw 1	7.4±0.3 ^x	8.3±0.5	4.3±0.5	2.9±0.5	8.5±0.2 ^x	
HPP 1	7.6±0.2 ^x	8.4±0.4 ^a	4.4±0.5	3.3±0.5	8.6±0.2 ^{a x}	
TP 1	4.8±0.3 ^y	8.6±0.6	5.0±0.6	3.5±0.5	6.7±0.3 ^{a y}	
HPP 7	7.4±0.2 ^x	8.1±0.7 ^a	4.0±0.5	3.7±0.4	7.6±0.2 ^{ab x}	
TP 7	5.0±0.2 ^y	8.3±0.6	5.2±0.5	3.7±0.5	6.5±0.2 ^{ab y}	
HPP 14	7.0±0.1 ^x	7.3±0.6 ^a	3.6±0.5 ^y	3.3±0.4	7.0±0.3 ^{bc x}	
TP 14	4.8±0.3 ^y	7.5±0.4	5.1±0.4 ^x	3.8±0.4	5.9±0.2 ^{bc y}	
HPP 21	7.2±0.2 ^x	6.5±0.3 ^{ab y}	3.2±0.4 ^y	3.2±0.5	6.0±0.3 ^{cd}	
TP 21	5.0±0.3 ^y	7.6±0.4 ^x	5.1±0.5 ^x	3.6±0.4	5.9±0.2 ^{bc}	
HPP 28	6.9±0.3 ^x	5.2±0.3 ^{b y}	3.3±0.5	3.0±0.4	5.3±0.3 ^d	
TP 28	5.2±0.3 ^y	7.2±0.5 ^x	4.7±0.5	3.1±0.5	5.6±0.1 ^e	

Treatments: Raw (untreated); HPP: High Pressure Processing; TP: Thermal Processing.

M±SE: Mean ± Standard Error.

^{xy} processing and ^{abcd} storage time effects (same storage time) for P≤0.05.

Scoring sensory scale: from 1 (minimum) to 10 (maximum).

Table 2. Effects of the processing treatment on the flavour attributes of red fruit smoothies kept at 4 °C for up to 28 days.

Storage day	Intensity		Freshness		Cooked fruit		Strawberry		Banana		Acid	
	Flavour	Odour	Flavour	Odour	Flavour	Odour	Flavour	Odour	Flavour	Odour	Flavour	Odour
Raw 1	6.7±0.4	7.2±0.3	0.1±0.1 ^y	0.0±0.0 ^y	6.6±0.5 ^x	4.6±0.6	3.7±0.6	3.8±0.6	5.0±0.5 ^x	4.7±0.5 ^x	4.3±0.5	4.3±0.5
HPP 1	6.2±0.3	7.2±0.3 ^a	0.0±0.0 ^{b y}	0.0±0.0 ^y	6.5±0.5 ^{ax}	4.5±0.6	3.5±0.6	4.2±0.7	5.2±0.4 ^{a x}	4.4±0.5 ^{a y}	4.4±0.5	4.4±0.5
TP 1	6.9±0.4	6.9±0.4	4.8±0.5 ^x	4.7±0.5 ^x	2.7±0.5 ^y	3.9±0.3	3.0±0.5	3.8±0.4	3.0±0.4 ^{a y}	2.8±0.4 ^{a y}	5.0±0.6	5.0±0.6
HPP 7	6.1±0.3	6.6±0.3 ^{ab}	0.2±0.2 ^{ab y}	0.1±0.1 ^y	4.8±0.6 ^{ab x}	4.1±0.4	4.0±0.5	4.2±0.5	3.9±0.3 ^{ab x}	3.6±0.4 ^{ab}	4.0±0.5	4.0±0.5
TP 7	7.1±0.4	7.1±0.3	4.8±0.5 ^x	4.1±0.6 ^x	2.1±0.3 ^y	3.3±0.2	3.4±0.5	3.9±0.4	2.6±0.3 ^{ab y}	2.7±0.4 ^a	5.2±0.5	5.2±0.5
HPP 14	6.0±0.4	6.5±0.2 ^{ab}	0.5±0.2 ^{ab y}	0.1±0.1 ^y	4.7±0.5 ^{ab x}	3.8±0.4	4.1±0.5	4.0±0.3	3.3±0.3 ^{bc x}	2.7±0.2 ^{bc x}	3.6±0.5 ^y	3.6±0.5 ^y
TP 14	6.4±0.4	6.7±0.3	5.0±0.3 ^x	4.2±0.5 ^x	1.9±0.3 ^y	3.2±0.3	3.1±0.5	3.4±0.2	2.2±0.3 ^{ab y}	1.7±0.2 ^{ab y}	5.1±0.4 ^x	5.1±0.4 ^x
HPP 21	6.0±0.4	6.0±0.2 ^b	0.9±0.3 ^{a y}	0.3±0.1 ^y	3.9±0.4 ^{bx}	3.0±0.4	3.5±0.4	3.8±0.3	3.1±0.3 ^{bc x}	2.1±0.2 ^c	3.2±0.4 ^y	3.2±0.4 ^y
TP 21	6.3±0.4	6.3±0.3	4.7±0.5 ^x	4.1±0.5 ^x	1.8±0.3 ^y	3.1±0.3	3.3±0.5	3.8±0.4	1.8±0.2 ^{b y}	1.6±0.2 ^{ab}	5.1±0.5 ^x	5.1±0.5 ^x
HPP 28	5.9±0.3	5.9±0.2 ^b	0.7±0.3 ^{ab y}	0.4±0.2 ^y	3.2±0.4 ^{bx}	3.0±0.4	3.5±0.5	3.5±0.3	2.1±0.3 ^c	1.8±0.2 ^c	3.2±0.5 ^y	3.2±0.5 ^y
TP 28	6.3±0.4	6.5±0.3	4.3±0.4 ^x	4.1±0.5 ^x	1.4±0.3 ^y	3.0±0.3	3.0±0.6	4.0±0.4	1.6±0.3 ^b	1.4±0.2 ^b	4.7±0.5 ^x	4.7±0.5 ^x

Treatments: Raw (untreated); HPP: High Pressure Processing; TP: Thermal Processing.

M±SE: Mean ± Standard Error.

^{xy} processing and ^{abcd} storage time effects (same storage time) for P≤0.05.

Scoring sensory scale: from 1 (minimum) to 10 (maximum).

Table 4. Effect of the processing treatment on the vitamin C; total phenols and sugars of red fruit smoothies kept at 4 °C for up to 28 days.

	Storage day	Vitamin C		Phenols		Glucose		Fructose	
		M±SE		M±SE		M±SE		M±SE	
Raw	1	19.1±1.8 ^x		84.8±5.6		5.8±0.0		6.7±0.1	
HPP	1	21.0±3.0 ^{a x}		86.4±6.2 ^{ab}		5.6±0.2 ^b		6.5±0.1 ^b	
TP	1	13.5±1.2 ^{a y}		75.7±5.5		5.6±0.2 ^b		6.6±0.1	
HPP	7	11.5±0.9 ^{b x}		82.8±5.9 ^{ab}		5.9±0.2 ^a		6.4±0.2 ^b	
TP	7	6.4±0.3 ^{bc y}		81.9±7.5		6.0±0.1 ^a		6.6±0.0	
HPP	14	6.8±0.7 ^{bc}		93.3±2.7 ^a		6.0±0.2 ^a		6.7±0.2 ^{ab}	
TP	14	6.8±0.9 ^b		96.1±1.4		6.1±0.1 ^a		6.7±0.1	
HPP	21	4.9±0.3 ^c		85.7±3.2 ^{ab}		6.1±0.1 ^a		6.8±0.1 ^a	
TP	21	3.4±0.3 ^{cd}		93.3±2.0		6.1±0.2 ^a		6.7±0.2	
HPP	28	2.8±0.0 ^{c x}		66.4±7.4 ^{b y}		6.2±0.1 ^a		6.9±0.1 ^a	
TP	28	1.3±0.2 ^{d y}		81.9±2.8 ^x		6.2±0.1 ^a		6.9±0.2	

Treatments: Raw (untreated); HPP: High Pressure Processing; TP: Thermal Processing.

M±SE: Mean ± Standard Error.

^{x y} processing and ^{abcd} storage time effects (same storage time) for P≤0.05.

Units: Vitamin C and sugars: mg 100 ml⁻¹; Total Phenols: mg GAE 100 ml⁻¹.

<LoD: Under Limit of Detection.