



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN Y APLICACIÓN DE
LA HOMOGENIZACIÓN A ULTRA ALTA PRESIÓN COMO TECNOLOGÍA
DE CONSERVACIÓN DE LICUADO DE CHUFA**

Memoria presentada para optar al Grado de
Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

IDOIA CODINA TORRELLA

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2014



ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Profesor Titular de Universidad y BUENAVENTURA GUAMIS LÓPEZ, Catedrático de Universidad, ambos del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),

HACEN CONSTAR: que **IDOIA CODINA TORRELLA** ha realizado, bajo nuestra dirección, en el área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), el trabajo titulado **“Optimización del proceso de elaboración y aplicación de la homogenización a ultra alta presión como tecnología de conservación de licuado de chufa”** que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste firmamos el presente documento en:

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 11 de julio de 2014

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dr. Buenaventura Guamis López

Esta tesis doctoral se ha realizado con la financiación aportada por el Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) y por el proyecto MALTA-CONSOLIDER (CSD 2007-00045).

A la meda familia, fait

AGRAÏMENTS

...la pàgina em quedaria curta per agrair a tots als que m'heu animat i donat un cop de mà durant els anys que he estat realitzant aquesta tesi...

Donar les gràcies al Toni, per la direcció d'aquest treball, la seva atenció, paciència, consells i el procés d'aprenentatge que m'ha donat. És un veritable plaer aprendre al costat d'una persona com tu!

Agrair també al Ventura, per l'oportunitat que em va donar de treballar al CERPTA, compartint les seves experiències per fer-nos créixer professionalment. Agrair-te la dedicació i consells que m'has donat durant tot aquest temps, i per la confiança que sempre m'has demostrat.

Als meus companys de la Planta Pilot, per ser sempre al meu costat i haver-me ajudat tant a cada producció que he tingut a la planta. També agrair als professors, tècnics i becaris del Departament de Ciència Animal i dels Aliments: pels consells, ajuda i els bon moments. És un goig compartir la jornada laboral amb persones com vosaltres. Gràcies per fer-me un cop de mà en els moments que ho he necessitat, i per les bones estones que compartim cada dia. També donar gràcies a totes aquelles persones amb qui m'he "creuat" durant aquests anys que he estat treballant al CERPTA (gent del MALTA, empreses, els GVT), pels bons moments que hem compartit. Moltes gràcies a tots! Durant aquest temps, a més de companys de feina, he trobat veritables amics amb qui espero poder continuar gaudint de molts altres moments plegats.

I finalment, donar les gràcies a la meva família i als meus amics, i especialment al Lets (per la teva paciència i comprensió). Per tenir-vos amb mi ajudant-me, animant-me i fent-me sentir tant estimada. Per tots els "vinga que ja està fet això" que m'heu fet arribar. Aquests últims dies, el mòbil treia fum! Sempre feu que les coses més difícils semblin fàcils al vostre costat. Què faria sense vosaltres?!

Moltes gràcies a tots!!

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo de tesis ha sido la elaboración de un licuado de chufa de calidad y vida útil mejorada, mediante la optimización del proceso de elaboración del producto y su estabilización con la tecnología de homogenización a ultra alta presión, como tecnología alternativa al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional.

El primer estudio se centró en la caracterización físico-química (peso, forma, color, composición general, factores antinutricionales y caracterización de las fracciones proteicas) de cuatro tipos de chufa de diferentes orígenes geográficos (Valencia, Burkina Faso y Níger), las cuales se utilizan en la industria alimentaria para la elaboración de licuados. Las partidas de chufa presentaron cierta variabilidad en sus características físico-químicas, siendo las características relacionadas con sus fracciones proteicas más homogéneas entre ellas. Entre las chufas analizadas, las procedentes de la región de Valencia fueron las que presentaron las mejores características.

El segundo estudio se basó en la optimización de un proceso estándar de fabricación de licuado de chufa. Se ajustaron las condiciones de las etapas de hidratación (tiempo y temperatura de hidratación del tubérculo) y molturación-extracción (adición gradual de agua (1:3 - 1:7), temperatura del agua de extracción ($20 \leq T^a \leq 60^{\circ}\text{C}$), maceración del producto molturado a diferentes temperaturas (5 min, a $20 \leq T^a \leq 60^{\circ}\text{C}$) y reajuste de pH (pH = 6 o 9)). La composición final de los productos dependió del estado de hidratación de las chufas y de la proporción chufa:agua que se utilizó. La extracción de proteína del tubérculo mejoró a partir de chufas hidratadas con un contenido en humedad $\geq 20\%$.

El tercer estudio se basó en la mejora de la calidad nutricional de un licuado de chufa mediante la adición de mijo. Previamente se realizó una caracterización de la semilla de mijo (físico-química, de composición y reducción de los factores antinutricionales mediante su germinación) y posteriormente se estandarizó el proceso de obtención del licuado en la Planta Piloto de la UAB (elaboración del producto y tratamiento de higienización).

En el último estudio se evaluó el efecto de la tecnología emergente de homogenización a ultra alta presión (UHPH) (200 y 300 MPa, a temperatura de entrada del producto de 40 °C) sobre las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas del licuado *horchata de chufa*, en comparación con la aplicación de la tecnología de homogenización-pasteurización térmica (18+4 MPa, 80 °C durante 15 s). Se evaluó también el efecto de los tratamientos de UHPH en el licuado en comparación con la adición de aditivos estabilizantes (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473) en la horchata homogenizada-pasteurizada convencional. Los licuados procesados se almacenaron en refrigeración (4°C) para determinar la evolución de sus características en el tiempo. Todos los tratamientos de higienización mejoraron la vida útil microbiológica de la horchata de chufa cruda (≤ 3 días), en ~ 25 días (homogenizadas-pasteurizadas) y ~ 30 y ~ 58 días (homogenizados a 200 y 300 MPa, respectivamente). Con la tecnología de UHPH se obtuvieron licuados de calidad similar o mejorada (estabilidad coloidal, parámetros físico-químicos y sensoriales) respecto los procesados térmicamente. Por ello, esta tecnología se presentó como una buena alternativa al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional de la horchata de chufa, para la obtención de un producto de mejor calidad y sin aditivos estabilizantes.

RESUM

L'objectiu principal d'aquest treball de tesi ha estat l'elaboració d'un líquat de xufla de qualitat i vida útil millorada, mitjançant l'optimització del procés d'elaboració del producte i la seva estabilització amb la tecnologia d'homogeneïtzació a ultra alta pressió, com a tecnologia alternativa al tractament d'homogeneïtzació-pasteurització convencional.

El primer estudi s'ha centrat en la caracterització físico-química (pes, forma, color, composició general, factors antinutricionals i caracterització de les fraccions proteïques) de quatre tipus de xufla de diferents orígens geogràfics (València, Burkina Faso i Níger), les quals s'utilitzen a la indústria alimentària per a l'elaboració de líquats. Les partides de xufla van presentar certa variabilitat quan a les seves característiques físico-químiques, sent les característiques relacionades amb les seves fraccions proteïques més homogènies entre elles. D'entre les xufles analitzades, les procedents de la regió de València van presentar les millors característiques.

El segon estudi es va basar en l'optimització d'un procés estàndard de fabricació de líquat de xufla. Es van ajustar les condicions de les etapes d'hidratació (temps i temperatura d'hidratació del tubercle) i molturació-extracció (addició gradual d'aigua (1:3 - 1:7), temperatura de l'aigua d'extracció ($20 \leq T^a \leq 60$ °C), maceració del producte molturat a diferents temperatures (5 min a $20 \leq T^a \leq 60$ °C) i ajustament del valor de pH (pH = 6 o 9)). La composició final dels productes va dependre de l'estat d'hidratació de les xufles i de la proporció xufla:aigua que es va emprar. L'extracció de proteïna del tubercle va millorar a partir de xufles hidratades amb un contingut en humitat $\geq 20\%$.

El tercer estudi es va basar en la millora de la qualitat nutricional d'un líquat de xufla mitjançant l'addició de mill. Prèviament es va realitzar una caracterització de la llavor de mill (físico-química, de composició i reducció dels factors antinutricionals mitjançant la seva germinació) i posteriorment, es va estandarditzar el procés d'obtenció del líquat a la Planta Pilot de la UAB (elaboració del producte i tractament d'higienització).

Al darrer estudi, es va avaluar l'efecte de la tecnologia emergent d'homogeneïtzació a ultra alta pressió (UHPH) (200 i 300 MPa, a temperatura d'entrada del producte de 40 °C) sobre les característiques físico-químiques, microbiològiques i organolèptiques del líquat *orxata de xufla*, en comparació amb l'aplicació de la tecnologia d'homogeneïtzació-pasteurització tèrmica (18+4 MPa, 80 °C durant 15 s). Es va avaluar també l'efecte dels tractaments d'UHPH sobre el líquat en comparació amb l'addició d'additius estabilitzants (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473) a l'orxata homogeneïtzada-pasteuritzada convencional. Els líquats processats es van emmagatzemar en refrigeració (4 °C) per determinar l'evolució de les seves característiques en el temps. Tots els tractaments d'higienització van millorar la vida útil microbiològica de l'orxata de xufla crua (≤ 3 dies), en ~ 25 dies (homogeneïtzades-pasteuritzades) i ~ 30 i ~ 58 dies (homogeneïtzades a 200 i 300 MPa, respectivament). Amb la tecnologia d'UHPH es van obtenir líquats de qualitat similar o millorada (estabilitat col·loidal, paràmetres físico-químics i sensorials) respecte els processats tèrmicament. Sent així, aquesta tecnologia es presenta com a una bona alternativa al tractament d'homogeneïtzació-pasteurització convencional de l'orxata de xufla, per a l'obtenció d'un producte de qualitat millorada i sense additius estabilitzants afegits.

ABSTRACT

This doctoral dissertation focuses on the production of a quality tiger nut beverage with extended shelf-life, through the optimization of beverage production and its stabilization with ultra-high pressure homogenization technology, as an alternative technology to the conventional homogenization-pasteurization treatment.

The first study focused on the physico-chemical characterization (weight, shape, color, general composition, anti-nutritional factors and protein fraction characterization) of four types of tiger nuts from different geographical origins (Valencia, Burkina Faso and Niger), which are used in the food industry for the beverage production. Physico-chemical characteristics of tiger nuts varied. Nevertheless, their protein fractions characteristics were similar among them. From the different tiger nuts analyzed, Valencia tubers presented the best characteristics.

The second study consisted in the optimization of a standard process for obtaining tiger nut beverage. Process conditions in soaking (time and temperature) and grinding-extraction (gradual addition of water (1:3 - 1:7), water temperature ($20 \leq T^a \leq 60$ °C), product maceration (5 min, at $20 \leq T^a \leq 60$ °C) and pH adjustment (pH = 6 or 9)) steps were adjusted. Final composition of beverages depended on the water absorbed by tiger nuts and also on the proportion *grain:water*. Tuber protein extraction increased in tiger nuts with a moisture content $\geq 20\%$.

The third study focused on the improvement of the nutritional quality of a tiger nut beverage through the addition of millet. As a first step, the millet seed was characterized (physico-chemical properties, composition and reduction of anti-nutritional factors in seed sprouting). After which, the beverage production was standardized in the Pilot Plant of UAB (process steps and sanitation treatment).

In the last study, the effect of ultra-high pressure homogenization (UHPH) was evaluated (200 and 300 MPa, inlet temperature of 40 °C) on physico-chemical, microbiological and sensory characteristics of *horchata de chufa* beverage, in comparison to the conventional homogenization-pasteurization technology (18+4 MPa, 80 °C during 15 s). Additionally, the effect of UHPH treatments was also examined in comparison to the addition of stabilizing additives (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473) in the conventional homogenized-pasteurized tiger nut beverage. Beverages were stored at refrigeration (4°C) in order to determine the evolution of their characteristics over time. All treatments improved the microbiological shelf-life of raw tiger nut beverage (≤ 3 days), in ~ 25 days (homogenized-pasteurized) and ~ 30 and ~ 58 days (homogenized at 200 and 300 MPa, respectively). UHPH beverages showed similar or improved quality (colloidal stability, physico-chemical parameters and sensorial quality) to thermal pasteurized beverages. Results indicated that UHPH technology was an appropriate alternative to the conventional homogenization-pasteurization treatment of tiger nut beverages for obtaining a beverage with an improved quality without stabilizing additives.

MÉRITOS RELACIONADOS CON ESTE TRABAJO DE TESIS

Capítulo 4

- **Publicación** (*artículo enviado*)
Título: *Characterization and comparison of tiger nuts (Cyperus esculentus) from different geographical origins. Physico-chemical characteristics and protein fractionation.*
Autores: Codina-Torrella, I., Guamis, B., Trujillo, A.J.
Referencia: Industrial Crops and Products (junio, 2014)

Capítulo 5

- **Publicación.**
Título: Elaboración de licuado vegetal en base a chufa (*Cyperus esculentus* L.). Influencia de los parámetros aplicados en las operaciones de hidratación y molturación del tubérculo sobre la composición final del licuado.
Autores: Codina, I., Guamis, B., Trujillo, A.J.
Año: 2009
Referencia: *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos* (404): 62-66.
- **Póster.**
Título: Elaboración de licuado vegetal en base a chufas (*Cyperus esculentus* L.). Influencia de los parámetros de hidratación y molturación del tubérculo sobre la composición final del licuado.
Autores: Codina, I., Quevedo, J.M., Guamis, B., Trujillo, A.J.
Acto: V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Lugar y Fecha: Murcia (España), 26-29 de mayo de 2009.

Capítulo 6

- **Póster.**
Título: Evaluación del proceso de germinación del grano de mijo perla (*Pennisetum glaucum*) en la reducción de factores antinutricionales.
Autores: Codina, I., Guamis, B., Trujillo, A.J.
Acto: VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, CESIA 2010
Lugar y Fecha: Logroño (España), 6-8 de octubre de 2010.

Capítulos 7,8

- **Comunicación Oral.**

Título: Aplicación de la Ultra-Alta presión homogenización en la horchata de chufa como tratamiento alternativo a la pasteurización convencional.

Autores: Codina-Torrella, I., Guamis, B., Trujillo, A.J.

Acto: VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos "CYTA 2013"

Lugar y Fecha: Córdoba (España), 12-14 de junio de 2013.

***Premio a la Mejor Comunicación Oral**

- **Comunicación Oral.**

Título: Efecto de la ultra-alta presión homogenización sobre la estabilidad física de la horchata de chufa.

Autores: Codina-Torrella, I., Guamis, B., Trujillo, A.J.

Acto: 9 CIBIA – Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos

Lugar y Fecha: Valencia (España), 13-16 de enero de 2014.

Capítulo 9

- **Póster.**

Título: Evaluación del perfil de compuestos volátiles de horchata de chufa mediante microextracción en fase sólida. Avenços de l'Espectrometria de Masses per al Control de la Seguretat i l'autenticitat del aliments.

Autores: Gallardo-Chacón, J.J., Klein, B., Codina, I., Trujillo, A.J., Juan, B.

Acto: Avenços de l'espectrometria de masses per al control de la seguretat i l'autenticitat dels Aliments.

Lugar y Fecha: Barcelona (España), 14 de noviembre de 2013.

- **Publicación.**

Título: Evaluation of volatile compounds of "tiger nut beverage" headspace by optimized solid-phase micro-extraction Food Science and Technology Research.

Autores: Gallardo-Chacón, J.J., Klein, B., Codina-Torrella, I., Trujillo, A.J., Juan, B.

Año: 2014

Referencia: Food Science and Technology Research. *In Press*

ÍNDICE

Capítulo 1. Antecedentes, objetivos y plan de trabajo	1
1.1. Antecedentes	3
1.2. Objetivos	5
1.3. Plan de trabajo	6
Capítulo 2. Introducción	13
2.1. Los licuados vegetales	15
2.2. La chufa y el licuado elaborado a partir de chufas	17
2.2.1. La chufa, ingrediente principal del licuado	17
2.2.1.1. <i>La planta y su cultivo</i>	17
2.2.1.2. <i>Problemas asociados con la calidad de las chufas</i>	19
2.2.1.3. <i>Características físico-químicas y nutricionales</i>	19
2.2.1.4. <i>El consumo de la chufa. Usos y aplicaciones a nivel mundial</i>	23
2.2.2. El licuado de chufas	25
2.2.2.1. La horchata de chufa, producto típico de Valencia	26
2.2.2.2. <i>Etapas del proceso de elaboración.</i>	28
2.2.2.3. <i>Subproductos del proceso de elaboración.</i>	30
2.2.2.4. <i>Características físico-químicas, organolépticas y nutricionales</i>	30
2.2.2.5. <i>Los procesos de conservación</i>	31
2.3. La homogenización a ultra alta presión (UHPH)	35
2.3.1. Antecedentes	35
2.3.2. Definición de la tecnología	35
2.3.3. El sistema de UHPH desarrollado por la empresa Stansted™	39
2.2.3.1. <i>Fenómenos físicos a los que el producto es sometido en el equipo</i>	40
2.2.3.2. <i>Incremento de la temperatura durante el tratamiento</i>	41
2.3.4. Aplicaciones de la tecnología en el campo alimentario	42
2.3.5. Aplicación de la UHPH en licuados de origen vegetal	44
2.3.5.1. <i>Efecto sobre la microbiota</i>	45
2.3.5.2. <i>Efecto sobre sus componentes y propiedades físico-químicas</i>	47
2.3.6. La introducción de la UHPH en la industria alimentaria	54
	56
Capítulo 3. Materiales y métodos	
3.1. Recepción de las materias primas y toma de muestras	58
3.2. Caracterización físico-química de las chufas	59
3.2.1. Forma	60
3.2.2. Peso	60

3.2.3. Color	60
3.2.4. Cinética de hidratación	61
3.2.5. Análisis de composición	61
3.2.6. Fraccionamiento proteico	62
3.2.7. Determinación de nitrógeno y proteína total	63
3.2.8. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones proteicas	63
3.3. Caracterización físico-química del mijo	64
3.3.1. Parámetros físicos relacionados	64
3.3.2. Caracterización química	65
3.3.3. Fraccionamiento proteico	65
3.3.4. Determinación de nitrógeno y proteína total	65
3.3.5. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones proteicas	66
3.3.6. Estudio de germinación de las semillas de mijo	66
3.4. Elaboración y tratamientos de higienización aplicados a los licuados	67
3.4.1. Fórmula de las horchatas de chufa	72
3.4.2. Tratamientos de conservación aplicados	72
3.4.3. Envasado y almacenamiento	74
3.5. Caracterización físico-química, microbiológica y sensorial de los licuados	74
3.5.1. Dureza del agua	74
3.5.2. Composición de los licuados	74
3.5.3. pH	75
3.5.4. Color	75
3.5.5. Viscosidad	75
3.5.6. Oxidación lipídica	76
3.5.7. Actividad peroxidasa	76
3.5.8. Determinación del tamaño de partícula	77
3.5.9. Estabilidad coloidal: Turbiscan™	77
3.5.10. Microscopia confocal	79
3.5.11. Microscopia de transmisión electrónica	79
3.5.12. Análisis microbiológicos	80
3.5.13. Análisis sensorial	81
3.5.14. Determinación del perfil volátil	82
3.5.14.1. Optimización del método de extracción	82
3.5.14.2. Selección de la fibra	83
3.5.14.3. Diseño experimental multifactorial para la optimización de las condiciones de extracción	83
3.5.14.4. Extracción de los compuestos volátiles de las horchatas cruda, pasteurizadas y UHPH	84
3.5.14.5. Análisis CG-MS	84
3.5.14.6. Identificación y caracterización de los compuestos volátiles	84
3.6. Análisis estadístico	85

Capítulo 4. Estudio comparativo de cuatro tipos de chufa (<i>Cyperus esculentus L.</i>) de diferente origen geográfico. Características físico-químicas, fraccionamiento proteico y caracterización de las fracciones aisladas	86
4.1. Introducción	88
4.2. Resultados y discusión	89
4.2.1. Caracterización física	90
4.2.1.1. <i>Forma</i>	90
4.2.1.2. <i>Peso</i>	92
4.2.1.3. <i>Color</i>	93
4.2.2. Caracterización química	94
4.2.2.1. <i>Composición nutricional</i>	94
4.2.2.2. <i>Componentes antinutricionales</i>	98
4.2.2.3. <i>Caracterización de las fracciones proteicas de las chufas</i>	99
4.2.2.4. <i>Electroforesis de gel SDS-PAGE</i>	101
4.3. Conclusiones	104
Capítulo 5. Optimización de los parámetros aplicados en las operaciones de hidratación y molturación de las chufas para la obtención de un licuado de composición mejorada.	106
5.1. Introducción	108
5.2. Resultados y discusión	109
5.2.1. Caracterización físico-química de la chufa y cinética de hidratación	109
5.2.2. Influencia de los parámetros aplicados en las operaciones de hidratación y molturación del tubérculo sobre la composición final del licuado vegetal (sólidos totales, grasa y proteína)	113
5.2.2.1. <i>Influencia del tiempo de inmersión de la chufa en agua y de la temperatura del agua de hidratación</i>	113
5.2.2.2. <i>Influencia del porcentaje de agua añadido durante la molturación (proporción chufa:agua).</i>	118
5.2.2.3. <i>Influencia de la temperatura del agua de extracción y de la maceración del producto molturado previa a su prensado y filtrado</i>	118
5.2.2.4. <i>Influencia del pH en el producto molturado</i>	119
5.3. Conclusiones	122
Capítulo 6. Elaboración de un licuado de chufa de composición mejorada mediante la adición de mijo perla (<i>Pennisetum glaucum</i>) como fuente de proteína	124
6.1. Introducción	126
6.2. Resultados y discusión	128
6.2.1. Caracterización físico-química del mijo	128
6.2.1.1. <i>Características físicas</i>	128
6.2.1.2. <i>Composición química</i>	130
6.2.1.3. <i>Estudio de germinación del mijo</i>	133
6.2.1.4. <i>Fraccionamiento proteico</i>	135
6.2.1.5. <i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	136

6.2.2.	Estandarización del proceso de elaboración de un licuado de chufas de composición mejorada	137
6.2.2.1.	<i>Forma de adición de las materias primas chufa y el mijo</i>	138
6.2.2.2.	<i>Estandarización del diagrama de elaboración del licuado</i>	139
6.2.3.	Aplicación de un tratamiento de higienización al licuado de chufa y mijo	141
6.3.	Conclusiones	143

Capítulo 7. Evaluación del efecto de la ultra alta presión homogenización en la horchata de chufa cruda, en comparación con el tratamiento de homogenización-pasteurización convencional

7.1.	Introducción	144
7.2.	Resultados y discusión	146
7.2.1.	Incremento de la temperatura del licuado con los tratamientos de pasteurización y UHPH	147
7.2.2.	Composición de las horchatas	149
7.2.3.	Recuentos microbiológicos	151
7.2.4.	Características fisico-químicas de los licuados	156
7.2.4.1.	<i>pH</i>	156
7.2.4.2.	<i>Actividad de la enzima peroxidasa</i>	157
7.2.4.3.	<i>Tamaño de partícula y microscopía (Confocal y TEM)</i>	158
7.2.4.4.	<i>Viscosidad</i>	169
7.2.4.5.	<i>Color</i>	171
7.2.4.6.	<i>Oxidación de la grasa: índice de peróxidos y compuestos volátiles relacionados</i>	173
7.2.5.	Evaluación sensorial	178
7.3.	Conclusiones	182

Capítulo 8. La homogenización a ultra alta presión como tecnología alternativa al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional para la obtención de una horchata de chufa de vida útil mejorada

8.1.	Introducción	184
8.2.	Resultados y discusión	186
8.2.1.	Microbiología y pH	187
8.2.2.	Estabilidad fisico-química	187
8.2.2.1.	<i>Oxidación de la grasa: compuestos volátiles relacionados</i>	193
8.2.2.2.	<i>Color</i>	193
8.2.2.3.	<i>Estabilidad coloidal</i>	196
8.2.3.	Evaluación sensorial de los licuados durante su almacenamiento en frío	198
8.3.	Conclusiones	209
		214

Capítulo 9. Efecto de los tratamientos de homogenización-pasteurización convencional y homogenización a ultra alta presión sobre el perfil volátil de la horchata de chufa	216
9.1. Introducción	218
9.2. Resultados y Discusión	220
9.2.1. Puesta a punto del sistema de extracción e identificación	220
9.2.1.1. Selección de la fibra	220
9.2.1.2. Fuerza iónica, temperatura y volumen de muestra	222
9.2.2. Caracterización del perfil volátil de las horchatas elaboradas y procesadas cruda, homogenizadas-pasteurizadas (P1 y P2) y UHPH (200 y 300 MPa)	226
9.2.2.1. Efecto del tratamiento aplicado sobre los compuestos volátiles de la horchata de chufa cruda	226
9.2.2.1.1. Compuestos aromáticos	230
9.2.2.1.2. Alcoholes	232
9.2.2.1.3. Aldehídos	234
9.2.2.1.4. Cetonas	236
9.2.2.1.5. Terpenos	238
9.2.2.1.6. Ácidos, ésteres, diacepinas y furanos	240
9.2.2.2. Análisis de componentes principales (ACP)	243
9.2.3. Evolución del perfil de volátiles de los licuados durante su vida útil	246
9.3. Conclusiones	257
Capítulo 10. Conclusiones	258
Capítulo 11. Bibliografía	266
Anexo I	286

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Licuados vegetales que podemos encontrar en el mercado.	16
Tabla 2.2. Aplicaciones de la chufa a nivel mundial.	24
Tabla 2.3. Etapas del proceso de elaboración de la horchata de chufa, según el método tradicional.	28
Tabla 2.4. Tratamientos de conservación aplicados a la horchata de chufa para mejorar su calidad microbiológica.	33
Tabla 2.5. Algunos de los equipos de HPH que podemos encontrar en el mercado, para aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, biotecnológica o cosmética.	38
Tabla 3.1. Ingredientes y aditivos añadidos a las horchatas de chufa.	72
Tabla 4.1. Longitud (Lg), grosor (G) y chufas de cada forma/saco (%).	91
Tabla 4.2. Peso de las chufas analizadas.	92
Tabla 4.3. Parámetros de color de la piel de las chufas.	93
Tabla 4.4. Composición (% en base seca) de las chufas.	95
Tabla 4.5. Contenido en fitatos y taninos (en base seca) en las chufas.	98
Tabla 4.6. Fracciones proteicas de las chufas según la clasificación propuesta por Osborne.	100
Tabla 5.1. Longitud ₁ , grosor ₁ y peso ₁ de las chufas africanas que se utilizaron en este estudio.	109
Tabla 5.2. Composición (% en base seca) de las chufa.	110
Tabla 5.3. Porcentaje de extracto seco de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.	114
Tabla 5.4. Porcentaje de grasa de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.	115
Tabla 5.5. Porcentaje de proteína de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.	116
Tabla 5.6. Extracto seco, proteína y grasa de los licuados elaborados a temperatura de agua de molturación de 20, 40, 50 y 60 °C con mantenimiento durante 5 min al baño maría (L _m) y sin mantenimiento (L).	119
Tabla 5.7. Valores de pH de los licuados obtenidos a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C, durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.	120
Tabla 5.8. Porcentajes de proteína extraídos ₁ en los diferentes licuados después de reajustar el valor de pH del producto molturado.	121
Tabla 6.1. Propiedades físicas del mijo perla.	128
Tabla 6.2. Composición (% en base seca) de la semilla de mijo perla.	131
Tabla 6.3. Fracciones proteicas del mijo según la clasificación propuesta por Osborne.	135
Tabla 6.4. Composición de los licuados de mijo y chufa obtenidos en el laboratorio.	139
Tabla 6.5. Composición del licuado después de la secuencia de operaciones realizadas en la <i>etapa 3</i> .	140
Tabla 6.6. Composición del licuado después de la secuencia de operaciones realizadas en la <i>etapa 4</i> .	141
Tabla 6.7. Composición del licuado de chufa y mijo después de la aplicación de cada operación.	142
Tabla 7.1. Cambios de temperatura registrados en las horchatas durante el tratamiento de UHPH.	148

Tabla 7.2. Composición (%) de las horchatas elaboradas en este estudio.	149
Tabla 7.3. Recuentos microbiológicos (log ufc/mL) de las horchatas a día 1.	152
Tabla 7.4. Actividad de la enzima peroxidasa en la horchata antes y después de la aplicación de los tratamientos de higienización (pasteurización convencional y UHPH) ¹ .	157
Tabla 7.5. Parámetros correspondientes al análisis de tamaño de partícula de las horchatas cruda, pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión.	160
Tabla 7.6. Parámetros de color obtenidos del análisis de las diferentes horchatas.	172
Tabla 7.7. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba de ordenación.	181
Tabla 7.8. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba hedónica.	181
Tabla 8.1. Recuentos microbiológicos (log ufc/mL) de las horchatas cruda, pasteurizadas (P1 y P2) y homogenizadas a ultra alta presión (200 y 300 MPa) durante su almacenamiento a 4°C.	189
Tabla 8.2. Valores de la fase de latencia (fase lag) y velocidad máxima (μ máx) de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos psicrótrofos en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión.	191
Tabla 8.3. Evolución del color de las horchatas durante su almacenamiento en frío.	197
Tabla 8.4. Parámetros correspondientes a la distribución del tamaño de partícula de las horchatas durante su vida útil.	205
Tabla 8.5. Evolución de la viscosidad (mPa/s) de las horchatas durante su vida útil.	207
Tabla 8.6. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba de ordenación de las horchatas almacenadas durante 14, 20, 27 y 56 días.	213
Tabla 8.7. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba hedónica de las horchatas almacenadas durante 14, 20, 27 y 56 días	214
Tabla 9.1. Suma de áreas ¹ correspondiente a los compuestos volátiles detectados por los cuatro tipos de fibra.	221
Tabla 9.2. Resultados del diseño de análisis factorial para la optimización de las condiciones de extracción de los componentes volátiles de la horchata de chufa.	224
Tabla 9.3. Compuestos volátiles identificados en las horchatas de chufa cruda, homogenizadas-pasteurizadas (P1 y P2) y UHPH (200 y 300 MPa).	227
Tabla 9.4. Compuestos volátiles detectados ¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) en las horchatas de chufa después de su elaboración y tratamiento.	229
Tabla 9.5. Compuestos aromáticos ¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.	231
Tabla 9.6. Alcoholes ¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.	232
Tabla 9.7. Aldehídos ¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.	235
Tabla 9.8. Cetonas ¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectadas en la fracción volátil de las horchatas de chufa.	237
Tabla 9.9. Terpenos ¹ detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.	239
Tabla 9.10. Compuestos minoritarios ¹ detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.	241
Tabla 9.11. Porcentaje de varianza calculado correspondiente a los dos componentes	245

principales PC1 y PC2.

Tabla 9.12. Evolución de las diferentes familias de compuestos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol/mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	249
Tabla 9.13. Evolución de los compuestos aromáticos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	250
Tabla 9.14. Evolución de los alcoholes (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	251
Tabla 9.15. Evolución de los aldehídos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	252
Tabla 9.16. Evolución de las cetonas (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	253
Tabla 9.17. Evolución de los terpenos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	254
Tabla 9.18. Evolución de los ácidos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	255
Tabla 9.19. Evolución de los furanos, ésteres, diacepinas y alquenos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol/mL de horchata) en las horchatas ¹ durante su almacenamiento en frío.	256

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. (<i>Estudio 1</i>) Caracterización físico-química de cuatro partidas de chufa de diferente origen geográfico.	8
Figura 1.2. (<i>Estudio 2</i>) Optimización del proceso de elaboración del licuado de chufa para maximizar la extracción de sólidos totales, grasa y proteína del tubérculo.	9
Figura 1.3. (<i>Estudio 3, etapa 1</i>) Caracterización de la composición y características físico-químicas del mijo perla. Efecto de la germinación de la semilla sobre los factores antinutricionales (fitatos, taninos e inhibidores tripsicos) del grano.	10
Figura 1.4. (<i>Estudio 3, etapa 2</i>) Pruebas previas en el laboratorio para definir el formato de mezcla de los principales ingredientes del licuado.	10
Figura 1.5. (<i>Estudio 3, etapas 3</i>) Secuencia de las operaciones realizadas para la optimización de la composición de los licuados a base de chufa y mijo. Evaluación de las características del producto final.	11
Figura 1.6. (<i>Estudio 4</i>) Tratamientos aplicados a la horchata de chufa y evaluación de las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas después de los tratamientos aplicados y durante la vida útil de los licuados.	12
Figura 2.1. La planta de la chufa (A) y detalle de su sistema radicular con algunas chufas en sus extremos (B).	18
Figura 2.2. Esquema del tubérculo de la chufa.	21
Figura 2.3. Composición nutricional estándar de la chufa (%).	22
Figura 2.4. (A) Horchata de chufa valenciana y (B) chufas en un mercado africano.	25
Figura 2.5. Esquema de la válvula de Gaulin.	36
Figura 2.6. Esquema de la válvula de UHPH de la empresa Stansted Fluid Power.	39
Figura 2.7. Esquema del sistema de UHPH diseñado y patentado por el CERPTA.	40
Figura 2.8. Emulsiones correspondientes a un licuado vegetal (A) recién elaborado y (B) después de su homogenización.	49
Figura 3.1. Esquema de las medidas D, D ₁ , D ₂ y D ₃ tomadas en el grano de mijo.	59
Figura 3.2. Diagrama de elaboración de los licuados vegetales.	67
Figura 3.3. Acondicionamiento de las chufas para la elaboración de licuado.	70
Figura 3.4. Elaboración y tratamiento de las horchatas de chufa.	71
Figura 3.5. Sistema de UHPH de la Planta de Tecnología de Alimentos del CERPTA.	73
Figura 3.6. Representación de los principales fenómenos de desestabilización (sedimentación y cremado) en bebidas, determinados por el equipo Turbiscan™ Classic MA 2000.	78
Figura 4.1. Imagen de las chufas valencianas – CHV (A), nigerianas – CHN (B) y burkineanas – CHB1 (C) y CHB2 (D) caracterizadas en este estudio.	90
Figura 4.2. Geles de electroforesis SDS-PAGE correspondientes a las fracciones de proteína aisladas en los diferentes tipos de chufa.	103
Figura 5.1. Cinética de hidratación de las chufas en agua a 10 °C (Δ), 20 °C (■) y 30 °C (◆).	112
Figura 5.2. Porcentaje de proteína de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10 °C (▲), 20 °C (■) y 30 °C (◆) durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.	117
Figura 5.4. Licuados obtenidos a temperatura de agua de molturación de (A,B) 20 °C y 40 °C (C,D).	122
Figura 6.1. Imagen del mijo perla caracterizado en este estudio.	129
Figura 6.2. Semillas de mijo germinadas en el laboratorio durante (A) 24 y (B) 48 h.	133
Figura 6.3. Cambios en el contenido en fitatos (◆, mg/100 g), taninos (■, mg/100 g)	134

y actividad trípica (▲, TIU/100 g) durante la germinación del mijo a 30 °C. Resultados expresados sobre materia seca.

Figura 6.4. Gel de electrophoresis SDS-PAGE de las fracciones aisladas. A: Albúminas + NNP; Go: Globulinas; P: Prolaminas; Gu: Glutelinas;	136
Figura 7.1. Resultado de la prueba cualitativa de detección de almidón en las horchatas.	151
Figura 7.2. Distribución del tamaño de partícula de las horchatas elaboradas.	159
Figura 7.3. Micrografías confocales de las horchatas de chufa	163
Figura 7.4. Micrografías de transmisión electrónica correspondientes a las horchatas de chufa.	169
Figura 7.5. Micrografía confocal en perspectiva tridimensional de una sección en la horchata de chufa cruda. GG: gotas de grasa.	167
Figura 7.6. Micrografías de transmisión electrónica correspondientes a las horchatas	168
Figura 7.7. Contenido en hexanal, octanal, nonanal y aldehídos totales en las horchatas de chufa.	177
Figura 7.8. Atributos sensoriales evaluados en las horchatas.	179
Figura 8.1. Evolución de los recuentos de microorganismos psicrótrofos y del valor de pH de las horchatas P1, P2, 200 MPa y 300 MPa durante el tiempo de almacenamiento de los productos en frío (4 °C).	190
Figura 8.2. Contenido de aldehídos totales (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol por mL de horchata) en las horchatas P1, P2, 200 y 300 MPa.	194
Figura 8.3. Variación del porcentaje de luz difractada (o Backscattering) en las horchatas pasteurizadas y UHPH durante su almacenamiento en frío.	199
Figura 8.4. Cinética de sedimentación y cremado de las partículas en la horchata de chufa cruda durante su vida útil.	200
Figura 8.5. Evolución de las medidas de BS (Backscattering) y T (Transmisión) en el tiempo de almacenamiento de la horchata cruda.	202
Figura 8.6. Cinética de cremado de las partículas en las horchatas P1, P2, 200 MPa y 300 MPa durante el tiempo de almacenamiento de los productos en frío (4 °C).	204
Figura 8.7. Grosor de la capa de cremado en las horchatas P1, P2, 200 MPa y 300 MPa durante el tiempo de almacenamiento de los productos en frío (4 °C).	204
Figura 8.8. Evolución de la medida de BS en el tiempo de conservación de las horchatas	206
Figura 8.9. Índice de estabilidad (TSI) de las horchatas	208
Figura 8.11. Atributos sensoriales evaluados en las horchatas	211
Figura 9.1. Gráfico obtenido en el análisis de los componentes principales de las muestras, definido por los dos primeros componentes principales PC1 y PC2.	244

Capítulo 1

Antecedentes, objetivos y plan de trabajo

1

Antecedentes, objetivos y plan de trabajo

1.1. Antecedentes

En los últimos años, el consumo de licuados de origen vegetal ha experimentado un notable crecimiento. La demanda de la población por bebidas alternativas a la leche, debido a problemas de intolerancia o alergia a sus componentes, ha contribuido al desarrollo y comercialización de estos productos en la sociedad occidental (Donkor *et al.*, 2007; Khantisophon *et al.*, 2007). A parte, diferentes expertos en el campo de la alimentación destacan las características nutricionales de estos licuados (su contenido calórico, el perfil de sus grasas, la no presencia de lactosa y su contenido en minerales y vitaminas, entre otros), intrínsecamente asociadas a diferentes beneficios para la salud. Por todo ello, la elaboración de licuados vegetales ha despertado un gran interés en la industria alimentaria, siendo cada vez más las empresas que se dedican a este tipo de bebida.

En la actualidad, estos licuados se pueden encontrar fácilmente en los lineales de la mayoría de supermercados, y bajo un gran abanico de diferentes formatos y marcas. Entre estos destacan los licuados de soja, arroz, avena, almendra, chufa y nueces, así como algunos licuados elaborados en base a mezclas de diferentes granos. Cabe destacar que gran parte de los licuados vegetales contienen porcentajes de proteína limitados y carecen de ciertos nutrientes, por lo que la elaboración de licuados vegetales enriquecidos se presenta como una tendencia emergente.

El licuado de chufa es un producto obtenido a partir de las chufas, unos tubérculos que crecen, mayoritariamente, en regiones mediterráneas. Las referencias más antiguas de este tubérculo constan en África y España (Tigernuts Traders, S.L., 2014). El licuado destaca por sus características nutricionales y, a la vez, por su perfil organoléptico, dulce y agradable, mejorado en comparación al de muchos licuados vegetales cuyos ingredientes principales aportan sabores desagradables (o más insípidos) al paladar (Belewu, 2007). En Valencia, destaca la conocida *horchata de chufa*, producto histórico

y tradicional elaborado en base a chufas, agua y azúcar. Recientemente, la industria alimentaria ha revalorizado este licuado, por lo que hoy en día sus exportaciones se realizan a nivel mundial (CRCHV, 2014). Todo ello hace necesaria la aplicación de tecnologías que incrementen la vida útil del producto, normalmente no superior a tres días. Entre las tecnologías más utilizadas por la industria horchatera destacan las tecnologías térmicas de pasteurización y esterilización convencionales, las cuales mejoran sustancialmente la vida útil de la horchata pero modifican, en gran parte, sus características sensoriales en comparación con el producto fresco, cualidades muy apreciadas por el consumidor y que la industria persigue preservar al máximo (Corrales *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2004).

Una de las líneas de investigación con más interés en el campo de la tecnología de alimentos es la búsqueda de tecnologías no térmicas, alternativas a las convencionales, que permitan obtener productos microbiológicamente seguros y que alteren el mínimo las cualidades de los productos frescos. Todo ello deviene de la demanda de un consumidor que, cada vez más, exige productos lo más parecidos posibles a sus homólogos sin procesar, cuyas características nutricionales y sensoriales se preserven después de la aplicación de los tratamientos de higienización. La homogenización a ultra alta presión, conocida también con el nombre de UHPH de sus siglas en inglés, es una tecnología de procesado en continuo para la higienización y conservación de productos alimenticios líquidos, a la cual se le asocian resultados muy prometedores (Donsí *et al.*, 2009; Dumay *et al.*, 2012). Actualmente, la transferencia de esta tecnología a la industria alimentaria se ve limitada por el escalado de estos equipos, los cuales trabajan a caudales de hasta ~ 120 l/h.

El *Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia del Aliments* (CERPTA), de la Universitat Autònoma de Barcelona, trabaja con la UHPH desde el año 2000, participando en diferentes proyectos nacionales e internacionales. Gracias a las investigaciones que ha realizado, el centro posee una gran experiencia y conocimiento sobre el procesado de diferentes tipos de alimentos mediante esta tecnología, así como también en la elaboración de productos derivados a partir de los productos tratados por UHPH (Amador-Espejo *et al.*, 2014; Cruz, 2008; Pereda, 2008; Serra *et al.*, 2009; Suárez-Jacobo, 2011; Zamora, 2009). En licuados vegetales, el CERPTA ha realizado

estudios exhaustivos y completos en los licuados de soja y almendra, observando que con esta tecnología se consiguen productos de vida útil mejorada que preservan, en mayor medida, las características nutricionales y organolépticas de los productos frescos, presentando a su vez una estabilidad físico-química mejorada en comparación con las tecnologías térmicas convencionales (Cruz, 2008; Poliseli-Scopel, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013).

Considerando todo lo comentado previamente, en este trabajo de Tesis se plantearon los objetivos que se presentan a continuación.

1.2. Objetivos

El **objetivo general** de esta tesis ha sido la elaboración de un licuado de chufa de alta calidad y vida útil mejorada, mediante la optimización del proceso de elaboración del producto y su estabilización con la tecnología de homogenización a ultra alta presión, como tecnología alternativa al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional.

Para cumplir con el objetivo general propuesto, se definieron los **objetivos específicos** siguientes:

- Realizar un estudio comparativo de las características físico-químicas y de composición de variedades de chufa de diferente origen, las cuales actualmente se utilizan en la industria alimentaria para la elaboración de licuado de chufa.
- Basándonos en un proceso estándar de fabricación, optimizar el proceso de elaboración del licuado de chufa, por lo que a la máxima extracción de sólidos totales, grasa y proteína del tubérculo se refiere.
- Elaborar un licuado de chufa de composición mejorada, mediante la adición de mijo como fuente de proteína.
- Evaluar el efecto del tratamiento de homogenización a ultra alta presión sobre las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas de uno de los licuados de chufa más comercializados del momento, la horchata de chufa

valenciana, en comparación con sus homólogas cruda y pasteurizada-homogenizada convencionalmente (con y sin aditivos estabilizantes).

- Realizar un estudio de vida útil, en refrigeración, de los productos elaborados y procesados (horchata cruda, pasteurizada-homogenizada convencionalmente y homogenizada a ultra alta presión) para determinar la evolución de sus características en el tiempo. Con ello, evaluar también si la tecnología de UHPH se presenta como alternativa para obtener una horchata de chufa estable comercialmente, sin aditivos estabilizantes añadidos.
- Estudiar y comparar el perfil aromático (compuestos volátiles) de los licuados elaborados y procesados, así como también su evolución durante la vida útil de las bebidas.

1.3. Plan de trabajo

Para la realización de esta tesis se plantearon cuatro estudios diferentes, los cuales se detallan en las Figuras que se adjuntan a continuación.

El *Estudio 1* (Figura 1.1) correspondió a la caracterización físico-química y de composición de cuatro partidas de chufa de diferente origen geográfico, las cuales hoy en día se utilizan para la fabricación de licuado de chufa. Se determinaron las características físicas peso, forma y color superficial de los tubérculos, así como también su contenido en humedad, proteína, grasa, cenizas, fibra (bruta y dietética), materias extractivas libres de nitrógeno (o MELN) y factores antinutricionales (fitatos y taninos). En este estudio se hizo especial atención a la caracterización de la proteína de las chufas desde un punto de vista de su solubilidad (Osborne, 1924), caracterizándose también los polipéptidos de las fracciones proteicas que se aislaron mediante electroforesis de gel SDS-PAGE.

En los *Estudios 2 y 3* (Figuras 1.2, 1.3, 1.4 y 1.5) se trabajó con licuado de chufa, entendiendo como licuado al producto elaborado a partir de chufas y agua.

En el Estudio 2 se ajustaron algunos aspectos del proceso de elaboración del producto (condiciones de las etapas de hidratación (tiempo y temperatura de hidratación del tubérculo) y molturación-extracción (adición gradual de agua, temperatura del agua de extracción, maceración del producto molturado y reajuste de pH)) para la optimización de la extracción de los componentes del grano (sólidos totales, grasa y proteína) en la fase acuosa. Este experimento se realizó a nivel de laboratorio.

En el *Estudio 3* se diseñó un protocolo de elaboración de un licuado de chufa de composición mejorada, enriquecido con mijo como fuente de proteína. En la primera parte de este estudio *etapa 1, estudio 3*), se determinaron las características físico-químicas de la semilla de mijo y se realizó un estudio de germinación para evaluar la efectividad de este proceso en la disminución de los factores antinutricionales de la semilla. Posteriormente, se estandarizó el proceso de elaboración del licuado en base a chufas y mijo, contemplando el formato de adición de los ingredientes en el producto (*etapa 2, estudio 3*, realizada en el laboratorio) y la optimización de la composición final del producto en base a las operaciones realizadas con los equipos de la Planta Piloto del centro (*etapa 3, estudio 3*).

En el *Estudio 4* (Figura 1.6) se trabajó con el licuado *horchata de chufa*, la cual se elaboró en las instalaciones de la Planta Piloto del CERPTA. La horchata de chufa cruda se procesó mediante las tecnologías de homogenización-pasteurización convencional (18 + 4 MPa y 80 °C, 15 s) y UHPH (200 y 300 MPa, $T_i = 40$ °C). A una parte del producto crudo se le añadieron aditivos estabilizantes, la cual se higienizó mediante el tratamiento de homogenización-pasteurización convencional. En la primera etapa de este estudio se estudió el efecto de los tratamientos aplicados sobre las características del producto (físico-químicas, de composición, microbiológicas y organolépticas), en comparación con el licuado crudo. Posteriormente, en una segunda etapa, los licuados se almacenaron a temperatura de refrigeración (4 °C) y se determinó la evolución de sus características durante su vida útil microbiológica.

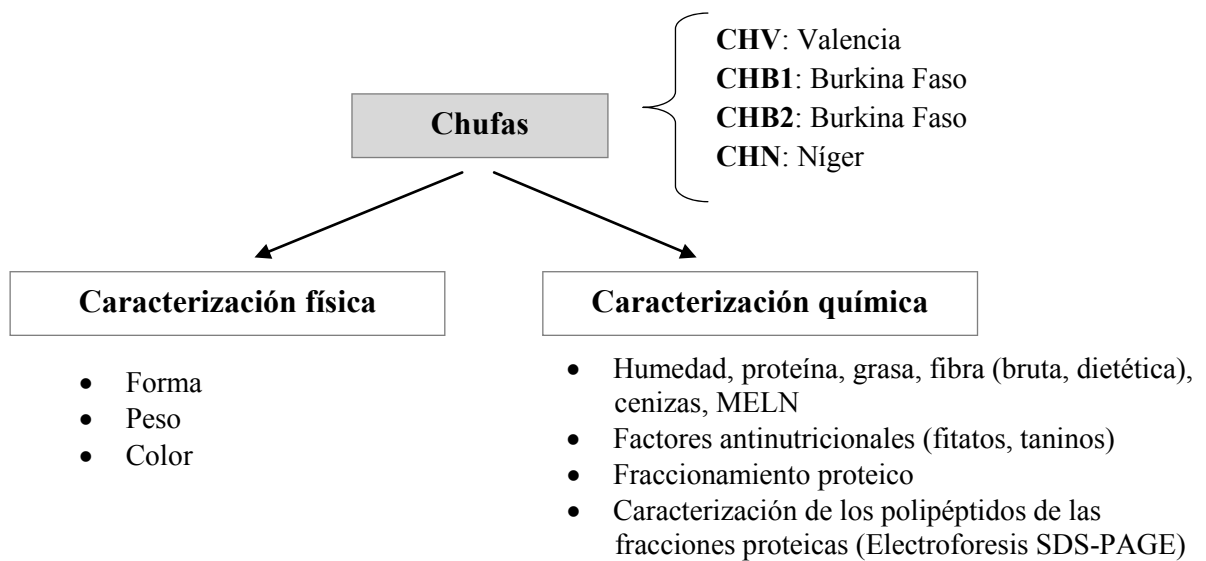


Figura 1.1. (Estudio 1) Caracterización físico-química de cuatro partidas de chufa de diferente origen geográfico.

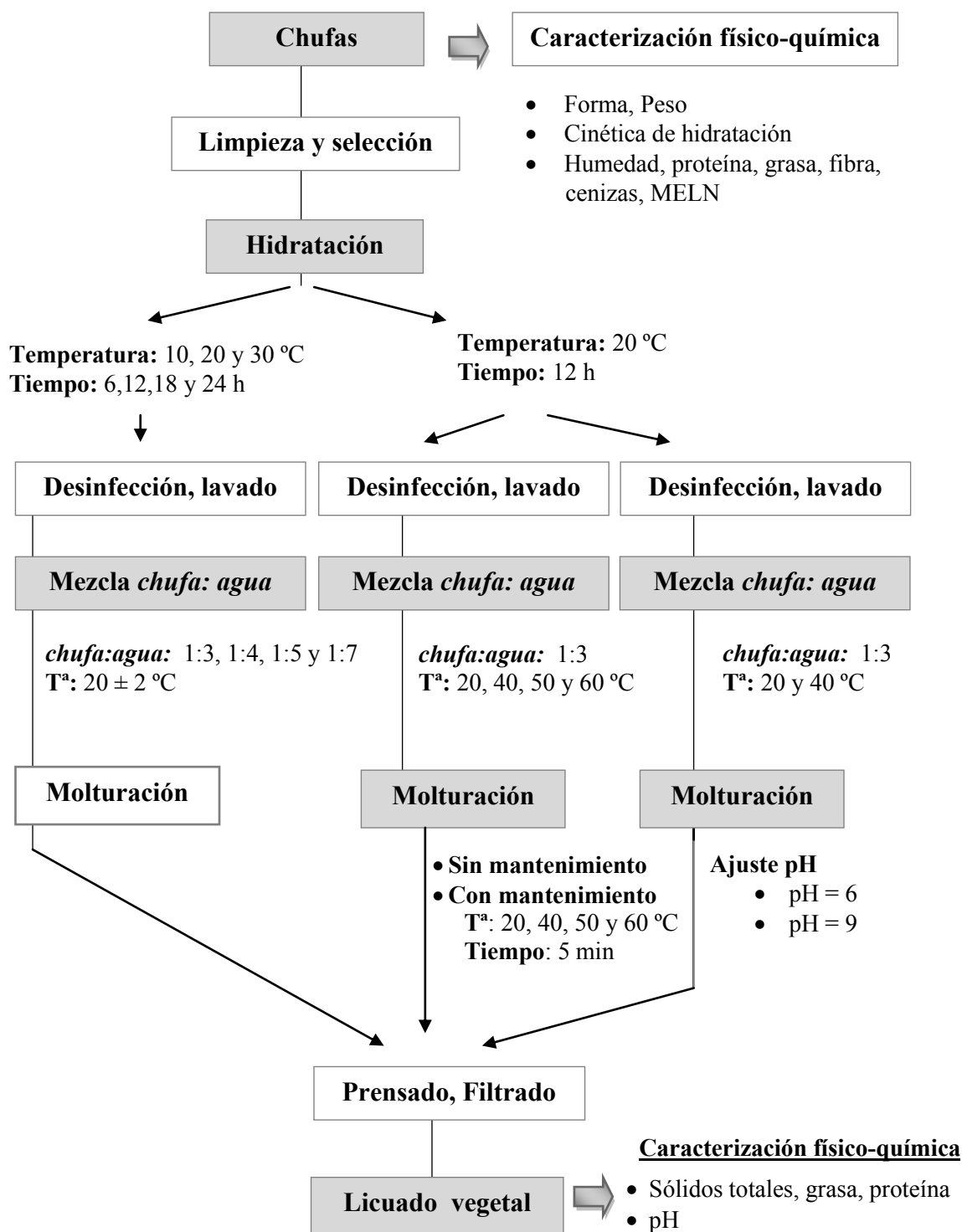


Figura 1.2. (Estudio 2) Optimización de l proceso de elaboración de l licuado de chufa para maximizar la extracción de sólidos totales, grasa y proteína del tubérculo.

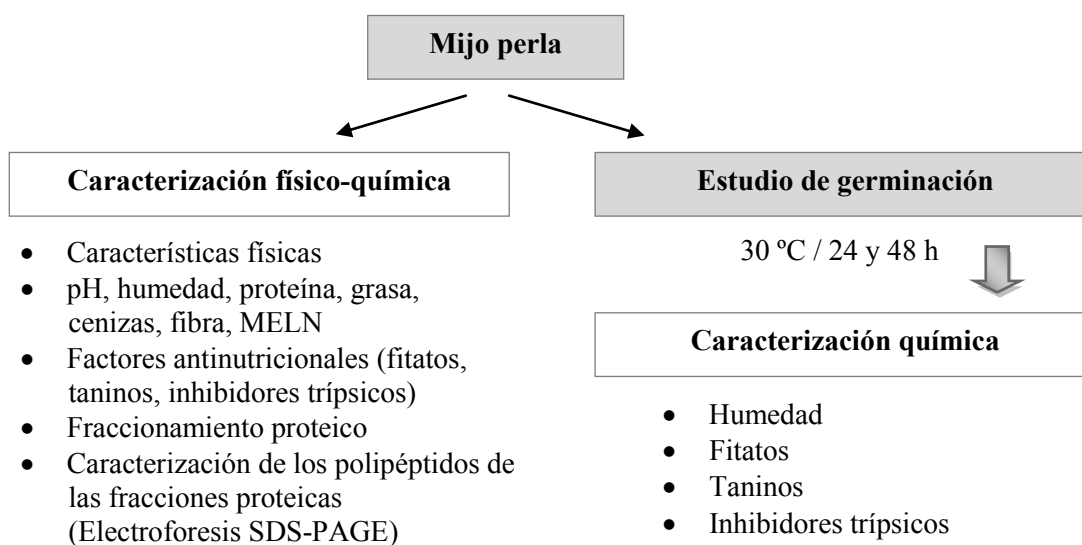


Figura 1.3. (Estudio 3, etapa 1) Caracterización de la composición y características físico-químicas del mijo perla. Efecto de la germinación de la semilla sobre los factores antinutricionales (fitatos, taninos e inhibidores trépsicos) del grano.

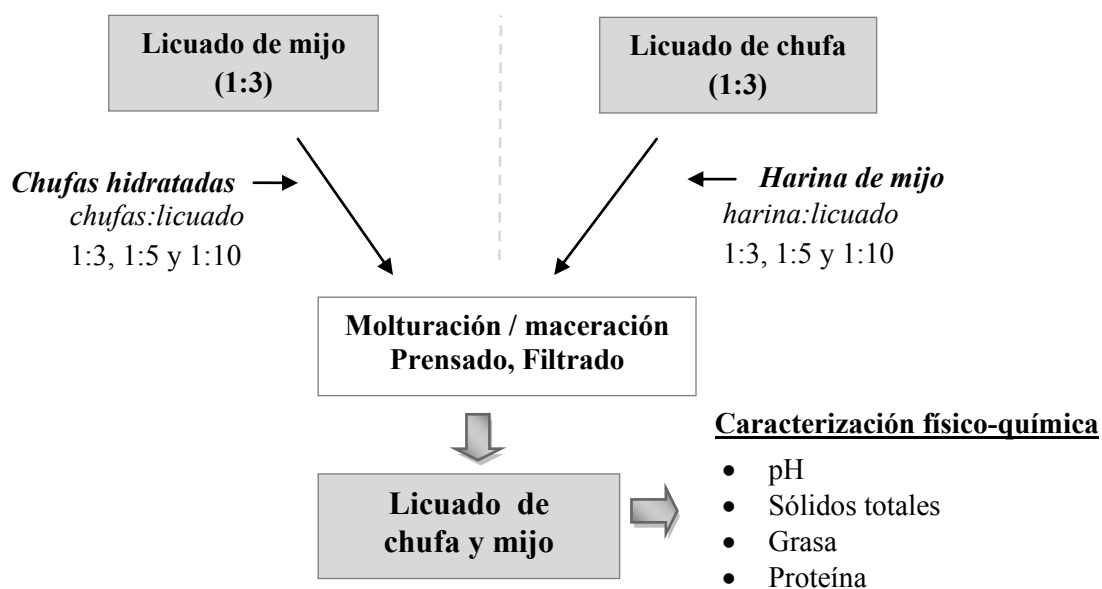


Figura 1.4. (Estudio 3, etapa 2) Pruebas previas en el laboratorio para definir el formato de mezcla de los principales ingredientes del licuado.

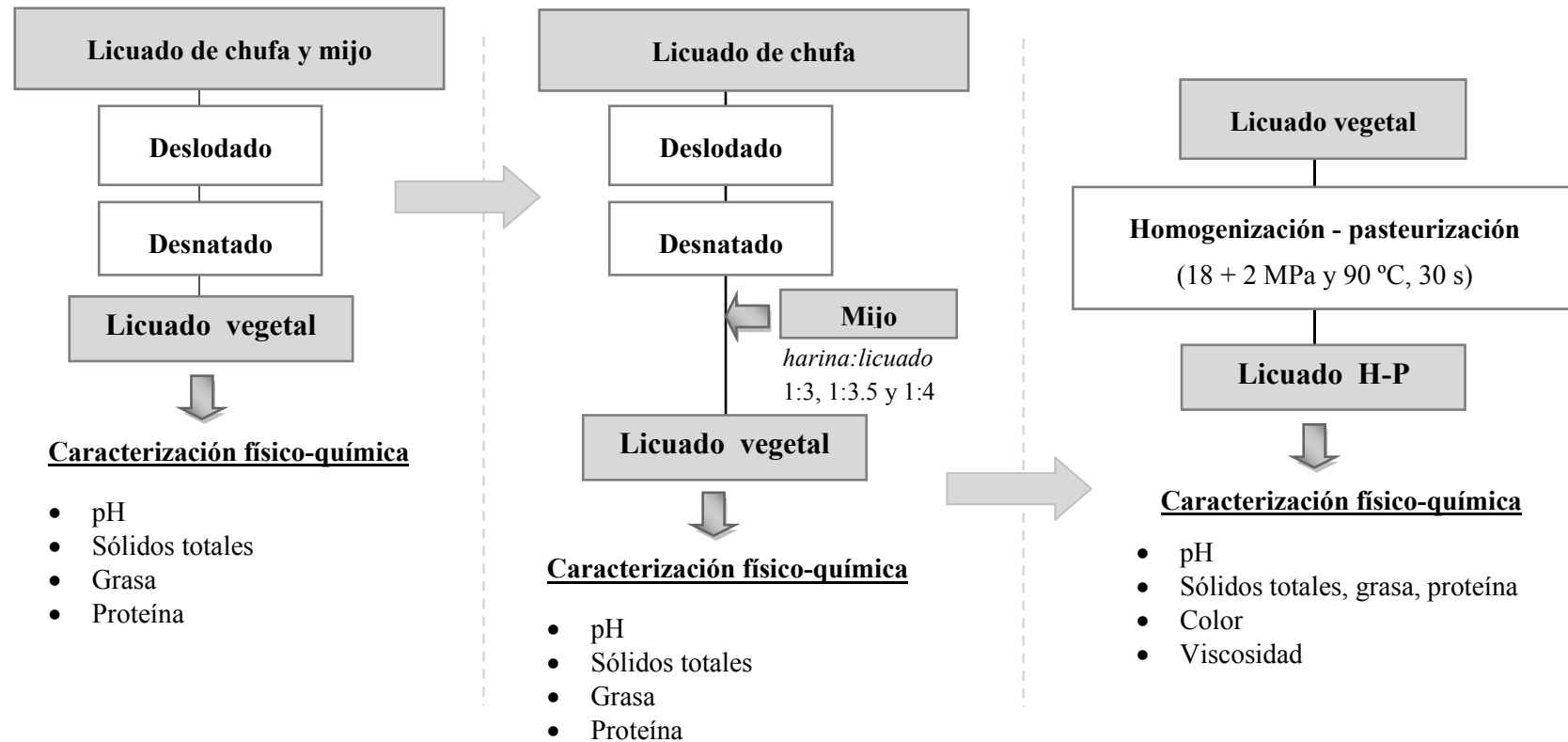
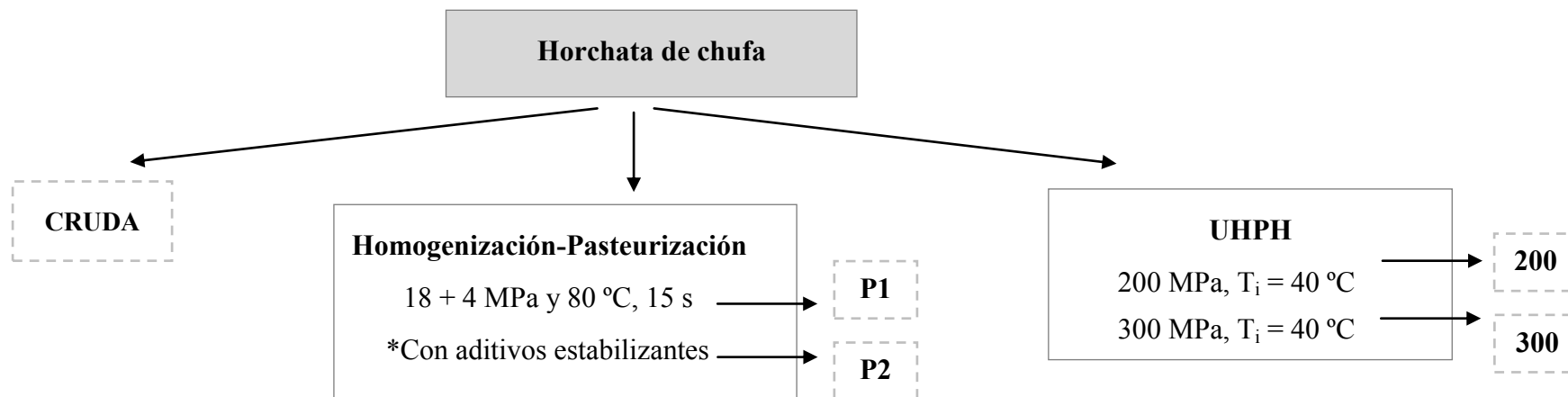


Figura 1.5. (Estudio 3, etapas 3) Secuencia de las operaciones realizadas para la optimización de la composición de los licuados a base de chufa y mijo. Evaluación de las características del producto final.



Almacenamiento de los licuados en refrigeración (4 °C) y análisis de evolución de sus características

Análisis microbiológicos

- Mesófilos totales
- Psicrótrofos totales
- Esporas mesófilas
- Enterobacterias, Coliformes y *E.coli*
- Lactobacilos
- Hongos y levaduras

Análisis físico-químicos

- Composición básica
- pH, Color, Reología
- Actividad de la enzima peroxidasa (*día 1*)
- Distribución del tamaño de partícula
- Microestructura (microscopía confocal y electrónica) (*día 1*)
- Estabilidad física de la emulsión
- Oxidación lipídica
- Perfil de los compuestos volátiles

Análisis organolépticos

- Test Descriptivo
- Test de Preferencia y Aceptación

Figura 1.6. (Estudio 4) Tratamientos aplicados a la horchata de chufa y evaluación de las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas después de los tratamientos aplicados y durante la vida útil de los licuados.

Capítulo 2

Introducción

Introducción

2.1. Los licuados vegetales

Los licuados vegetales son bebidas que se elaboran a partir de la molturación de diferentes tipos de semillas y/o granos con agua. Antiguamente, la elaboración y consumo de estas bebidas se realizaba de manera regional, por lo que estos productos se consumían en territorios muy concretos y no se encontraban dentro del mercado de la industria alimentaria. Sus orígenes se relacionan con la valorización de productos autóctonos, debido a sus propiedades nutritivas y organolépticas, así como también con sus efectos beneficiosos para la salud. En la sociedad oriental, el consumo de licuados vegetales data desde hace más de 2000 años, con la conocida *leche de soja*, licuado vegetal rico en grasa y proteína al que también se le atribuían propiedades funcionales (Fukushima, 2001). Recientemente, la demanda de productos alternativos por parte de personas con problemas relacionados con el consumo de leche ha despertado el interés de la industria por la elaboración y explotación de estos productos (Donkor *et al.*, 2007; Khantisophon *et al.*, 2007). Cabe tener en cuenta que los licuados vegetales poseen propiedades nutricionales muy interesantes, debido principalmente a su perfil lipídico (normalmente rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados), su balance en grasa y proteína, su contenido en fibra, vitaminas y minerales, así como también a la presencia de algunos componentes con propiedades funcionales (compuestos antioxidantes, enzimas digestivas, etc.).

Hasta el momento, son varios los licuados vegetales que encontramos en el mercado. Entre ellos, destacan los procedentes de los cereales arroz o mijo, de los frutos secos almendra, avellana o nuez, de la leguminosa soja o de los tubérculos mandioca y chufa. La Tabla 2.1 muestra las características de algunos de ellos. Por su composición y origen, estos extractos acuosos son productos complejos, en los que coexisten diferentes componentes en suspensión (gotas de grasa, hidratos de carbono, cuerpos proteicos, partículas sólidas procedentes de la molturación de los granos o semillas, etc.), los cuales suelen presentar elevados recuentos microbianos.

Tabla 2.1. Licuados vegetales que podemos encontrar en el mercado.

<p>Licuado de Soja</p>  <p>El licuado de soja es una de las bebidas vegetales más conocidas. Destaca por su alto contenido en proteínas, la presencia de vitaminas del grupo B y E y los minerales hierro y calcio. Contiene los fitoestrógenos isoflavonas.</p>	<p>Licuado de Arroz</p>  <p>Licuado vegetal caracterizado por su sabor suave y por presentar cierto dulzor (procedente en gran parte de la hidrólisis enzimática del almidón del producto). Bebida rica en hidratos de carbono y ácidos grasos poliinsaturados. Destaca su contenido en triptófano y vitaminas del grupo B.</p>
<p>Licuado de Avena</p>  <p>La avena es un cereal rico en grasas y proteínas de alto valor biológico. Su licuado se caracteriza por ser consistente, energético y nutritivo. Destaca su contenido en fibra, carbohidratos, ácidos grasos y ciertas vitaminas (grupo B y vitamina E) y los minerales sodio, potasio, calcio, fósforo, etc.</p>	<p>Licuado de Almendra</p>  <p>El licuado de almendra es un producto caracterizado por su riqueza energética y su contenido en fibras solubles, vitaminas (grupo B y vitamina E) y minerales (potasio, hierro, calcio, magnesio). Contiene una buena fuente proteica, de entre la que destaca el aminoácido esencial L-arginina.</p>
<p>Licuado de Quinoa</p>  <p>La quinoa es un grano que destaca por su contenido en proteína, grasa y carbohidratos. Su licuado, de fuerte sabor herbáceo, contiene un elevado valor nutricional. Este producto es rico en proteínas, fibra, almidón, vitaminas (A, E) y minerales (fósforo, magnesio).</p>	<p>Licuado de Chufa</p>  <p>Las chufas son tubérculos típicos de países de clima mediterráneo y tropical. El licuado de chufa es rico en carbohidratos y grasas insaturadas, y destaca por su contenido en minerales (potasio, fósforo) y vitaminas (C y E). Su consumo se relaciona con beneficios digestivos, diabéticos y cardiovasculares.</p>
<p>Licuado de Avellanas</p>  <p>Licuado de sabor y cuerpo consistente, rico en carbohidratos, grasas y minerales (magnesio, fósforo y calcio) y ácido fólico. Recomendable para diabéticos y mujeres embarazadas y lactantes.</p>	<p>Licuado de Espelta</p>  <p>Licuado con un elevado contenido en fibra, ácidos grasos insaturados y proteína. Aporta los minerales hierro, cinc y cobre, así como vitaminas del grupo B y la vitamina E.</p>
<p>Licuado de Nuez</p>  <p>Licuado rico en antioxidantes naturales, de perfil lipídico poliinsaturado y con aporte de fósforo y vitaminas (del grupo B y vitamina E). De sabor suave y agradable. Recomendable para la prevención de enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso.</p>	

Todo ello repercute en que estas bebidas acaban siendo productos susceptibles a la desestabilización físico-química y microbiológica en un corto plazo de tiempo, por lo que será necesario la aplicación de tecnologías de conservación que mejoren su vida útil, manteniendo a la vez, la calidad nutricional y sensorial del producto.

Actualmente, el sector de los licuados vegetales abre un gran campo de exploración para la industria alimentaria. Aunque el mercado de alguno de estos licuados está muy consolidado, aún quedan muchas fuentes vegetales para explotar, con propiedades nutricionales y organolépticas muy interesantes. Un claro ejemplo se encuentra en el continente africano, en el cual se cultivan más de 120 especies vegetales con potencial para la elaboración de diferentes tipos de bebidas (Van Wyk *et al.*, 2011).

2.2. La chufa y el licuado elaborado a partir de chufas

2.2.1. La chufa, ingrediente principal del licuado

2.2.1.1. La planta y su cultivo

La chufa (*Cyperus esculentus* L.) es una planta herbácea que pertenece a la familia de las Ciperáceas (subfamilia Escripoidea, género *Cyperus*, especie *esculentus*, variedad *sativus*). La planta presenta un tallo de sección triangular, liso y macizo, de unos 35-60 cm, del cual se desprenden hojas de color verde oscuro, en roseta, paralelinervias y de 40-50 cm de longitud. Su cultivo es típico en regiones de clima tropical y mediterráneo. Actualmente, este tubérculo se cultiva en regiones de Asia, África, Europa y América, siendo África uno de los principales exportadores mundiales (Horak *et al.*, 1987; Okladnikov-Yu, 1977; Ramos-Herrero, 2012). En España, el cultivo de la chufa se agrupa en la región de Valencia, concretamente centrado en la comarca de Horta de Valencia, en la que se producen cerca de los 5 millones de kg de chufa seca en las más de 1.200 Ha destinadas a su cultivo (CRCHV, 2014).

El principal interés del cultivo de la chufa se centra en la obtención de las conocidas chufas, que son pequeños tubérculos que se forman en el extremo del sistema radicular rizomático de la planta. La Figura 2.1 muestra una imagen de la planta de la chufa y de su sistema radicular. La siembra de la chufa se realiza entre los meses de abril y mayo, y los tubérculos se suelen recolectar entre 7 y 8 meses más tarde. Las exigencias

climáticas del cultivo no son tan limitantes como las edáficas, ya que se requieren suelos de características muy concretas para obtener un producto de calidad (suelos sueltos, preferentemente franco-arenosos, con buen drenaje y con abundantes materias orgánicas). Durante su ciclo vegetativo, el constante aporte hídrico también es clave para garantizar la formación de los bulbos basales y rizomas de la planta. Para la recolección de los tubérculos, se retira la parte aérea de la planta ya seca, y posteriormente, se remueve la tierra para su extracción.

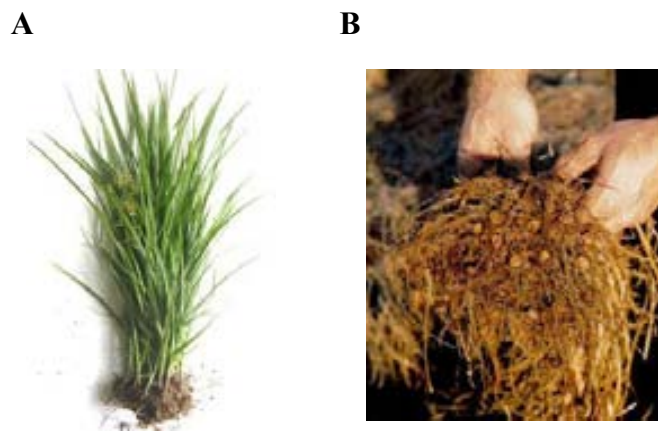


Figura 2.1. La planta de la chufa (A) y detalle de su sistema radicular con algunas chufas en sus extremos (B). Fuente: Tigernuts Traders S.L. (2014)

Las chufas se criban mediante tamices para separarlas de las impurezas más groseras del suelo (tierra, restos de la misma planta y otras impurezas del campo) y se lavan con abundante agua, con el objetivo de descartar los restos físicos que no hayan sido eliminados durante la fase de cribado. Una vez limpias, las chufas se someten a un proceso de secado, hasta que su contenido en humedad se aproxima al 10%, operación fundamental para garantizar su conservación durante su almacenaje. Después del secado, las chufas son almacenadas (en depósitos o en envases transpirables) para su expedición y venta.

2.2.1.2. Problemas asociados con la calidad de las chufas

Empresas que comercializan chufas de máxima calidad suelen realizar etapas de selección de los tubérculos previas a su venta, para separar las chufas pequeñas y dañadas del resto. Las chufas inmaduras, debido a su mayor contenido en humedad, se deshidratan más durante el proceso de secado, por lo que después de esta operación, su superficie queda más arrugada y su densidad es menor. Estas chufas pueden influir negativamente en la calidad final de la horchata, entre otros, porque el posterior lavado y desinfección de su superficie será más dificultoso, lo que afectará a la calidad microbiológica del producto final.

Al cultivo de la chufa no se le asocian grandes problemas fitosanitarios, aunque se ha descrito la presencia de algunas plagas de lepidópteros (*Bactra lanceslana* y *Mythimna unipuncta*) y pulgones (*Alphis sp.*) que podrían afectar a la calidad del tubérculo, tanto en su cosecha en campo y como durante su almacenamiento. La posible presencia del barrinador *Bactra lanceslana*, también conocido con el nombre de *palometa* debido a que en su estado de madurez las larvas se transforman en insectos voladores, es frecuente en chufas que se han envasado infestadas. Su existencia es claramente detectable, ya que sin verlas, se observan chufas ligeramente agujereadas, así como la aparición de serrín en el fondo de los envases. En algunos casos, también se ha descrito la presencia de hongos en los tubérculos, muchas veces de tipo desconocido, entre los que destacan los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Rosellini* (Lafuente *et al.*, 1985).

2.2.1.3. Características físico-químicas y nutricionales

Conocidas bajo diferentes denominaciones (*tiger nut*, *zulu nut*, *yellow nutgrass*, *ground almond*, *edible rush* o *rush nut*, etc.) las chufas constituyen la reserva energética de la planta. El botánico alemán Georg Kükenthal distinguió en sus estudios hasta ocho variedades botánicas de *Cyperus esculentos* L., aunque actualmente, solo se reconocen cuatro variedades silvestres de esta planta (*esculentus*, *leptostachyus*, *macrostachyus and hermanii*) y la variedad *sativus* (Tigernuts traders, 2014).

Existen evidencias de la amplia variabilidad de características físico-químicas y nutricionales que existen entre chufas de diferentes orígenes, por lo que hoy en día, los diferentes productores suelen clasificarlas por su composición nutricional, forma y color.

En el año 2010, mediante la *Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente de Valencia*, se aprobó el nuevo Reglamento de la *Denominación de Origen Chufa de Valencia*, así como su Consejo Regulador. El papel del Consejo es velar por una calidad óptima y homogénea de la chufa valenciana sujeta a esta denominación.



Las chufas son pequeños tubérculos de forma *redondeada* y de volumen no simétrico ligeramente comprimido por uno de sus costados. En la parte inferior del tubérculo se aprecian unas pequeñas hojas, o también llamadas catafilos, y la yema germinal del grano. La Figura 2.2 muestra una imagen detallada del tubérculo. Las dimensiones del tubérculo suelen oscilar entre los 5-13 mm de grosor y 6-16 mm de longitud, aunque se pueden encontrar ejemplares de menor y mayor tamaño (Coşkuner *et al.*, 2002; Morell *et al.*, 1983). Por ello, se considera que la forma de las chufas es *muy variable*, existiendo diferentes criterios para su clasificación. Morell *et al.* (1983) agruparon las chufas en tres grupos (alargadas, ovaladas y redondas), según la relación *longitud/diámetro* del tubérculo, y en Valencia, se suelen clasificar como chufas *llargueta* (chufa cuya longitud es mayor que su grosor) o chufas *ametlla* (chufa de forma esférica). Esta heterogeneidad de formas se refleja en la gran variabilidad de sus pesos. El peso medio del tubérculo suele ser de ~ 0,4 g sobre materia húmeda, pero este valor aumenta de manera directamente proporcional con la grosor y longitud del tubérculo, por lo que encontramos chufas de peso comprendido entre los 0,09 y 1,2 g (Morell *et al.*, 1983). El principal interés de sus dimensiones se relaciona con el proceso de hidratación del tubérculo, para la elaboración de productos derivados. Algunos autores han observado en sus estudios que la capacidad de hidratación de los tubérculos es inversamente proporcional a su tamaño, por lo que la velocidad de hidratación del tubérculo será mayor en chufas pequeñas, optimizando el tiempo total de la operación (Ejoh *et al.*, 2006).

Como se observa en la Figura 2.2, la piel de la chufa es rugosa y está provista de repliegues que circundan el tubérculo. Debido a estas rugosidades, materias extrañas y microorganismos se retienen fácilmente en toda su superficie, por lo que después de su recolección, el tubérculo deviene un producto con elevados índices de contaminación. Los colores externos de su piel varían entre el amarillo y el marrón (Adejuyitan, 2011;

Coşkuner *et al.*, 2002). A parte, su color tiende a oscurecer en función de diferentes factores, como el período de recolección, las características del suelo de cultivo o el mismo período de tiempo en el que permanecen almacenadas. Por el contrario, la pulpa del tubérculo posee una coloración amarilla más clara, la cual se vuelve de color blanco lechoso después de su rehidratación (Morell *et al.*, 1983).

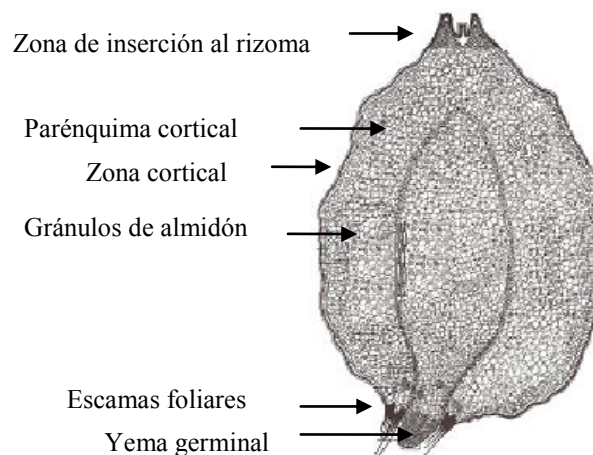


Figura 2.2. Esquema del tubérculo de la chufa. Fuente: Morell *et al.* (1983).

En el mercado, encontramos ligeras diferencias entre la composición de las diferentes chufas. Cabe tener en cuenta que su composición depende de diferentes factores, como son la zona de cultivo, la variedad, el período de recolección o el tiempo de almacenaje del tubérculo (Coşkuner *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 1984, Ejoh *et al.*, 2006, Temple *et al.*, 1990). En general, se puede considerar la chufa un tubérculo rico en carbohidratos ($\geq 50\%$) y grasas ($\sim 26\%$), que aproximadamente cuenta con unas 400 kcal/100 g producto (Oladele *et al.*, 2007). La Figura 2.3 muestra una gráfica representativa de la composición estandarizada para este tubérculo.

Los carbohidratos constituyen la fracción mayoritaria del tubérculo, caracterizados por el almidón ($\sim 34,3\%$). Su estado de gelatinización se alcanza a partir de los 74 °C y, a diferencia de otros almidones, tiende a retrogradarse durante el enfriamiento, hecho que influye notablemente sobre las características de los subproductos elaborados con aplicación de tratamientos térmicos. La sacarosa es el carbohidrato que le sigue en importancia ($\sim 16\%$), y con una concentración inferior al 0,5%, se encuentran trazas de

fructosa, galactosa y glucosa. La chufa es también una buena fuente de fibra (~ 10-20%), siendo su contenido en fibra dietética mayoritariamente del tipo insoluble (Karababa *et al.*, 2001; Sánchez-Zapata *et al.*, 2012).

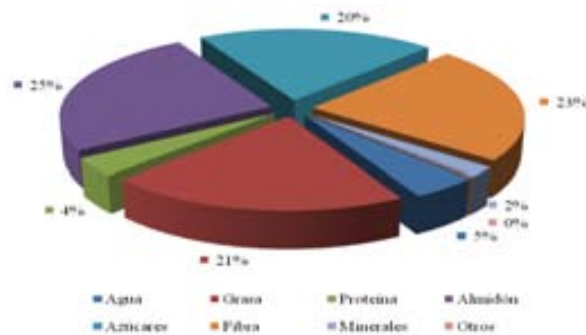


Figura 2.3. Composición nutricional estándar de la chufa (%). Fuente: Tígernuts Traders (2014).

La cantidad de grasas en el tubérculo también es alta (~ 20-30%). El aceite de chufa se caracteriza por una fracción mayoritaria saponificable (~ 98-99%) de la cual los triglicéridos son los componentes más destacados, y por un ~ 2% restante correspondiente a una fracción minoritaria insaponificable (~ 2%), la cual contiene pigmentos, compuestos volátiles y polifenoles, entre otros (Kim *et al.*, 2007; Linssen *et al.*, 1988; López-Cortés *et al.*, 2013). En la fracción mayoritaria, a parte de los triglicéridos, también encontramos diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres, estos últimos caracterizados por su elevada reactividad y vulnerabilidad a transformaciones oxidativas. En sus estudios, diferentes autores han descrito que los ácidos grasos monoinsaturados ($\geq 60\%$) están representados principalmente por el ácido graso oleico ($C_{18:1}$) (51,81-75,43%), seguidos por los ácidos grasos saturados (19,01-25,20%), de entre los que destaca el ácido graso palmítico ($C_{16:0}$), con el 15,15-20,38%, y finalmente, el grupo de ácidos grasos poliinsaturados (8,39-11,02%), caracterizados por el ácido graso linoleico ($C_{18:2}$), con el 8,22-10,91% (López-Cortés *et al.*, 2013; Sánchez-Zapata *et al.*, 2012). También destaca en su composición la presencia de fitoesteroles, principalmente β -sitosterol (517,25 μ g/g aceite) (Yeboah *et al.*, 2012). No es de extrañar, pues, que diferentes autores matizasen la similitud entre el perfil graso del aceite de chufa y el de oliva, así como la ventaja de su consumo respecto a los

aceites de soja y girasol (Coşkuner *et al.*, 2002; Karababa *et al.*, 2001; Linssen *et al.*, 1988; Morell *et al.*, 1983; Owusu *et al.*, 2012; Tigernuts Traders S.L., 2014;).

Al contrario de lo observado en los hidratos de carbono y grasas, el aporte proteico de la chufa es bajo. De media, se estima que este corresponde a un 4%, aunque diferentes autores han descrito contenidos de proteína comprendidos entre el 3,1 y 10% en chufas de diferente origen. Un 60% de la proteína bruta de la chufa corresponde a proteína verdadera, de la cual aproximadamente un 85% es digerible. El valor biológico de esta proteína también es bajo. El aminoácido más abundante de la chufa es la arginina (~ 2-2,5%), mientras que los aminoácidos valina, isoleucina, tirosina e histidina se presentan como minoritarios (< 0,4%) (Bosch *et al.* 2005; Karababa *et al.*, 2001; Morell *et al.*, 1983; Navarro *et al.*, 1984; Temple *et al.*, 1990).

En cuanto a su contenido en minerales, destacan los macroelementos potasio y fósforo (567 y 274 mg/100 g, respectivamente), seguidos de otros que se encuentran en cantidades muy inferiores (0,09% de calcio, 0,09% de magnesio y 0,04% de sodio). Los contenidos de los microelementos hierro y zinc corresponden al 3,9 y 3,5 - 4,58 mg/100 g, respectivamente (Morell *et al.*, 1983; Valls *et al.*, 1980).

A parte, en la chufa también encontramos compuestos de origen enzimático (catalasa, peroxidasa o sacarasa) y en pequeñas cantidades, factores antinutricionales como taninos, inhibidores trópicos o fitatos (Addy *et al.*, 1984; Adekanmi *et al.*, 2009; Chukwuma *et al.*, 2010; Karababa *et al.*, 2001; Linssen *et al.*, 1988; Okafor *et al.*, 2003).


Matizar que, desde la antigüedad, se han descrito múltiples efectos beneficiosos para la salud relacionados con el consumo de chufas. Destaca su capacidad antioxidante, sus efectos positivos frente al colesterol LDL, así como sus beneficios para el mantenimiento de una buena salud cardiovascular y digestiva. Su bajo contenido en sacarosa lo hace un producto apto para diabéticos, y su porcentaje en carbohidratos se presenta como *ideal* para la dieta de niños, ancianos y deportistas (CRCHV, 2014).

2.2.1.4. *El consumo de la chufa. Usos y aplicaciones a nivel mundial*

Se conoce que el consumo de la chufa se inició hace más 4000 años. Hoy en día, el tubérculo es de gran interés tanto para la alimentación animal como para la elaboración de productos alimenticios destinados al consumo humano, sobre todo en países con

problemas de malnutrición donde la chufa es una de las principales fuentes de alimentación. Son múltiples las aplicaciones que se le ha dado a este tubérculo, según sea el país en el que se procese. En alimentación animal (principalmente en África y EEUU), existen estudios que concluyen con los beneficios de incluir la chufa en la dieta de rumiantes, debido a su aporte energético y composición nutricional, así como también destacan el exitoso uso de la chufa como *anzuelo* para la pesca (Belewu *et al.*, 2007). La Tabla 2.2 muestra algunas de las formas bajo las que se consumen las chufas y sus derivados en diferentes países del mundo.

Tabla 2.2. Aplicaciones de la chufa a nivel mundial.

<p>Grano entero <u>Consumo directo:</u> hidratados, pelados, en surtidos de frutos secos, recubiertos de chocolate, caramelo, azúcar u otros (Tigernuts Traders, 2014; Linssen et al., 1988).</p> <p><u>Bebidas de chufa:</u> <i>Kunun aya</i> (licuado de chufa de origen africano), <i>horchata de chufa</i> (bebida de origen valenciano no alcohólica en base a chufas, agua y azúcar), bebidas en base a chufa y otras semillas (Addy et al., 1984), licuado de chufas y zumo de frutas (Nadir et al., 2004), bebidas alcohólicas fermentadas (Barminas <i>et al.</i>, 2001).</p> <p><u>Productos tipo postre:</u> Fermentado a partir de licuado de chufa (Akoma <i>et al.</i>, 2000).</p>	
<p>Harina de chufa Aplicaciones en pastas, panes, tartas, bizcochos, magdalenas y galletas, actualmente comercializadas por varias empresas (Tigernuts Traders S.L., 2014). Utilización de su almidón en procesos industriales (Umerie <i>et al.</i>, 1997).</p>	
<p>Aceite de chufa Comercialización para su consumo en frío (como aliño) o aceite para freír. Posible uso para embellecer la piel, rostro y cabellos (Omode <i>et al.</i>, 1995; Oderinde <i>et al.</i>, 1992; Tigernuts Traders S.L., 2014).</p>	
<p>Fibra de la chufa Elaboración de productos cárnicos variados (hamburguesas, productos crudos-curados y pastas finas), a partir de los residuos sólidos obtenidos del proceso de elaboración de horchata de chufa (Sánchez <i>et al.</i>, 2013, 2010).</p>	
<p>Otros Tubérculos tostados como sustitutos de granos de café, para la elaboración de cremas para untar o bien como aromatizantes para helados o productos de bollería. Utilización en la fabricación de dulces y productos de cosmética (Umerie <i>et al.</i>, 1997; Tigernuts Traders S.L., 2014).</p>	

2.2.2. El licuado de chufas

Hace más de 4.000 años, la chufa se cultivaba en la región de “*Chuf*”, entre Sudán y Egipto. Con este tubérculo se elaboraba licuado de chufas, el cual se utilizaba con fines nutritivos y medicinales, ya que existen documentos históricos que hablan de las propiedades y usos medicinales de este producto (Tigernuts Traders S.L., 2014). Fue en el siglo VIII cuando los árabes introdujeron la chufa a la región de Valencia, surgiendo posteriormente la conocida *horchata de chufa*, bebida vegetal no alcohólica obtenida a partir de chufas, agua y azúcar, la cual hoy en día se comercializa y consume a nivel mundial (Figura 2.4).

Todo ello hace que, desde la antigüedad, las chufas y el licuado de chufas hayan formado parte de la alimentación y tradición de muchos pueblos del Mediterráneo. En África, por ejemplo, se produce una bebida no alcohólica elaborada en base a chufas y agua, conocida bajo el nombre de *kunun aya*. Esta bebida destaca por su perfil nutritivo y por sus características organolépticas mejoradas respecto a otros licuados que se elaboran y consumen a partir de semillas africanas (Belewu *et al*, 2007). Entre otros, el bajo contenido en proteína del licuado hace que, en algunas ocasiones, algunos autores se plantearan enriquecer este producto con otras fuentes vegetales más ricas en este componente. Addy *et al*. (1984) elaboraron un licuado en base a chufas y semillas de baobab y Nadir *et al*. (2004) apuntaron la posibilidad de fortificar nutricionalmente el licuado de chufas mediante su mezcla con zumos naturales de diferentes frutas.

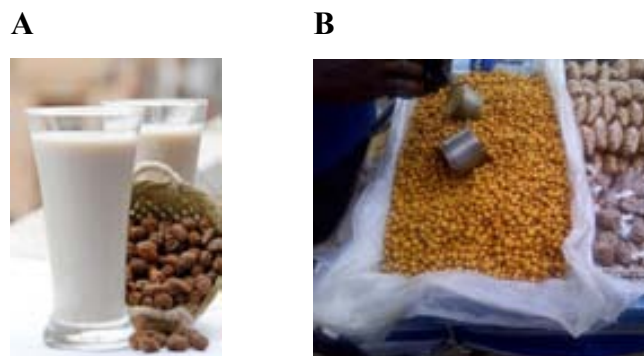


Figura 2.4. (A) Horchata de chufa valenciana y (B) chufas en un mercado africano. Fuente: CRCHV (2014) y <http://silverbirdtv.com>.

2.2.2.1. *La horchata de chufa, producto típico de Valencia*

Una leyenda valenciana cuenta que, en la época de la Reconquista, una aldeana ofreció al rey Jaime I, rey de la Corona de Aragón, un poco de *horchata de chufa*. El rey, sorprendido por su sabor, preguntó qué era esa bebida, a lo que la joven le respondió que era leche de chufa. Complacido, el rey le contestó: “Això no és llet, això és or, xata!” (*esto no es leche, esto es oro, chata*), lo que le atribuyó la denominación de *horchata* a la bebida elaborada en base a chufas.

Las primeras referencias del consumo en España de una bebida refrescante denominada *leche de chufas* son del siglo XIII. La primera documentación del vocablo *horchata* data del 1732, empezándose a difundir la palabra equivalente en catalán (*orxata*) a finales del S.XVIII. De hecho, este tubérculo fue introducido a España por los árabes en el S.VIII, por lo que probablemente se consumiera mucho antes. En Valencia, las condiciones de clima y edafología eran óptimas para su producción y calidad, por lo que desde sus inicios, el cultivo de la chufa se asentó en esta región. Se cree que la popularidad del licuado de chufas se justificó con la prohibición del consumo de vino por la religión mahometana, la cual impulsó la aparición de nuevas bebidas no alcohólicas y refrescos. En un documento de 1824, descubierto recientemente, se prescriben también posibles fines curativos asociados a esta bebida (CRCHV, 2014). Existen indicios de que la *horchata de chufa* se empezó a comercializar a principios del S.XVIII, ya que algunos documentos detallan que, en estas fechas, horchata procedente de tierras valencianas se vendía en Madrid y en otras provincias de España (Cavanilles, 1795-1797).

Con la palabra *horchata* se denominan los extractos, emulsiones o líquidos de aspecto lechoso obtenidos a partir de semillas y tubérculos por su disgregación y dispersión en agua (Lafuente *et al.*, 1985). Existen diferentes tipos de horchatas (de arroz, cebada, almendras, etc.), pero en España, el consumidor suele asociar la palabra *horchata* con la bebida elaborada en base a chufas, agua y azúcar. Según el Real Decreto 1338/1988 (España, 1988), por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de horchata de chufa (y sus modificaciones), la *horchata de chufa* es el producto nutritivo de aspecto lechoso, obtenido mecánicamente a partir de los tubérculos *Cyperus Sculentus* L., sanos, maduros, seleccionados y limpios, rehidratados, molturados y extraídos con agua potable, con o sin adición de azúcar,

azúcares o sus mezclas. El producto debe presentar un color, aroma y sabor típicos de los tubérculos de los que procede, así como una composición nutricional determinada. En la Comunidad Valenciana, la chufa de Valencia y su horchata son ampliamente conocidas por el valor cultural y tradicional que representan en el territorio. La introducción de las chufas y sus derivados en la alimentación establecieron unas costumbres que se han transmitido entre generaciones, constituyendo la cultura de un pueblo (CRCHV, 2014). En sus inicios, la horchata de chufa se fabricaba a nivel artesanal, para el consumo familiar. Con el tiempo, y debido a las posibilidades de explotación de este producto para la venta a terceros, empezaron a aparecer pequeñas horchaterías artesanales, lo que desencadenó la aparición de las industrias horchateras actuales. Sobre los años cincuenta, la horchata empezó a venderse exitosamente como bebida refrescante en puestos expendedores (bares, cafeterías, etc.), siendo actualmente extraño no encontrar esta bebida en este tipo de establecimientos, sobre todo en verano. La horchata es hoy en día un producto con un mercado muy consolidado, ampliamente extendido a nivel mundial (Tigernuts Traders S.L., 2014). Aunque se han descrito algunas de las diferentes formas en que las chufas se consumen en los diferentes países del mundo (ver Tabla 2.1), hoy en día, la elaboración de horchata de chufa es una de las más destacadas.

Aunque el proceso de elaboración de horchata de chufa se ha industrializado, las grandes horchateras siguen empleando procedimientos basados en el sistema *tradicional* de elaboración (Gallart, 1999; Morell *et al.*, 1983). Factores como la zona geográfica en la que se elabora la horchata y/o los conocimientos que el *maestro horchatero* ha heredado de sus antepasados pueden influenciar en la metodología de elaboración de la horchata, por lo que se suelen encontrar ligeras diferencias en el proceso productivo entre obradores. El proceso de elaboración de la horchata comprende las etapas de preparación de los tubérculos (limpieza, desinfección e hidratación), molturación de las chufas con la proporción de agua deseada, maceración del producto molturado, y posteriormente, prensado y tamizado de la mezcla para la posterior obtención del extracto acuoso. La cantidad de azúcar añadida al final del proceso caracterizará el cuerpo y dulzor del producto final.

Cabe destacar que, actualmente, muchos horchateros utilizan chufa procedente de África para la elaboración de sus licuados. En 2011, la asociación Valenciana de Agricultores (AVA-ASAJA) informó que las compras de chufa de las regiones de Níger, Burkina Faso y Malí se habían duplicado, llegando a las 3.374 toneladas durante

los años 2004-2007. Aunque los rendimientos de esta chufa y su calidad nutricional y sanitaria suelen ser inferiores a los de la chufa valenciana, la razón de su compra está en su precio, en general, mucho más económico.

2.2.2.2. Etapas del proceso de elaboración

La Tabla 2.3 muestra las etapas del proceso de elaboración de horchata de chufa, según el método tradicional.

Tabla 2.3. Etapas del proceso de elaboración de la horchata de chufa, según el método tradicional.

Etapa		Descripción
1	Lavado	<p><i>Etapa esencial para la eliminación de los altos niveles de impurezas con los que llegan las chufas del campo.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Las chufas se depositan en recipientes de lavado y se enjuagan con abundante agua potable, en constante agitación. • Se suelen realizar varios lavados, con diferentes cambios de agua.
2	Eliminación tubérculos defectuosos	<p><i>Esta etapa es clave para la separación de los tubérculos sanos de los defectuosos, probablemente dañados por insectos o microorganismos.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El procedimiento habitual (aunque no el único) es la flotación. • Se utiliza una solución de salmuera (15-17 ° Baumé) en la que los tubérculos de menor densidad (dañados) flotan y se separan del resto. • Los restos de salmuera son eliminados mediante el lavado de las chufas con abundante agua.
3	Hidratación	<p><i>Etapa fundamental para que los tubérculos adquieran la turgencia adecuada, facilitando su desinfección, trituración y extracción de nutrientes.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Las chufas se sumergen en agua potable durante un tiempo pre-establecido, hasta el nivel de turgencia adecuado. • Con la hidratación, los repliegues de la piel de la chufa desaparecen, por lo que la posterior etapa de desinfección tendrá más efectividad. • Los tiempos de esta etapa dependen del tipo de agua que se utilice, de su temperatura, así como de las características de la misma chufa.
4	Desinfección	<p><i>Operación fundamental para reducir los elevados recuentos microbianos de la superficie de los tubérculos.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Las chufas se sumergen en una solución de agua y cloro activo (1%), en agitación mecánica, durante un tiempo aproximado de 30 min. • Los posibles restos de desinfectante adheridos en la piel de las chufas son eliminados lavando los tubérculos con abundante agua.

Tabla 2.3. Etapas del proceso de elaboración de la horchata de chufa, según el método tradicional. (Continuación)

Etapa		Descripción
5	Pelado	<p><i>Práctica habitual para eliminar posibles restos de fibras de la piel del tubérculo que puedan aparecer como sedimento en la bebida final.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Esta operación se realiza en tambores rotatorios de superficie rascada. • Los tiempos de esta operación son cortos.
6	Molturación	<p><i>Etapas en la que las chufas son trituradas junto con agua, para la extracción de componentes del grano y obtención del licuado vegetal.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • La molturación de los tubérculos se realiza en un molino de martillos. • Se añade la proporción de agua deseada para evitar que el producto molturado se apelmace dentro del molino.
7	Prensado y tamizado	<p><i>Etapas fundamentales para favorecer la extracción de nutrientes, así como obtener el producto final mediante la separación de la parte sólida y líquida procedente de la molturación de los tubérculos con agua. Estas etapas pueden realizarse de dos formas diferentes:</i></p> <p><i>A. Continuo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Después de la molturación, el producto resultante se macera dentro de un tambor rotatorio vertical, provisto de una malla interior, en constante agitación. Esta etapa suele ser corta (~ 20 min) y permite una mayor extracción de los sólidos de la torta. Suelen realizarse diferentes lavados (con agua de nueva incorporación) del residuo sólido. • Después del tiempo de maceración, la parte líquida se separa de la torta mediante su paso a través de la malla o tamiz. <p><i>B. Discontinuo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El producto molturado se deposita directamente en una prensa continua (o tornillo sin-fin), en la cual el tránsito del producto será forzado y permitirá, al mismo tiempo, la separación del líquido mediante el filtro que recubre dicho tornillo.
8	Filtrado	<p><i>En función de la opción escogida anteriormente (A o B), puede ser necesario filtrar el producto de nuevo.</i></p>
9	Adición de azúcar	<p><i>La horchata de chufa, entre otros, se caracteriza por su sabor dulce, debido principalmente a la cantidad de azúcar que se le añade.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Al extracto final se le añade una cantidad de azúcar (sacarosa) determinada, normalmente comprendida entre un 10 y 15%.
10	Envasado y Refrigeración	<p><i>Después de su elaboración, el rápido envasado del producto y su conservación en frío serán esenciales para garantizar la calidad higiénica del producto durante su venta y consumo.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El producto se envasa y enfría lo más rápido posible, entre 0 y 2 °C.

Según el RD 1338/1988 (y sus modificaciones) (España, 1988), la *horchata de chufa natural* es aquella elaborada tan solo con chufas, agua y azúcar, con un 12% mínimo de sólidos solubles (expresados como °Brix a 20 °C), y unos contenidos mínimos en almidón y grasa del 1,9 y 2%, respectivamente. Su pH mínimo será de 6,3, y los azúcares totales expresados como sacarosa serán, como mínimo, del 10%. El licuado bajo esta denominación en ningún caso podrá contener aditivos y/o coadyugantes tecnológicos, aunque sí podría elaborarse sin la adición de azúcar.

2.2.2.3. *Subproductos del proceso de elaboración*

Los residuos generados en el proceso de elaboración de *horchata de chufa* representan aproximadamente el 60% de la materia original. A parte del impacto medioambiental, esta gran cantidad de residuos suponen un gran problema económico para la empresa horchatera, por lo que recientemente un grupo de la universidad de Miguel Hernández de Elche han realizado un exhaustivo estudio para su valorización (Sánchez *et al.*, 2013, 2010). Estos autores han propuesto el desarrollo de diferentes productos en base a los desechos sólidos del proceso de elaboración de horchata de chufa, una excelente fuente de fibra dietética, destacando entre ellos diferentes productos cárnicos frescos, crudos y curados y pastas finas. En sus estudios, también realizaron desarrollos con la fracción líquida obtenida durante el prensado de los desechos sólidos, añadiéndola en derivados cárnicos y observando una mejora sensorial y de las características físico-químicas de los productos elaborados.

2.2.2.4. *Características físico-químicas, organolépticas y nutricionales*

La *horchata de chufa* es un producto que en España constituye uno de los *refrescos* por excelencia. A diferencia de otras bebidas refrescantes, la horchata de chufa es un producto nutritivo, la composición nutricional del cual dependerá, entre otros, de la composición nutricional de la chufa, la proporción *chufa:agua* que se utilice y de la adición de los posibles aditivos y/o coadyuvantes tecnológicos permitidos por legislación (España, 1988).

El componente mayoritario de la horchata es el agua ($\geq 85-90\%$). Normalmente, los sólidos totales suelen representar un 12% en peso del producto, y se caracterizan por los

hidratos de carbono y las grasas. El almidón es el carbohidrato mayoritario ~ 50%, seguido por la sacarosa (40-45%). El contenido en grasa suele ser del orden del ~ 2-3%, siendo su perfil mayoritario insaturado. Por el contrario, el contenido en proteínas de este producto suele ser bajo ($\leq 1\%$). La horchata también se caracteriza por su riqueza en los minerales fósforo, magnesio, potasio, calcio y hierro, así como por la presencia, en menores cantidades, de enzimas (fosfatasa, peroxidasa, catalasa, etc.) y algunas vitaminas (B1 y ácido ascórbico) (Bixquert, M., 2006; Morell *et al.*, 1983; CRCHV, 2014; Tigernuts traders, S.L., 2014; Varo-Galvan *et al.*, 1998).

Probablemente por todo ello, a este licuado se le han atribuido propiedades beneficiosas para el organismo, relacionadas con aspectos nutritivos, digestivos y cardiovasculares, entre otros (CRCHV, 2014).

2.2.2.5. *Los procesos de conservación*

La horchata de chufa es un producto altamente perecedero. La elevada contaminación microbiológica del tubérculo, los enzimas endógenos del producto, así como su composición nutricional y pH elevado hacen que la higienización del licuado sea fundamental para optimizar su vida útil en el tiempo. Anteriormente, la falta de buenas prácticas de manipulación durante su elaboración y la no estandarización de las condiciones de aceptación de la materia prima (o chufas) repercutían en una mala calidad higiénica de las horchatas elaboradas artesanalmente. Diferentes estudios realizados entre los años 1993 y 2000 en horchatas elaboradas en la Comunidad de Valencia pusieron de manifiesto la necesidad de establecer unas buenas prácticas de manipulación durante la elaboración y venta de este producto, ya que la mitad de las horchatas que se analizaron no cumplían con los límites microbiológicos máximos permitidos por la legislación (Monerris *et al.*, 2001; Pla *et al.*, 1999; Virseda *et al.*, 1997). Las campañas realizadas para mejorar tales hábitos higiénicos fueron muy exitosas, demostrándose más adelante haberse reducido considerablemente el total de muestras que en un inicio no cumplían con la normativa (Arranz *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 1993).

Según Morell *et al.* (1983), a temperatura ambiente (~ 22 °C), la alteración de la horchata puede darse en menos de 12 h de almacenamiento del producto, debido principalmente a su deterioro por efecto microbiano. Con el crecimiento de la

microbiota del producto, se observa una disminución rápida de su pH, debido a la acción de las bacterias productoras de ácido, con la consiguiente formación de gas. Este fenómeno se acompaña de una apreciable desestabilización física del licuado, en la que se observa la sedimentación de diferentes componentes del producto y la aparición de una fase de aspecto lechoso y turbio en la parte superior, acompañada de grumos y mucílagos amarillentos en suspensión.

Entre los principales microorganismos alterantes de la horchata de chufa destaca la microbiota de origen fecal y esporulada, procedente del terreno de cultivo del tubérculo. Estos microorganismos suelen contribuir notablemente en el proceso de alteración del producto, principalmente por su alta resistencia a los tratamientos de desinfección. Principalmente, hablamos de bacilos aerobios (*Bacillus brevis* y *B. subtilis*) lo cuales son los causantes de la aparición de estos mucílagos en la horchata. Destacan también los microorganismos *Enterobacter aerogenes* (altamente alterante debido a su capacidad fermentativa), *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis*. Con menor frecuencia, y en casos puntuales, se ha detectado también en horchatas *Salmonella*, *Micrococcus*, *Lactobacillus brevis* y *L. fermentum*, algunas *Pseudomonas*, levaduras (*Brettanomyces*, *Torula* y *Saccharomyces*) y mohos (*Aspergillus glaucus*), así como también se han detectado los bacilos anaerobios *Clostridium butyricum* y *Cl. perfringens* (Lafuente *et al.*, 1985).

Por todo ello, y para optimizar la vida útil de este producto, se han aplicado diferentes tipos de tratamientos de higienización en horchata de chufa, los cuales se muestran en la Tabla 2.4. Cabe destacar que el almidón es uno de los componentes mayoritarios del producto, cuya temperatura de gelatinización es ~ 70 °C, por lo que previamente a la aplicación de tratamientos en que el producto supere dicha temperatura, el almidón deberá eliminarse por centrifugación o hidrólisis enzimática. A parte, debido a los fenómenos de desestabilización coloidal existentes en el licuado durante su vida útil, en sistemas continuos de higienización, el producto suele someterse a una operación de homogenización, así como también se le suelen añadir aditivos estabilizantes y aromas (a vainilla, canela o limón). Cabe tener en cuenta que el proceso de conservación que se aplique también modificará las características de la bebida, por lo que la utilización de tecnologías que conserven la calidad nutricional y organoléptica del producto *fresco*, mejorando su vida útil, constituye uno de los principales intereses del sector horchatero actual.

Tabla 2.4. Tratamientos de conservación aplicados a la horchata de chufa para mejorar su calidad microbiológica.

Sistema de Conservación	Características del proceso		Características del producto final
Frío	<i>Sistema tradicional de conservación de esta bebida, sinérgico con otros tratamientos de conservación.</i>		
	Refrigeración	<ul style="list-style-type: none"> • Conservación del producto a temperaturas de 0-2 °C. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vida útil del producto crudo de 2-3 días (en función de la carga microbiana inicial). • Conservación máxima de sus características sensoriales.
	Congelación	<ul style="list-style-type: none"> • Conservación del producto a temperaturas de ≤ -18 °C. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vida útil del producto > 1 semana (granizada) o varios meses (congelada).
Calor	<i>Con los tratamientos térmicos de higienización, la vida útil de la horchata incrementa notablemente. Según la temperatura aplicada al producto, será necesaria la adición de enzimas amilolíticas para evitar la gelatinización del almidón con el tratamiento térmico.</i>		
	Pasterización	<ul style="list-style-type: none"> • Discontinua, LTST (en batch), p.e. 63-65 °C / 30 min. • Continua, HTST (intercambiadores térmicos), p.e. 72-74°C / 15 s. Homogenización doble etapa a 18 + 2 MPa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vida útil del producto ≤ 1 mes. Conservación del producto en frío. • Afectación organoléptica del producto. • Posibilidad utilización aditivos y/o coadyuvantes tecnológicos.
	Esterilización	<ul style="list-style-type: none"> • Discontinua: en <i>batch</i> (autoclave), p.e. 120 °C/20 min. No suele realizarse debido a la afectación organoléptica del producto, a excepción de la horchata condensada. • Continua - UHT: p.e. 130-142 °C/2- 4 seg. Homogenización doble etapa a 18 + 2 MPa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Vida útil del producto > 6 meses. Conservación del producto a T^a ambiente. • Gran afectación organoléptica del producto. • Posibilidad utilización aditivos y/o coadyuvantes tecnológicos.
Reducción de la actividad de agua	<i>Aumento de la concentración de sólidos disueltos en la horchata. Limitación del crecimiento microbiano en el producto por la disminución de su actividad de agua.</i>		
	Condensación	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración del producto por adición de azúcares (sacarosa). • Producto con ≥ 60 ° Brix (a 20 °C) y pH mínimo de 6. • Posible aplicación de tratamiento térmico de calor para incrementar la vida útil del producto condensado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reconstitución del producto en agua previo a su consumo. Las características sensoriales del producto disuelto difieren de la horchata <i>natural</i>. • Sin tratamiento térmico de calor, vida útil de ~ 1 mes a T^a de refrigeración.

Tabla 2.4. Tratamientos de conservación aplicados a la horchata de chufa para mejorar su calidad microbiológica. (Continuación)

Sistema de Conservación		Características del proceso	Características del producto final
Reducción de la actividad de agua	Incremento de la proporción de chufa	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración del producto con una baja proporción de agua. Mínima concentración de sólidos solubles disueltos del 42%, expresados como ° Brix (a 20 °C). pH mínimo de 6. • Posible aplicación de tratamiento térmico de calor para incrementar la vida útil del producto condensado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reconstitución del producto en agua previo a su consumo. Las características sensoriales del producto final son ligeramente modificadas. • Conservación en refrigeración o congelación. Con posible conservación a temperatura ambiente si el producto se ha sometido a un tratamiento térmico de higienización.
	Deshidratación	<ul style="list-style-type: none"> • Concentración del producto por eliminación de agua (liofilización o atomización). • Actividad de agua de producto final de ~ 0,65-0,70. 	<ul style="list-style-type: none"> • Producto final de calidad. El producto no sufre reacciones químicas de deterioro asociadas a los procesos de secado del producto. Reducción de de la actividad microbiológica y enzimática del producto. • Producto a reconstituir en agua previo a su consumo. La viscosidad del producto reconstituido sin afectación.
<i>Higienización del producto por la rotura de la membrana celular de las células vegetativas y migración del material celular</i>			
Pulsos eléctricos (PEF)	<ul style="list-style-type: none"> • Tecnología emergente para la inactivación microbiana, permitiendo trabajar a temperaturas bajas. • Aplicación de pulsos eléctricos de intensidad comprendida entre los 20-35 kV/cm, durante 100 - 475 μs. 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor alteración organoléptica del producto en comparación al tratado mediante tecnologías térmicas convencionales. • Este tratamiento no causa la oxidación del producto. Parcial inactivación de la peroxidasa. • Vida útil de hasta ~ 5 días, manteniendo el producto en refrigeración (2-5 °C). 	
<i>Efecto germicida causado por la penetración de las radiaciones ultravioletas en el producto</i>			
Radiaciones Ultravioletas	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicación de tratamientos de UV de, p.e., 0,14-4,23 J/cm². 	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de un producto higienizado con características sensoriales similares al producto fresco. • Principales cambios químicos relacionados con una menor capacidad antioxidante en el producto al incrementar la dosis de UV. Reducción de la actividad enzimática (peroxidasa). • Vida útil del producto fresco extendida hasta 4 días más (conservado en refrigeración). 	

Fuente: Corrales, et al. (2012), Cortés et al. (2005), Lafuente et al. (1985), Morell et al. (1983), Schwartz et al. (1986).

2.3. La homogenización a ultra alta presión (UHPH)

2.3.1. Antecedentes

Actualmente, la industria alimentaria persigue la aplicación de tecnologías que permitan la higienización de los productos alimentarios preservando al máximo las características del producto fresco. El consumidor exige productos de características nutricionales y organolépticas lo más parecidas posibles a sus equivalentes *sin tratar*, por lo para la industria, aquellas tecnologías que permitan cumplir con esta finalidad, proporcionando a la vez una buena calidad higiénica de los alimentos procesados, son fundamentales. Los pulsos eléctricos, los pulsos electromagnéticos, la alta presión hidrostática, la irradiación o los ultrasonidos, entre otros, son tecnologías que han permitido obtener alimentos higienizados de vida útil mejorada, ajustándose a esta tendencia creciente de mercado (Cortés, 2007; Datta *et al.*, 2005).

En la última década, la *homogenización a alta presión* se ha presentado como una tecnología de procesado en continuo para la higienización de alimentos líquidos, cuyos estudios de investigación han estado financiados en gran parte por la Unión Europea a través de diferentes proyectos del séptimo programa marco.

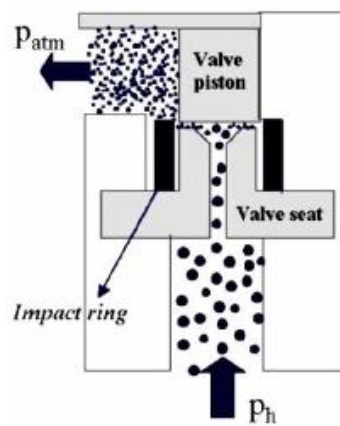
2.3.2. Definición de la tecnología

La *homogenización* es aquel proceso mediante el cual el tamaño de las partículas suspendidas en un líquido es reducido de manera homogénea debido a su paso forzado, a alta presión, a través de una válvula diseñada para tal finalidad (Donsì *et al.*, 2009).

Gracias a esta reducción homogénea del tamaño de partícula, entre otros, se consigue estabilizar las dispersiones coloidales. En el año 1900, Auguste Gaulin desarrolló la primera válvula de homogenización, mediante la cual surgió una alternativa tecnológica para la estabilización de emulsiones alimentarias. Desde ese momento, la homogenización se ha aplicado ampliamente en las industrias química, farmacéutica y alimentaria para la estabilización de emulsiones y la obtención de productos con nuevas propiedades reológicas (Floury *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2003a,b; Paquin, 1999; Popper *et al.*, 1990; Thiebaud *et al.*, 2003).

El homogenizador diseñado por Gaulin, conocido actualmente como *homogenizador convencional*, consta de una bomba de desplazamiento positivo, conectada a un

intensificador de presión, mediante la cual el fluido a procesar es bombeado hacia la válvula de homogenización. Como se observa en la Figura 2.5, el fluido es alimentado axialmente hacia el asiento de la válvula, acelerándose radialmente al entrar en el espacio comprendido entre el asiento y el cabezal de la misma (de 10-30 μm). Después de atravesar dicho espacio, el producto impacta con el anillo de la válvula y se expande debido al cambio brusco de presión al cual es sometido a la salida de la válvula (Kleinig *et al.*, 1998). Entre otros, la disrupción de las partículas del producto se produce debido a las fuerzas mecánicas combinadas que tienen lugar durante todo este recorrido.



Presiones máximas alcanzables: 70-100 MPa

Figura 2.5. Esquema de la válvula de Gaulin.

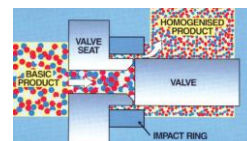
En la industria alimentaria, los homogeneizadores convencionales que se utilizan suelen trabajar a presiones comprendidas entre los 20-50 MPa, bajo la finalidad de incrementar la estabilidad de las emulsiones evitando los fenómenos de desestabilización física de clarificación y cremado, principalmente (Paquin, 1999; Thiebaud *et al.*, 2003). La industria láctea es una de las que con más frecuencia ha utilizado esta tecnología para la estabilización de los glóbulos grasos en la leche (Wilbey, 2002). Estos homogeneizadores pueden estar equipados con dos válvulas conectadas en serie; una primera válvula de homogenización que trabaja a mayor presión (conocida también como *primera etapa*), y una segunda válvula (o *segunda etapa*) que trabaja a presiones de homogenización inferiores (normalmente al ~ 10 -20% de la presión de la primera válvula). Los efectos combinados de estas dos válvulas permiten la obtención de emulsiones mucho más estables físicamente, con menor cantidad de agregados de partículas en suspensión (Walstra *et al.*, 2006).

La *Homogenización a alta presión* (HPH) es aquella tecnología cuyo fundamento coincide con el proceso de homogenización convencional, pero que gracias al diseño de sus equipos (diseño de la válvula de homogeneización y de los materiales de los que está formada), permite trabajar a presiones 10-15 veces superiores (Donsì *et al.*, 2009). Esta tecnología se introdujo inicialmente en la industria bioquímica para la rotura celular, pero en la década comprendida entre los años 1980 y 1990, la aplicación de la HPH se introdujo en el campo de la química, farmacéutica y alimentación, para múltiples finalidades. En la industria alimentaria destacan la estabilización físico-química de los productos líquidos y su higienización, como tecnología alternativa a las convencionales para la mejora de la vida útil de los productos alimentarios (Diels *et al.*, 2006; Dumay *et al.*, 2012; Flourey *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2005; Popper *et al.*, 1990).

Desde los años 80, en el mercado han existido diferentes tipos de homogeneizadores. Estos equipos se pueden clasificar en función de la presión a la cual trabajen como *homogeneizadores de baja* (5-35 MPa), *media* (35-70 MPa), *alta* (70-200 MPa) o *ultra alta* (200-400 MPa) presión de homogenización. La Tabla 2.5 muestra, de manera resumida, las características de algunos de los homogeneizadores de *alta* y *ultra alta* presión que encontramos (prototipos y equipos que se han desarrollado para uso industrial), todos ellos de posible aplicación en la industria alimentaria.

Tabla 2.5. Algunos de los equipos de HPH que podemos encontrar en el mercado, para aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, biotecnológica o cosmética.

El fluido es bombeado hacia el espacio comprendido entre el asiento y el cabezal de la válvula. A la salida de la válvula, el fluido se somete a una brusca caída de presión.



APV Homogenizers (APV- USA)

Equipos con diferente valvulería y flujo de trabajo variable. Algunos equipos de laboratorio permiten trabajar con volúmenes mínimos de 100 mL, y caudales de hasta 22 l/h, a presiones de trabajo hasta 200 MPa. Equipo de mayor volumen (800 - 1000 l/h) de presión de trabajo máxima 150 MPa.

Gea Niro Soavi - Homogenizers (Gea Niro Soavi - Italia)

- **Panda.** Aplicaciones de laboratorio. Presión de trabajo 150 MPa, llegando a los 200 MPa, a caudales de 3-10 l/h.
- **UHP 4000 bar** (Gea Niro Soavi - Italia). Equipo para laboratorio capaz de trabajar a 400 MPa y con volúmenes mínimos de 500 mL. Caudal hasta 55 l/h.

El producto es forzado a pasar a través de una cámara formada por dos microcanales, mediante los cuales se divide en dos corrientes, acelerándose. Estas corrientes acaban colisionando entre sí, a una elevada velocidad.



Microfluidizer (Microfluidics International Corporation, Newton, MA, EEUU). Equipos industriales disponibles (2000 l/h), capaces de trabajar a 270 MPa. Equipos de laboratorio de 1 mL / min.

Nanojet (Haskel, EEUU). Equipos de laboratorio. Flujos de hasta 30 L/h y presiones de trabajo máximas de 200 MPa.

Homogenizadores dinámicos con válvula de alta presión fabricada con materiales cerámicos. Válvula sin anillo tipo "o". Accionamiento neumático.

Emulsiflex (Avestin™, Canadá). Existen diferentes modelos de equipo. Presiones de trabajo de hasta ~ 200 MPa, con caudales de 1 - 160 l/h. Sistemas adaptados para trabajar con pequeños volúmenes de muestra, de hasta 3 mL.

El fluido es alimentado axialmente a lo largo de la parte móvil de la válvula, acelerándose radialmente por el espacio existente entre el cabezal y su asiento.

La distancia de esta apertura, la velocidad del fluido y la presión aplicada dependerán de la fuerza con la que el pistón actúe, la cual podrá ser ajustada para regular las condiciones de homogenización.



Stansted (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido). Equipos de piloto y de laboratorio. Flujos de trabajo comprendidos entre los 16 - 120 l/h. Presión máxima de trabajo de 400 MPa. Equipos de laboratorio que pueden trabajar con volúmenes de 1 - 35 mL.

Fuente: <http://www.niro-soavi.com>; <http://www.hollandapt.com>; <http://www.microfluidicscorp.com>; <http://www.avestin.com>; <http://www.stanstedfluidpower.com>; <http://www.spx.com>.

2.3.3. El sistema de UHPH desarrollado por la empresa StanstedTM

Esta tesis se realizó con un equipo de homogenización a ultra alta presión capaz de trabajar a presiones de hasta 400 MPa (modelo FPG11300), diseñado por la empresa *Stansted Fluid Power, Ltd.* (Stansted, Reino Unido). El diseño de la válvula de alta presión del equipo, así como al material cerámico del que está fabricada, hacen posible que trabaje a presiones de homogenización *ultra altas*. La Figura 2.6 muestra el esquema de la válvula *de Stansted*.

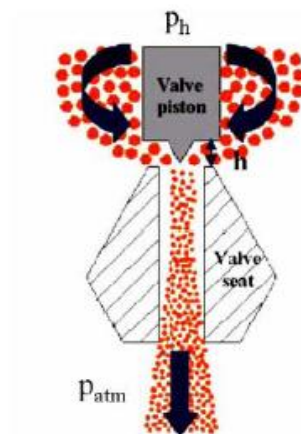


Figura 2.6. Esquema de la válvula de UHPH de la empresa Stansted Fluid Power.

A diferencia del diseño propuesto por Gaulin (Figura 2.6), en esta válvula el fluido es alimentado axialmente a lo largo de la parte móvil de la válvula (o pistón) y en la válvula, el fluido se acelera radialmente por el espacio existente entre el cabezal y el asiento. La distancia de esta apertura (de 2-2,5 μm), la velocidad del fluido y la presión a la cual el fluido será sometido dependerán de la fuerza con la que el pistón actúe, fuerza que se podrá ajustar para regular las condiciones de homogenización.

La Figura 2.7 muestra los elementos que comprenden el sistema de UHPH que se utilizó en este trabajo de Tesis. Previo a la válvula de homogenización, el sistema de UHPH comprende de un tanque de recepción del producto, un intercambiador de calor (mediante el cual se ajusta la temperatura de entrada del producto a la válvula) y dos intensificadores propulsados por una bomba de alta presión (para el bombeo del producto hasta la válvula), los cuales actúan de manera sincronizada permitiendo un flujo constante del producto a la válvula de homogenización.

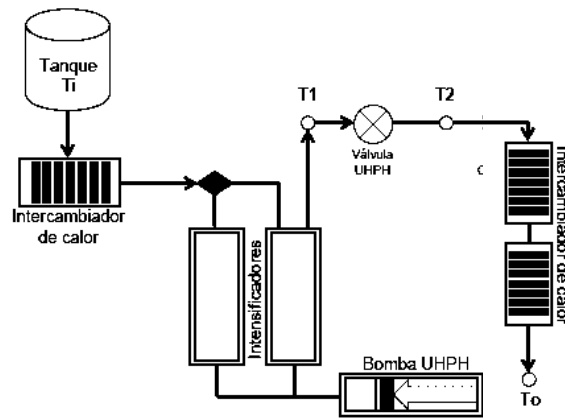


Figura 2.7. Esquema del sistema de UHPH diseñado y patentado por el CERPTA.

A la salida de la válvula de homogenización existe la posibilidad de enfriar el producto mediante un intercambiador de calor, el cual disminuye su temperatura en el menor tiempo posible. Este sistema incluye también la conexión del tubo de salida del producto a una cabina de flujo laminar, dónde se realizará la recogida del producto para minimizar la posible contaminación microbiana después del tratamiento aplicado.

Destacar que, durante el tratamiento del producto, las variables de proceso *temperatura* y *presión* están totalmente controladas por sondas de temperatura y presión, las cuales están colocadas en diferentes puntos del sistema (entradas y salidas del producto al equipo y a las válvulas de homogenización).

2.3.3.1. Fenómenos físicos a los que el producto es sometido en el equipo

Durante el tratamiento de homogenización a ultra alta presión, el producto se ve sometido a diferentes fenómenos físicos. La caída de presión del producto a la salida de la válvula de alta presión y su impacto en la superficie sólida de la misma, así como el propio diseño y/o materiales de la válvula de UHPH y/o sus componentes provocan que el producto se someta a los fenómenos físicos de torsión, esfuerzo cortante, turbulencia, cavitación y fricción, entre otros, causando la disrupción de sus partículas y un incremento de su temperatura (Hayes *et al.*, 2003a; Middelberg, 1995; Thiebaud *et al.*, 2003). Estos fenómenos físicos determinarán las características físico-químicas,

nutricionales, microbiológicas y organolépticas del producto homogenizado, así como explicarán las diferencias existentes entre productos homogenizados bajo condiciones similares en distintos equipos de UHPH (Dumay *et al.*, 2012; Donsi *et al.*, 2013).

2.3.3.2. Incremento de la temperatura durante el tratamiento

Aunque el tratamiento de UHPH no suele asociarse con el tratamiento por calor, durante el tratamiento de homogenización a ultra alta presión el producto sufre diferentes cambios de temperatura. Varios autores han observado una relación directamente proporcional entre el aumento de la presión de trabajo y el incremento de la temperatura del producto. En un inicio, antes de su paso por la válvula de homogenización, la temperatura del producto tiende a aumentar unos 2-3 °C por cada 100 MPa de presión, a razón del calor de compresión generado por el intensificador al incrementar la presión de trabajo (Dumay *et al.*, 2012). Posteriormente, después de su paso forzado a través de la válvula de alta presión, la temperatura del producto sufre un incremento más notable, directamente proporcional a la presión de homogenización (de 14-18 °C por cada 100 MPa), debido principalmente, a la conversión de la energía mecánica y cinética del producto en energía térmica, resultado de los fenómenos físicos asociados con el paso del fluido a través del asiento de la válvula (Dumay *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2003a; Middelberg, 1995; Picart *et al.*, 2006; Thiebaud *et al.*, 2003). Varios estudios demuestran que trabajando a presiones comprendidas entre los 100 y 300 MPa, y a temperaturas de entrada del producto de entre 4 y 24 °C, el incremento de temperatura del producto después de su homogenización incrementa un total de ~ 17 a 21 °C por cada 100 MPa (Donsi *et al.*, 2009; Dumay *et al.*, 2012; Flourey *et al.*, 2000; Pereda *et al.*, 2007, Poliseli-Scopel *et al.*, 2012; Thiebaud *et al.*, 2003).

Se estima que el tiempo de calentamiento del producto es muy breve (< 1 s), por lo que se podría considerar despreciable un posible efecto del calor en el producto sobre todo en comparación con los tratamientos térmicos convencionales (Flourey *et al.*, 2000; Picart *et al.*, 2006). De todos modos, algunos estudios apuntan el posible efecto de la temperatura sobre la modificación de las características físico-químicas y microbiológicas del producto en procesos de UHPH en los que la temperatura de entrada del producto en el equipo sea superior a los 50 °C (Poliseli-Scopel *et al.*, 2012).

2.3.4. Aplicaciones de la tecnología en el campo alimentario

En los últimos tiempos, se han realizado diferentes estudios sobre la aplicación de la tecnología de UHPH en la industria alimentaria. Varios autores, con prototipos de equipos diferentes, han estudiado el efecto de las múltiples variables del tratamiento en el procesado de diferentes matrices alimentarias, generando más conocimiento e información para el desarrollo de esta tecnología. Entre otros, los principales efectos de la UHPH sobre los alimentos líquidos se traducen a una modificación de sus características físico-químicas, organolépticas y microbiológicas (Floury *et al.*, 2000; Paquin, 1999). En la mayoría de los casos, las características finales de los productos procesados por UHPH mejoran en comparación con las que presentaban sus homólogos tratados mediante tecnologías convencionales (como las tecnologías térmicas de pasteurización o esterilización), por lo que la homogenización a ultra alta presión se presenta como una tecnología emergente con un gran potencial para la obtención de productos higienizados que preserven al máximo las características del producto *fresco*.

A continuación, se presentan muy brevemente algunos aspectos relacionados con la aplicación de esta tecnología en diferentes tipos de productos alimentarios, haciendo hincapié (en el apartado 2.3.5) en el efecto de la aplicación de la homogenización a ultra alta presión en licuados vegetales. La aplicación de esta tecnología en el sector lácteo es una de las más estudiadas hasta el momento, por lo que la mayor parte de la bibliografía de la que se dispone está relacionada con los efectos de la UHPH en leche y derivados lácteos (Floury *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2005; Pereda *et al.*, 2007, 2008; Serra *et al.*, 2009; Zamora *et al.*, 2007).

- ✓ **Leche y derivados lácteos.** El tratamiento de UHPH se presenta como alternativa al tratamiento de pasteurización convencional para la leche de consumo, permitiendo la obtención de un producto final de características mejoradas (más estable físico-químicamente, organolépticamente e higiénicamente comparable con una leche pasteurizada o esterilizada térmicamente) (Amador-Espejo *et al.*, 2014; Hayes *et al.*, 2005; Pereda; 2008; Picart *et al.*, 2006; Thiebaud *et al.*, 2003). En la elaboración de derivados lácteos, diferentes estudios avalan la aptitud de esta leche homogenizada a ultra alta presión para la fabricación de quesos y yogur. En comparación con los

productos elaborados a partir de leche homogenizada convencionalmente, estos derivados lácteos presentan un menor desuerado, así como también unas buenas características microbiológicas, reológicas y microestructurales (Lanciotti *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2009; Zamora, 2009).

- ✓ **Zumos vegetales y néctares.** La UHPH también se ha aplicado en el campo de los zumos vegetales y néctares. Se ha trabajado con los zumos de naranja, tomate, manzana, albaricoque y banana, así como también con néctar de mango (Augusto *et al.*, 2013; Briñez *et al.*, 2007; Patrignami *et al.*, 2009; Saldo *et al.*, 2009; Suárez-Jacobo *et al.*, 2011a, 2011b, 2010; Velázquez-Estrada *et al.*, 2008). Diferentes autores han demostrado que con este tratamiento se consigue una higienización del producto, obteniendo un zumo o néctar pasteurizado de alta calidad. A parte, también se consigue una reducción de la actividad de algunos enzimas endógenos de los zumos, preservando a la vez su actividad antioxidante y compuestos bioactivos, así como la calidad sensorial del producto *fresco*. Con esta tecnología, se ha obtenido también zumo de tomate de estabilidad física mejorada, de más consistencia y mejor aceptabilidad sensorial, debido principalmente a su color más luminoso e intenso (Augusto *et al.*, 2013).
- ✓ **Emulsiones.** La UHPH también se ha aplicado en diferentes tipos de emulsiones o/w (leche, licuado de soja, emulsiones preparadas con aceites vegetales y surfactantes, emulsiones con proteínas de diferente origen (soja, lácteas, etc.) (Cortés-Muñoz *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2007; Flourey *et al.*, 2002 y 2004b; Hayes *et al.*, 2005; Picart *et al.*, 2006; Thiebaud *et al.*, 2003). Esta tecnología tiene un papel fundamental en el incremento de la estabilidad de las emulsiones, bien por la reducción del tamaño de la fase dispersa como por los cambios estructurales que sufren las proteínas con el tratamiento, las cuales actúan como agentes estabilizantes (Cortés-Muñoz *et al.*, 2009; Desrumaux *et al.*, 2002; Flourey *et al.*, 2000). Estudios realizados con dobles emulsiones (w/o/w) han confirmado la factibilidad de obtener estas emulsiones a través de tratamientos UHPH (Dumay *et al.*, 2012). También se ha demostrado el potencial de esta tecnología para la elaboración de emulsiones submicrónicas a partir de cantidades variables de aceite (10-50%); con la aplicación de esta tecnología se mejora su estabilidad fisico-química, lo que sugiere el potencial de la UHPH

para la protección e introducción de moléculas bioactivas lipofílicas (p.e. omega-3, ácido lineico conjugado, etc.) en diferentes formulaciones alimentarias (Hebishy, 2013).

- ✓ **Otras aplicaciones.** Otra aplicación de esta tecnología se encuentra en el procesado de nuevos ingredientes alimentarios. Se ha observado que los tratamientos de UHPH aplicados a agentes emulsificantes y estabilizantes (pectinas, metilcelulosa, goma xantana, proteínas lácteas, etc.) modifican sus propiedades funcionales, en algunos casos mejorándolas. La aplicación de la UHPH para la micro y nanoencapsulación de ingredientes se presenta como una tendencia emergente. Chen *et al.* (2004) utilizaron esta tecnología para microencapsular vitamina E, como nuevo ingrediente para su incorporación en bebidas y Tan *et al.*, 2005 realizaron nonodispersiones con β -caroteno para su introducción, de forma protegida, en diferentes formulaciones alimentarias.

2.3.5. Aplicación de la UHPH en licuados de origen vegetal

Los licuados vegetales son sistemas coloidales complejos en los que partículas de diferente naturaleza (gotas de aceite, restos procedentes de la molturación de los granos, almidón, cuerpos proteicos, etc.) coexisten en un medio acuoso. La vida útil microbiana de estos productos suele estar muy limitada, ya que las materias primas con las que se trabaja, por su naturaleza, suelen presentar recuentos microbianos elevados. Su pH cercano a la neutralidad y su composición, rica en nutrientes, favorecerán un rápido crecimiento de los microorganismos en el licuado. A parte, el perfil de la grasa de estos productos (principalmente caracterizado por la presencia de ácidos grasos insaturados) y la presencia de enzimas lipolíticas en estas semillas favorecerán la rápida aparición de reacciones de oxidación lipídica. Todo ello hace indispensable la aplicación de procesos de conservación que mejoren las características del licuado en el tiempo, incrementando su vida útil comercial.

Actualmente, existen pocos estudios relacionados con la aplicación de la UHPH en licuados vegetales. La mayor parte de ellos se han realizado en licuado soja y almendra, pero también se encuentran referencias de algunos estudios previos realizados en licuado de arroz (Cruz *et al.*, 2007; Jorcín *et al.*, 2012; Polisel-Scopel *et al.*, 2012;

Valencia-Flores *et al.*, 2013). Según la bibliografía, esta tecnología mejora la estabilidad coloidal de los licuados, incrementando su vida útil desde un punto de vista microbiológico y físico-químico, y minimizando los efectos sobre las características sensoriales del producto en comparación con las tecnologías térmicas de pasteurización y esterilización convencional. En los apartados siguientes se expone, brevemente, el efecto del tratamiento de UHPH sobre los componentes del licuado vegetal.

2.3.5.1. Efecto sobre la microbiota

La UHPH es una tecnología que se presenta como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales de higienización de los productos líquidos alimentarios (Donsi *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2005; Pereda *et al.*, 2007; Saldo *et al.*, 2009; Thiebaud *et al.*, 2003;). Hasta el momento, se ha demostrado el potencial de esta tecnología para la inactivación de diferentes microorganismos patógenos en matrices alimentarias variadas (Diels *et al.*, 2005; Donsi *et al.*, 2009; Briñez *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel, 2012; Velázquez-Estrada *et al.*, 2011), obteniendo productos equivalentes a los pasterizados convencionalmente, así como también, en algunos casos, consiguiendo su esterilidad comercial (Amador-Espejo *et al.*, 2014; Poliseli-Scopel *et al.*, 2014). Son varios los factores que determinan el nivel de inactivación microbiana en el producto, entre los que destacan la *temperatura de entrada* del producto en el equipo y la *presión* de homogenización que se aplique (Briñez *et al.*, 2007; Diels *et al.*, 2005; Donsi *et al.*, 2009; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012; Thiebaud *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2002), la *geometría de la válvula* (Donsi *et al.*, 2013), el *número de ciclos* o tratamientos que se realicen sobre el producto (Picart *et al.*, 2006), la *composición* de la membrana celular y la *forma* de los microorganismos (Donsi *et al.*, 2009; Lanciotti *et al.*, 2006; Popper *et al.*, 1990; Vachon *et al.*, 2002; Wuytak *et al.*, 2002), *los recuentos iniciales de microorganismos* en el producto crudo (Vachon *et al.*, 2002; Moroni *et al.*, 2002), el *tipo de matriz, composición y características físico-químicas de la matriz* (Diels *et al.*, 2005; Briñez *et al.*, 2007; Kheadr *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002), así como la presencia de *inhibidores microbianos o conservadores naturales* en el producto fresco (Iucci *et al.*, 2007; Vannini *et al.*, 2004). Las teorías que estiman una posible explicación del efecto de estos factores sobre la reducción microbiana con el tratamiento

de UHPH son múltiples, encontrándose, en algunos casos, discrepancias entre resultados.

En licuados vegetales, los estudios realizados hasta el momento han demostrado el potencial de la UHPH como tecnología higienizante alternativa a los tratamientos de pasteurización y esterilización térmica. En licuado de soja, Cruz *et al.* (2007) redujeron ~ 2,4 y 4,2 unidades logarítmicas los recuentos totales del producto, trabajando bajo a presiones de 200 y 300 MPa y a $T_i = 40\text{ }^\circ\text{C}$, lo que demostró el potencial de esta tecnología como alternativa al tratamiento de pasteurización térmica del licuado de soja. Bajo estas condiciones de trabajo, Cruz *et al.* (2007) obtuvieron una reducción de ~ 2 log ufc/mL del contenido en esporas del producto, no observándose diferencias significativas entre tratamientos. Poliseli- Scopel (2012) y Valencia-Flores *et al.* (2013) evidenciaron el efecto sinérgico entre la temperatura de entrada del producto en el equipo y la presión de homogenización aplicada (Hayes *et al.*, 2005; Thiebaud *et al.*, 2003). Poliseli-Scopel *et al.* (2012), en licuado de soja, observó que trabajando a presiones de homogenización de 200 MPa y $T_i = 75\text{ }^\circ\text{C}$ y de 300 MPa a $T_i = 55\text{-}75^\circ\text{C}$, los recuentos de bacterias totales, esporas aerobias y *Bacillus cereus* del producto se encontraban por debajo del límite de detección ($< 0,5$ ufc/mL), aunque después de realizar el test de esterilidad comercial de los productos homogenizados observaron que tan sólo la muestra tratada a 300 MPa y $T_i = 75\text{ }^\circ\text{C}$ no presentó crecimiento alguno. Estos investigadores obtuvieron un licuado de soja comercialmente estéril y de características físico-químicas y sensoriales estables (durante 6 meses a temperatura ambiental), trabajando a presiones de homogenización de 300 MPa y a $T_i = 80\text{ }^\circ\text{C}$ (Poliseli-Scopel *et al.*, 2014). En licuado de almendra, Valencia-Flores *et al.* (2013) también observaron una reducción significativa de los recuentos totales de bacterias (1,7-4,5 log ufc/mL) y esporas (2,5-4 log ufc/mL) homogenizando el licuado a 200 MPa ($T_i = 65\text{-}75\text{ }^\circ\text{C}$) y a 300 MPa ($T_i = 55\text{-}75\text{ }^\circ\text{C}$), siendo todos los tratamientos de UHPH más efectivos que el tratamiento de pasteurización convencional ($90\text{ }^\circ\text{C}$, 90 s) que aplicaron al licuado. A 300 MPa y $T_i = 65\text{-}75\text{ }^\circ\text{C}$, los licuados de almendra no presentaron crecimiento microbiano después de su incubación a $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 días, lo que apuntó haber conseguido la esterilidad del producto. Destacar, en estos estudios, la relación directamente proporcional entre la inactivación de microorganismos esporulados y la combinación de los parámetros de presión de homogenización y temperatura de entrada del producto en el equipo.

Ninguno de los autores previamente citados (Cruz *et al.*, 2007, Poliseli-Scopel *et al.*, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013)), en los licuados UHPH, detectaron presencia de coliformes ni mohos y levaduras, lo que evidenció, nuevamente, la baja baroresistencia de este tipo de microorganismos frente a los tratamientos de UHPH (Donsí *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2007; Suárez-Jacobo, 2010).

2.3.5.2. *Efecto sobre sus componentes y propiedades físico-químicas*

La UHPH tiene un gran efecto sobre los componentes de los productos (grasas, proteínas, enzimas, etc.), lo que repercute, entre otros, en la modificación de sus propiedades físico-químicas y organolépticas (Cruz *et al.*, 2007; Datta *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2005; Pereda *et al.*, 2007, 2008; Poliseli-Scopel. *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2011; Thiebaud *et al.*, 2003; y 2012; Zamora *et al.*, 2007).

a) Efecto sobre la desnaturalización proteica

En su paso por la válvula de homogenización, el producto se ve sometido a diferentes fenómenos físicos que afectarán a las características de sus proteínas. En productos tratados por UHPH, se ha descrito la ruptura y reducción del tamaño de las micelas de caseína en leche (Khheadr *et al.*, 2002; Sandra *et al.*, 2005), la desnaturalización de proteínas séricas (Desrumaux *et al.*, 2002; Pereda *et al.*, 200), así como la desnaturalización de proteínas de soja debido a un cambio en su conformación macromolecular (Floury *et al.*, 2002). En licuados vegetales, Cruz (2008), Poliseli-Scopel (2012) y Valencia-Flores *et al.* (2013) observaron un incremento de la desnaturalización de la proteína del licuado con el incremento de presión de homogenización, siendo la superficie de la proteína de estos licuados UHPH más hidrofóbica que en sus homólogos crudo o pasteurizado convencionalmente. Estos autores apuntaron el efecto directamente proporcional entre la presión de homogenización y el grado de desnaturalización proteica, ya que observaron una disminución de la entalpía endotérmica (lo que indica mayor desnaturalización) en los termogramas obtenidos por DSC correspondientes a los licuados tratados a mayor presión.

Los resultados obtenidos en estos estudios apuntaron la mayor interacción de las proteínas desnaturalizadas (o parcialmente desnaturalizadas) con los lípidos de la

dispersión, contribuyendo a la mejora de la estabilidad física de la emulsión (Poliseli-Scopel, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013). De hecho, previamente, Bouaouina *et al.* (2006) ya describieron que la hidrofobicidad de las proteínas del suero incrementaba gradualmente a razón de la presión de homogenización, por lo que sus propiedades estabilizantes mejoraban. Cruz *et al.* (2008) atribuyeron la desnaturalización de la proteína más a los fenómenos físicos a los que se somete el producto en la válvula de UHPH (cavitación, cizalla, turbulencia, etc.) que al propio efecto de la temperatura, tal y como Hayes *et al.* (2005) describieron previamente en sus estudios con leche.

b) Estabilidad de la emulsión: efecto sobre las gotas de grasa y el tamaño de las partículas del producto homogenizado.

Diferentes autores han demostrado la efectividad del tratamiento de UHPH en la mejora de la estabilidad coloidal de los alimentos procesados (Pereda *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012). Como se ha comentado anteriormente, los licuados vegetales son sistemas coloidales complejos en los que coexisten partículas de diferente naturaleza. La estabilidad de la emulsión estará sujeta al tamaño de las partículas en suspensión y a las interacciones físico-químicas que se establezcan entre ellas. La Figura 2.8 muestra un ejemplo de emulsión correspondiente a un licuado vegetal recién elaborado (A) y el mismo licuado después de ser homogenizado (B). En el producto sin homogenizar, en suspensión, se observan gotas de grasa de diámetro vario y otros tipos de cuerpos procedentes de la molturación de las materias primas vegetales (cuerpos proteicos, almidón, fibras, etc.). También se aprecian otros ingredientes y aditivos añadidos en suspensión. Estas partículas serán las responsables de la rápida aparición de los fenómenos de desestabilización coloidal del producto con el reposo, como son el cremado de las gotas de grasa (o migración de partículas menos densas hacia la superficie) y la sedimentación de las partículas más densas (o migración de estas partículas al fondo del recipiente). Con el proceso de homogenización, la estabilidad coloidal de los productos mejora notablemente, entre otros, debido a la disminución del tamaño de las partículas en suspensión y a su mejor dispersión.

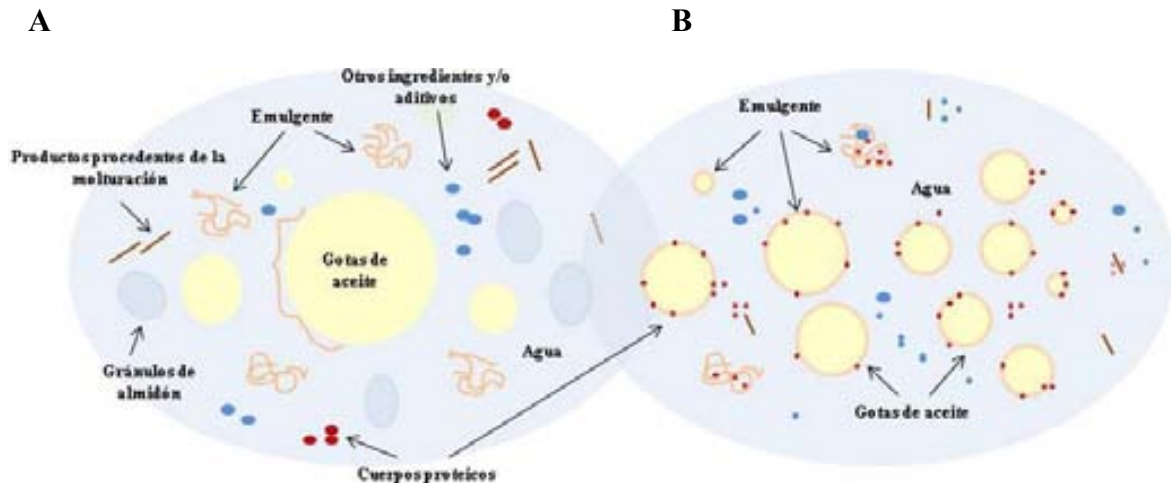


Figura 2.8 . Emulsiones correspondientes a un licuado vegetal (A) recién el aborrido y (B) después de su homogenización.

La UHPH, a diferencia del tratamiento de homogenización convencional, produce una reducción considerable del tamaño medio de las partículas en suspensión, así como su mejor dispersión (Cruz *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013). En los licuados vegetales UHPH, la distribución del tamaño de partícula se suele caracterizar por la presencia de un grupo mayoritario de partículas de diámetro muy reducido y homogéneo, por lo que la estabilidad coloidal de estas emulsiones suele mejorar en comparación con el producto crudo u homogenizado convencionalmente, debido a una menor velocidad de migración de las gotas de grasa hacia la superficie del producto. Estos licuados UHPH también se caracterizan por presentar un segundo grupo de partículas de mayor tamaño, correspondientes a agregados de partículas en suspensión (Cruz *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013). La presencia de estos agregados se relaciona con el incremento de la presión de trabajo, si bien la cantidad de agregados de partículas formados en los licuados homogenizados a menor presión tiende a ser menor (Cruz *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2007). Flourey *et al.* (2002) apuntaron que este fenómeno se debe a los diferentes fenómenos físicos a los que el producto se somete en la misma válvula de UHPH (turbulencia, gradientes de velocidad, esfuerzo cortante, etc.), favoreciendo la colisión de estas partículas. Otros autores también apuntaron la importancia de las características de las membranas de los nuevos glóbulos de grasa formados como responsables de su coalescencia y posterior floculación (Dalglish *et al.*, 1996). Valencia-Flores *et al.* (2013), en licuado de almendra, atribuyeron la formación de agregados de partículas en el producto

homogenizado (UHPH) a la insuficiente cantidad de proteína disponible para recubrir los nuevos y numerosos glóbulos de grasa formados, ya que observaron una disminución de estos agregados al añadir lecitina de soja como agente emulsionante en el licuado. Cruz *et al.* (2007) apuntaron que la formación de estos agregados dependería más de la reorganización de la proteína en la interfase aceite-agua, debido al efecto de la presión, que de la cantidad de proteína existente. La presencia de estos agregados de partículas en el producto repercutirá negativamente en la estabilidad coloidal de la emulsión, aumentando la velocidad de aparición del fenómeno de cremado en el producto.

A parte de la reducción del tamaño de las gotas de grasa en suspensión, la existencia de agentes emulsionantes en el licuado también favorecerá la estabilidad coloidal del producto. En una emulsión homogenizada (Figura 2.8, B) con agentes emulsionantes, se observa que las moléculas apolares (principalmente gotas de grasa) están envueltas de las moléculas anfifílicas existentes en el producto base, las cuales mejoran su estabilidad y las protegerán, en gran parte, del ataque de posibles agentes oxidantes. Como se ha descrito anteriormente, con la aplicación de la UHPH las proteínas desnaturalizadas también realizan un efecto protector y estabilizante de las gotas de grasa en suspensión. Estas proteínas son adsorbidas en la interfase aceite-agua, reduciendo la tensión superficial de la gota y generando las fuerzas repulsivas suficientes para evitar fenómenos de agregación con gotas vecinas. En general, y en comparación con otros emulgentes, las membranas interfaciales formadas por las proteínas desnaturalizadas suelen tener un grosor relativamente fino, por lo que mayoritariamente evitan la interacción entre gotas de grasa mediante fuerzas de repulsión electrostáticas. Por ello, las emulsiones estabilizadas por proteínas suelen ser muy sensibles al pH y a la fuerza iónica del medio, ya que estas tienden a flocular cuando el pH de la solución es cercano a su punto isoeléctrico y la fuerza iónica del medio es excesiva (McClements, 2005).

c) Efecto sobre la viscosidad del producto

Entre otros, la viscosidad de los licuados vegetales estará determinada por el tamaño de las partículas de la dispersión coloidal y las interacciones existentes entre ellas (Floury *et al.*, 2000). Con el tratamiento de UHPH, diferentes autores han observado que la

viscosidad del producto tiende a aumentar a razón del incremento de la presión de homogenización (Cruz *et al.*, 2007; Pereda *et al.*, 2007; Polisel-Scopel, 2012). Este efecto podría explicarse por el aumento de la fricción interna entre partículas, debido a la reducción de tamaño de las gotas de grasa y el consiguiente aumento de la relación de su superficie/volumen. La presencia de los agregados de partículas en el licuado, formados con el tratamiento de UHPH, también afectará al valor de viscosidad del producto final, así como a la evolución del valor de este parámetro durante el almacenamiento del licuado (Cruz *et al.*, 2007; Flourey *et al.*, 2002; Pereda *et al.*, 2007).

d) Oxidación de la grasa

La oxidación de los lípidos constituye uno de los problemas más comunes e importantes en la industria alimentaria, ya que causa el deterioro de los productos tanto desde un punto de vista organoléptico como nutricional (McClements, 2002). En los licuados vegetales es habitual observar procesos de oxidación de la grasa, entre otros, debido a la que la mayor parte de estas grasas son de naturaleza insaturada. Por ello, será fundamental retardar la aparición de estas reacciones de degradación, con el objetivo de mejorar sus características organolépticas y nutricionales. En el producto crudo, las reacciones de oxidación de la grasa suelen ser de tipo autocatalítico, originándose a partir de diferentes componentes que se suelen encontrar en el mismo alimento (enzimas lipolíticos, metales, etc.). Los factores ambientales (como la temperatura, la luz o el oxígeno) a los que el producto esté sometido también influenciarán notablemente en la transición de estas reacciones de deterioro (Badui, 2006).

Entre otros, en los licuados vegetales, los procesos de oxidación de la grasa dependerán de la distribución y naturaleza de la grasa en el producto, de su área de exposición y de la existencia de promotores de estas reacciones. En los licuados en los que la grasa esté homogenizada y emulsionada en la fase acuosa, así como protegida por una membrana resistente por adición de ciertos ingredientes o aditivos alimentarios, las reacciones de oxidación serán menos propensas. La superficie de las gotas de grasa también será un factor determinante en este tipo de reacciones de degradación. Diferentes autores han observado que el proceso de UHPH favorece la formación de compuestos indicadores de las reacciones primarias de oxidación de la grasa, en comparación con el producto crudo o bien el licuado homogenizado convencionalmente, debido a la mayor superficie que se genera con este proceso al aumentar el número de gotas en dispersión (Polisel-

Scopel, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013. En otras matrices alimentarias como la leche, Pereda *et al.* (2008) observaron una menor susceptibilidad a la oxidación de la grasa del producto UHPH, probablemente debido a la suficiente cantidad de caseína existente para el recubrimiento de las nuevas gotas de grasa formadas (Pereda, 2008). En los licuados vegetales, la utilización de emulgentes conllevará la creación de una fina capa alrededor de las gotas de grasa, la cual actuará de barrera entre la grasa y las sustancias reactivas del medio (metales, peróxidos, etc.), favoreciendo su estabilidad oxidativa. La naturaleza de las proteínas y/o de las sustancias surfactantes que se utilicen en la emulsión también serán determinantes en el nivel de oxidación de la grasa del producto.

e) Factores antinutricionales, enzimas y vitaminas

La presencia de factores antinutricionales en productos de origen vegetal es frecuente. Los inhibidores trísicos, los fitatos, los taninos, los oxalatos, etc., son sustancias que interactúan con los nutrientes del grano, impidiendo o reduciendo su absorción, por lo que su eliminación y/o reducción durante la elaboración y procesamiento del licuado será clave. Poliselí-Scopel *et al.* (2012), en licuado de soja, describieron la efectividad del tratamiento de UHPH sobre la reducción del inhibidor trísico, observando una disminución del ~ 37% de su contenido. Esta reducción fue similar a la que obtuvieron mediante el tratamiento convencional de pasteurización térmica a 95 °C y durante 30 s. En la bibliografía, encontramos estudios que evidencian también del efecto de la UHPH sobre los enzimas de los licuados de origen vegetal, como por ejemplo la polifenoloxidasas, la lipooxigenasa, la peroxidasa o la poligalacturonasa (Calligaris *et al.*, 2012; Poliselí-Scopel *et al.*, 2012; Suárez-Jacobo, 2011; Velázquez-Estrada *et al.*, 2008). En licuado de soja, Cruz (2008) inactivaron totalmente la actividad de la enzima lipooxigenasa, homogenizando el producto a 200 y 300 MPa ($T_i = 40-50$ °C). El efecto de la presión y de los fenómenos físicos relacionados con el tratamiento de UHPH sobre la estructura física del enzima modifican su conformación y actividad, por lo que los resultados que se obtengan dependerán de las condiciones de tratamiento que se apliquen, así como del tipo de enzima del que se trate. La eliminación (o reducción) de su presencia, en muchos casos, beneficia la calidad del licuado, ya que la actividad de algunos de ellos se relaciona con la aparición de sabores y/o cambios de apariencia indeseados en el producto final (Liu *et al.*, 1999). Cabe destacar que esta enzima es la

principal responsable de la oxidación de los ácidos grasos insaturados del producto, provocando la formación de compuestos volátiles que afectarán negativamente al aroma y sabor del licuado.

Aunque no existen estudios en licuados vegetales sobre el efecto de la UHPH sobre las vitaminas del producto, sí se dispone de datos obtenidos en estudios realizados con otros productos de origen vegetal, como los zumos y néctares de frutas. Artigiani *et al.* (2011) en néctar de mango, observaron que el incremento de presión y temperatura de trabajo de homogenización afectaba de manera directamente proporcional a la reducción de Vitamina C del producto, aunque asociaron también las pérdidas de esta vitamina al proceso de oxidación debido al no desairado del zumo. Estos mismos autores sí observaron un ligero efecto del tratamiento a 300 MPa sobre el contenido en β -caroteno del zumo, probablemente debido a la oxidación de este componente en el tiempo, pero sus estudios concluyeron considerando la tecnología de UHPH como tecnología apta para la preservación de compuestos bioactivos en zumos de frutas.

f) Afectación sobre las características organolépticas

La evaluación sensorial de los alimentos constituye uno de los aspectos más importantes para el lanzamiento de un producto al mercado, ya que las características organolépticas del alimento serán determinantes para su aceptación por parte del consumidor. En general, la tecnología de UHPH destaca por los mínimos efectos causados sobre las características organolépticas de los productos procesados, a diferencia del efecto producido por las tecnologías térmicas de conservación convencionales. En licuados vegetales, se han descrito ligeros cambios en el color de los productos homogenizados a ultra alta presión, siendo el producto UHPH, en general, menos luminoso que su homólogo crudo (probablemente debido a la interacción de la luz incidente con los nuevos agregados de partículas formados con el tratamiento de homogenización) (Cruz *et al.*, 2007; Polisel-Scopel *et al.*, 2013). También se han descrito ligeros cambios en las características reológicas y de flavor de los licuados UHPH, aunque muchas veces, de ser estos cambios apreciados por el consumidor, no provocan reacción de rechazo, sino más bien una buena aceptación del producto (Polisel-Scopel *et al.*, 2013; Suárez-Jacobo, 2011).

2.3.6. La introducción de la UHPH en la industria alimentaria

Por lo descrito anteriormente, la UHPH se presenta como una tecnología apta para la higienización de los productos alimenticios así como también para la estabilización de sus características físico-químicas y organolépticas durante su vida útil. Por los resultados obtenidos hasta el momento, diferentes autores han conseguido con éxito estandarizar las condiciones de tratamiento por UHPH de diferentes alimentos, como tecnología sustitutiva de los procesos térmicos de pasteurización y esterilización convencionales para la venta y conservación de estos productos en el mercado. Poliseli-Scopel (2012) estandarizaron las condiciones del procesado por UHPH para la obtención de un licuado de soja de calidad de 28 días de vida útil, conservado a 4 °C, microbiológicamente seguro, físico-químicamente estable y ampliamente aceptado por el panel catador. Los mismos autores establecieron también unas condiciones de tratamiento para la obtención de licuado de soja comercialmente estéril, con propiedades físico-químicas y sensoriales estables hasta 6 meses de conservación del producto a temperatura ambiente. También se han realizado estudios completos de vida comercial de otros alimentos, consiguiendo exitosos resultados; en leche, Pereda *et al.* (2007) obtuvieron un producto comercialmente estable y de vida útil equivalente a una leche pasteurizada convencional, presurizándolo a 300 MPa y $T_i = 40$ °C, Amador-Espejo *et al.* (2014) y en zumos de manzana Suárez-Jacobo (2011) consiguió estabilizar el producto durante 21 días a 4 °C, tratándolo a 300 MPa y $T_i = 4$ °C. A parte, también ha sido exitosa la elaboración de diferentes alimentos (queso fresco y madurado de cabra, yogur, licuado fermentado de soja, etc.) a partir de estos productos homogenizados a ultra alta presión (Cruz *et al.*, 2007, Serra *et al.*, 2009, Zamora *et al.* 2007), así como la obtención de emulsiones que permitan incorporar compuestos bioactivos en diferentes matrices alimentarias (Hebishy; 2013; Dumay *et al.*, 2012).

Por todo ello, el desarrollo de equipos industriales que permitan procesar mayores volúmenes de producto que los existentes hasta el momento será la clave para la transferencia de esta prometedora tecnología al marco de la industria alimentaria actual, lo que conllevará la verdadera explotación de los resultados científicos logrados hasta el momento.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3

Materiales y Métodos

3.1. Recepción de las materias primas y toma de muestras

Capítulo 4

Este estudio se realizó a partir de chufas de diferentes orígenes geográficos, las cuales hoy en día se utilizan para la elaboración de licuados. Se utilizó una chufa de origen español y tres tipos de chufas procedentes de diferentes regiones de África. Las chufas españolas (CHV), originarias de la región de Valencia y bajo la denominación de origen *Chufa de Valencia*, fueron proporcionadas por la empresa Horchata Líder, S.L. (Polinyà, Barcelona). Las chufas de origen africano fueron proporcionadas por la empresa Nectina, S.A. (Riudoms, Tarragona), procedentes de dos mercados locales de Burkina Faso (CHB1 y CHB2) y de Níger (CHN) y actualmente exportadas a Europa para la fabricación de licuado de chufa.

Cada tipo de chufa llegó a las respectivas empresas dentro de contenedores de 1000 kg de capacidad. La empresa seleccionó aleatoriamente 50 kg de cada tipo de chufa, las cuales envasó en dos sacos de rafia y envió a la Planta de Tecnología de Alimentos de la UAB. Los diferentes sacos se conservaron en un almacén fresco y seco, hasta el momento de realización de los análisis. Previamente a la toma de muestras, el contenido de los sacos se homogenizó. Posteriormente, se tomaron tres muestras representativas de tres partes diferentes de cada saco (*superior-media-inferior*), a partir de las cuales se realizaron las diferentes determinaciones analíticas.

Capítulo 5

En este estudio se trabajó con las chufas procedentes de un mercado local de Burkina Faso, proporcionadas por la empresa Nectina, S.A. (Riudoms, Tarragona). La empresa recibió la partida de chufas dentro de un contenedor de 1000 kg de capacidad, del cual extrajo aleatoriamente 50 kg de chufas que envió a la Planta de Tecnología de Alimentos de la UAB dentro de un saco de rafia.

El contenido de los sacos se homogenizó, y posteriormente se tomaron tres muestras representativas de tres partes de cada saco (*superior-media-inferior*), a partir de las cuales se realizaron el resto de determinaciones.

Capítulo 6

En este estudio se utilizó la misma chufa procedente de Burkina Faso CHB1, caracterizada en el *Capítulo 4*. La empresa envió nuevos sacos de chufa a la Planta de Tecnología de la UAB. El mijo que se utilizó se obtuvo de un mercado local de Burkina Faso, y fue proporcionado por la empresa C.P. Best Hochata (Ouagadougou, Burkina Faso), la cual envió dos sacos de 50 kg de mijo a la Planta de Tecnología de los Alimentos de la UAB. Las materias primas se conservaron en un lugar fresco y seco, dentro de sus envases originales, hasta el momento de su procesado.

Para la caracterización físico-química del mijo se tomaron tres muestras representativas de tres partes de cada saco (*superior-media-inferior*), a partir de las cuales se realizaron el resto de determinaciones.

Capítulos 7, 8 y 9

Las chufas que se utilizaron para la realización de los capítulos 6, 8 y 9 fueron chufas bajo la denominación de origen *Chufa de Valencia*, las cuales fueron proporcionadas por la empresa Horchata Líder, S.L. (Polinyà, Barcelona). Estas chufas pertenecían a los mismos lotes de producto que la empresa utiliza para la elaboración de horchata de chufa. Las chufas se recibieron en la Planta de Tecnología de los Alimentos de la UAB en diferentes sacos de rafia de 25 kg, los cuales se almacenaron en un almacén fresco y seco hasta el momento de realizar las producciones.

3.2. Caracterización físico-química de las chufas

Para la realización de los análisis físico-químicos de las chufas, se partió de tres muestras de chufas representativas de cada saco, procedentes de tres partes diferentes del envase.

3.2.1. Forma

La forma de las chufas se determinó midiendo la longitud (L_g , en mm) y el grosor (G , en mm, considerando el diámetro mayor) de 300 chufas de cada saco (100 tubérculos procedentes de tres partes diferentes del saco), mediante un pie de rey digital con una precisión de 0,01 mm (Electronic Digital Vernier Caliper 0 - 150 mm, Barcelona, España). Los tubérculos se clasificaron en tres grupos según la clasificación propuesta por Morell *et al.* (1983). Dependiendo de la relación L_g/G , las chufas se clasificaron en *chufas redondas* ($L_g/G \leq 1,24$), *ovaladas* ($1,25 < L_g/G < 1,44$) o *alargadas* ($L_g/G \geq 1,45$). Según esta clasificación, también se estimó el porcentaje de chufas de cada forma por saco.

3.2.2. Peso

El peso de las chufas se determinó pesando 300 chufas de cada saco (100 tubérculos procedentes de tres partes diferentes del saco), mediante una balanza electrónica. También se determinó el peso de los tubérculos de la misma forma, expresándose como peso medio de 100 chufas del mismo tipo (o forma).

3.2.3. Color

El color de la superficie de las chufas se determinó mediante un colorímetro Hunter Lab (MiniScan XETM, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA). Las coordenadas de color se midieron con un iluminante de D65 y un observador estándar de 10°. El colorímetro se calibró frente los estándares blanco y negro. Se realizaron medidas por triplicado de los parámetros L^* , a^* y b^* , dentro del espacio de color CIELab, propuesto por la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). El valor L^* representa la luminosidad (cuyos valores oscilan de 0 (negro) a 100 (blanco)), y los parámetros a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul) representan los componentes cromáticos, los cuales no tienen límites numéricos específicos. Las diferencias de color (ΔE^*) se evaluaron mediante la siguiente ecuación, $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$, en la que ΔL^* , Δa^* and Δb^* representan las diferencias existentes entre muestras en las coordenadas triestímulo.

3.2.4. Cinética de hidratación

Para realizar el estudio de cinética de hidratación del tubérculo se realizó un ensayo bajo unas condiciones de hidratación similares a las utilizadas en el proceso tradicional de elaboración de horchata de chufa. Las chufas secas se limpiaron con abundante agua y se sumergieron en agua descalcificada a diferente temperatura. Por cada 100 g de chufas se añadieron 500 mL de agua. El proceso se efectuó en base a tres temperaturas de agua de hidratación (10, 20 y 30 °C), y para cada temperatura ensayada, cuatro períodos de tiempo de inmersión (6, 12, 18 y 24 h). Cabe destacar que en este estudio no se tuvo en consideración el efecto *forma* en la cinética de hidratación de los tubérculos, ya que los resultados obtenidos correspondieron a un conjunto de chufas de diferente forma representativo de las partidas de chufa del mercado actual.

3.2.5. Análisis de composición

Previamente a la realización de los análisis de composición, las chufas se molturaron en seco en un molino, y posteriormente, el producto molturado se tamizó mediante su paso por un tamiz de luz de malla 0,5 mm (CISA, Barcelona).

Se utilizaron los métodos validados por la AOAC (2002) para la determinación de la humedad (método 925.10), grasa (método 920.39), proteína (método 955.04), fibra bruta (método 962.09) y cenizas (método 923.03) de los tubérculos. Para estimar la relación proteína / nitrógeno se aplicó el coeficiente 6,25. La fibra dietética (soluble e insoluble) se determinó según el método 991.43 (AOAC, 2002), utilizando el *KIT Megazyme K-TDFR 12/05* (Megazyme International, Wicklow, Irlanda). Las materias extractivas libres de nitrógeno (MELN) se determinaron por diferencia, a partir de los porcentajes anteriores. Los resultados de grasa, fibra (bruta y dietética), proteína, cenizas y MELN se expresaron en base seca.

El contenido en fitatos de la harina de chufas se determinó según el método propuesto por Haugh *et al.* (1983), siguiendo la variante *a* del proceso. Los resultados se expresaron en base a μg de fitato/mL de extracto. El contenido en taninos de las muestras se determinó según el método 9648 propuesto por la ISO (ISO, 1988). El

contenido en taninos se expresó como el porcentaje en masa de ácido tánico en base seca.

3.2.6. Fraccionamiento proteico

Para la obtención de las diferentes fracciones proteicas, la harina de chufa tamizada se desgrasó mediante el tratamiento con éter anhidro con un aparato Soxhlet (AOAC, 2002). Para el fraccionamiento proteico, se procedió según el método propuesto por Osborne (1924), realizándose algunas modificaciones:

Albúminas + Nitrógeno no proteico (NNP): Las albúminas se extrajeron a partir de la harina de chufa desgrasada, con agua destilada (0,1 g/mL), en constante agitación durante 1 h a 4 °C. La solución resultante se centrifugó a 10 000 g durante 30 min a 4 °C. Se realizaron tres etapas procediendo del mismo modo. Posteriormente, los sobrenadantes obtenidos se mezclaron. Se determinó su contenido en proteína y la muestra se liofilizó.

Globulinas: Las globulinas se extrajeron a partir del residuo sólido obtenido en la etapa anterior. Éste se mezcló con una solución de NaCl (10%) según la proporción 0,1 g/mL, en constante agitación durante 1 h a 4 °C. La solución resultante se centrifugó a 10 000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se dializó frente agua destilada durante 5 días a 4 °C, con cambio de solución diario. Posteriormente, se determinó el contenido proteico del extracto, y la muestra se liofilizó.

Prolaminas: Para la extracción de las prolaminas, el residuo procedente de la extracción anterior se mezcló con una solución de 2-propanol (70%), en la proporción 0,1 g/mL, en constante agitación durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, la solución se centrifugó a 10 000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se dializó frente a una solución de ácido acético (0,01%) durante 5 días a 4 °C, con cambio de solución diario. Posteriormente, se determinó el contenido proteico del extracto, y la muestra se liofilizó.

Glutelinas: Las glutelinas se extrajeron a partir del residuo procedente de la extracción anterior, con una solución de Na₂B₄O₇ (0,1 mol/L) + SDS (1 g/100 mL), en la proporción 0,1 g/mL, y en constante agitación durante 1 h a 4 °C, según resultados obtenidos por Bernardino *et al.* (2006). Posteriormente, la solución se centrifugó a 10

000 g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se dializó frente a una solución de ácido acético (0,01%) durante 5 días a 4 °C, con cambio de solución diario. Posteriormente, se determinó el contenido proteico del extracto, y la muestra se liofilizó.

3.2.7. Determinación de nitrógeno y proteína total

El contenido en nitrógeno de las diferentes fracciones (albúminas + NNP, globulinas, prolaminas, glutelinas y residuo insoluble) se determinó según el método Kjeldahl propuesto por la AOAC (método 955.04), mediante el aparato Kjeltex Auto Distillation 2200 (Barcelona, España).

3.2.8. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones proteicas

Los extractos proteicos liofilizados se disolvieron en una solución tampón a pH = 6,8 (0,5 mol/L de Tris-HCl, 10 mL/100 mL de glicerol, 2 g/100 mL de SDS y 0,05 g/100 mL de azul de bomofenol), en la proporción 5:1 (p/p). Para su reducción, se añadió β-mercaptoetanol (5%) a las muestras, y posteriormente, estas se calentaron al baño maría a 95 °C durante 5 min. Para la separación de la grasa, las muestras se centrifugaron a 2500 g durante 30 min. Los sobrenadantes (40 μL) se inyectaron en el gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida, de composición en poliactilamida del 4% para el gel de concentración y del 12% para el gel de resolución, según el método propuesto por Laemmli (1970). Se utilizaron como estándares las masas moleculares relativas proporcionadas por la empresa Bio-Rad Laboratories (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, Bio-Rad Laboratories, Madrid, España), correspondientes a 2-250 kDa. Se aplicó una corriente eléctrica al gel de 200 V, mediante una unidad de suministro eléctrico Pharmacia Biotech (modelo EPS 3500, Pharmacia Biotec, Uppsala, Suecia). Las bandas de proteína se fijaron mediante una solución del 0,1% (p/v) de Comassie Brilliant Blue R-250, en la proporción 5:1:4 en metanol, ácido acético y agua destilada. Los geles se destiñeron mediante una solución de metanol (160 mL/L) y ácido acético glacial (10 mL/L).

Para el análisis de las imágenes de los geles se utilizó el programa informático ImageMaster (Amersham Pharmacia Biotech, Newcastle, Reino Unido). En el gel de electroforesis SDS-PAGE, la masa molecular aparente de las bandas se estimó según la

movilidad de las proteínas en el gel, en comparación con la movilidad de los estándares de masas moleculares que se utilizaron.

3.3. Caracterización físico-química del mijo

Para la realización de los análisis físico-químicos de la semilla de mijo, se partió de tres muestras de mijo representativas de cada saco, procedentes de tres partes diferentes del envase.

3.3.1. Parámetros físicos relacionados

Las muestras se limpiaron manualmente, eliminando las semillas rotas y/o impurezas de origen físico existentes en los sacos. Se determinaron las características físicas *peso, forma, dimensiones, volumen, área superficial, esfericidad y factor forma* de las semillas de mijo. El peso de la semilla se determinó mediante una balanza analítica, pesando 1000 granos de mijo seleccionados al azar de las muestras extraídas de las diferentes partes del saco. Para la determinación del resto de parámetros físicos de la semilla, se seleccionaron al azar 100 semillas de cada una de las muestras de producto extraídas de las tres partes del saco. Los valores de D , D_1 , D_2 y D_3 (Figura 3.1) se determinaron mediante un pié de rey digital de una precisión de 0,01 mm (Electronic Digital Vernier Caliper 0 - 150 mm, Barcelona, España). A partir de estos valores se determinaron el resto de parámetros físicos, según las ecuaciones expuestas por Jain et al. (1997) en su estudio de caracterización de mijo perla.

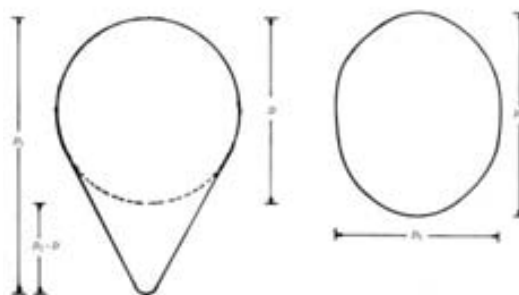


Figura 3.1. Esquema de las medidas D , D_1 , D_2 y D_3 tomadas en el grano de mijo. *Fuente:* Jain et al., 1997).

3.3.2. Caracterización química

Para el análisis de composición, los granos de mijo se molturaron en seco en un molino de laboratorio, y la harina obtenida se tamizó con un tamiz de 0,5 mm (CISA, Barcelona, España).

Se utilizaron los métodos validados por la AOAC (2002) para la determinación de humedad (método 925.10), grasa (método 920.39), proteína (método 955.04), fibra bruta (método 962.09) y cenizas (método 923.03). Para estimar la relación proteína / nitrógeno se aplicó el coeficiente 6,25. Las materias extractivas libres de nitrógeno (MELN) se determinaron por diferencia, a partir de los porcentajes anteriores. Los resultados se expresaron en base húmeda.

Los fitatos se determinaron según el método propuesto por Haugh *et al.* (1983), utilizándose la variante *a* del proceso. El contenido en taninos se determinó según el método 9648 de la norma ISO (1988). Los resultados en fitatos y taninos se expresaron en miligramos por 100 g de producto en base seca. La actividad del inhibidor tripsico se determinó según el método propuesto por Kakade *et al.* (1974), expresándose los resultados como unidades de inhibidor de tripsina (TIU) por gramo de producto en base seca.

3.3.3. Fraccionamiento proteico

Para la determinación de las fracciones proteicas del mijo se partió de harina de mijo tamizada (con un tamiz de 0,5 mm (CISA, Barcelona, España)) y desgrasada mediante el tratamiento con éter anhidro en un aparato Soxhlet (método 920.39).

Posteriormente, se procedió según se expone en el *apartado 3.2.2.4.*, con algunas modificaciones. Para la extracción de las fracciones de albúminas + NNP y prolaminas se realizaron dos etapas de extracción.

3.3.4. Determinación de nitrógeno y proteína total

El contenido en nitrógeno de las diferentes fracciones (albúminas + NNP, globulinas, prolaminas, glutelinas y residuo insoluble) se determinó según el método Kjeldahl propuesto por la AOAC (método 955.04), mediante el aparato Kjeltex Auto Distillation 2200 (Barcelona, España).

3.3.5. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones proteicas

Para la realización de los geles de electroforesis SDS-PAGE se procedió según se expone en el *apartado 3.2.6*.

3.3.6. Estudio de germinación de las semillas de mijo

Para el estudio de germinación de las semillas de mijo, los granos de mijo se limpiaron con abundante agua y se desinfectaron sumergiéndolos en una solución desinfectante del 1% en hipoclorito sódico, a temperatura ambiente y durante un tiempo de 10 min. Posteriormente, se enjuagaron con abundante agua para eliminar los restos de solución desinfectante.

Los granos se hidrataron sumergiéndolos en agua descalcificada, en la proporción 2:1 (v:p), a temperatura ambiente, durante un tiempo aproximado de 12 h. A continuación, los granos se esparcieron dentro de recipientes en cuya base se colocó un papel de filtro pre-humedecido, el cual se mantuvo en constante hidratación durante el proceso de germinación del mijo. Los recipientes se taparon con papel de aluminio agujereado, protegiéndose de la luz, y se coloraron a 30 °C, durante 48 h (Hot Cold Selecta, Barcelona, España). Se tomaron muestras de mijo a las 24 y 48 h de germinación de los granos. En ambos casos, las muestras de mijo se secaron en una estufa a 50 °C, durante 12 h, para frenar el proceso de germinación del grano. Posteriormente los granos se molturaron en seco en un molino de laboratorio, y la harina obtenida se tamizó con un tamiz de 0,5 mm (CISA, Barcelona, España).

Se realizaron las determinaciones de contenido en humedad, fitatos, taninos e inhibidor tripsico de los granos de mijo hidratados, germinados (24 y 48 h) y secados en estufa, según se expone en el *apartado 3.3.2*.

3.4. Elaboración y tratamientos de higienización aplicados a los licuados

Capítulo 5

El procedimiento empleado para elaboración de los licuados vegetales se basó en el descrito en la *Guía para la aplicación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en industrias elaboradoras de horchata de chufa natural* (Anónimo, 1999), así como en el proceso de fabricación de horchata de chufas propuesto por Morell *et al.* (1983). La Figura 3.2 presenta el diagrama de flujo de producción del licuado.



Figura 3.2. Diagrama de elaboración de los licuados vegetales. (a) Para la limpieza, selección y desinfección de los tubérculos se procedió según el protocolo de trabajo propuesto por la *Guía para la aplicación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en industrias elaboradoras de horchata de chufa natural* (Anónimo, 1999). (b) Hot Cold (Selecta, Barcelona, España); (c) A temperatura ambiente y sobre un papel de filtro; (d) Las proporciones chufa:agua se realizaron en base al peso de la chufa seca (sin hidratar); (e) Homogenizador electromecánico (Krupps/KB720, Barcelona, España) Tiempo de molturación = 3 min; (f) Tamiz de acero inoxidable de luz de malla 160 μm (CISA, Barcelona); (g) Prensa manual; (h) Filtrado del líquido extraído en el prensado.

En este estudio, se trabajó con tres temperaturas próximas a la temperatura que se utiliza en el proceso tradicional de elaboración de horchata de chufa (~ 20 °C). Debido a la naturaleza empírica de este proceso, el cual siempre se ha preestablecido según el criterio objetivo del productor de horchata, se decidió hidratar las chufas durante un período máximo de 24 h, considerando más que suficiente este intervalo de tiempo para que las chufas obtengan la turgencia adecuada para su molturación, así como también teniendo en cuenta el posible riesgo microbiano de hidratar los tubérculos durante prolongados tiempos a esta temperatura. Las proporciones de chufa y agua se realizaron partiendo del peso de la chufa seca, despreciándose la cantidad absorbida de agua por la chufa durante el proceso de hidratación.

Optimización de las condiciones de hidratación del tubérculo y proporción chufa:agua:

A partir de las chufas hidratadas en el ensayo de evaluación de su cinética de hidratación (*ver apartado 3.2.4.*), se elaboraron los respectivos licuados vegetales (Figura 3.2). La extracción se realizó a distintas proporciones de chufa:agua (1:3, 1:4, 1.5 y 1:7) y a la temperatura de agua de molturación de 20 °C.

Influencia de la temperatura del agua de extracción: Para evaluar el efecto de la temperatura de extracción se elaboraron diferentes licuados a partir de chufas hidratadas bajo las condiciones óptimas del experimento anterior (20 °C durante 12 h) y con la misma proporción de chufa:agua (1:3). Se trabajó con agua de extracción a la temperatura de 20, 40, 50 y 60 °C.

Influencia de la maceración del producto molturado: Para evaluar el efecto de la maceración del producto molturado, previa a su prensado y filtrado, se elaboraron diferentes licuados a partir de chufas hidratadas bajo las condiciones óptimas del primer experimento (20 °C durante 12 h) y con la proporción chufa:agua de 1:3. Se trabajó con agua de extracción/molturación a la temperatura de 20, 40, 50 y 60 °C, manteniendo los licuados elaborados durante 5 min (y en agitación constante) a las correspondientes temperaturas.

Influencia del pH en el producto molturado: Para evaluar la influencia del ajuste de pH del producto molturado se elaboró licuado de chufa a partir de chufas hidratadas a 20 °C

durante 12 h. Se elaboraron dos series de licuados, a partir de agua de extracción a la temperatura de 20 y 40 °C, y bajo la proporción chufa:agua de 1:3. Se ajustó el pH del producto molturado, procedente de cada serie de licuados, a los valores de 6 y 9.

Capítulo 6

Las pruebas correspondientes a la *Etapa 2* (ver *Capítulo 1*) se realizaron a nivel de laboratorio. Para la elaboración de los licuados, se utilizó un homogenizador electromecánico (Krupps/KB720, Barcelona, España). El producto molturado se prensó mediante una prensa manual, y se filtró mediante un tamiz de acero inoxidable de luz de malla de 100 µm (CISA, Barcelona, España). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

Las pruebas correspondientes a las *Etapas 3 y 4* (ver *Capítulo 1*) se realizaron en los equipos de la Planta Piloto de Tecnología de Alimentos de la UAB, realizándose un total de dos producciones en cada etapa. Para la elaboración del licuado de chufa se utilizó un equipo diseñado para la elaboración de licuado de chufa, el cual permite obtener este producto de manera continua. Las chufas se molturaron juntamente con la cantidad de agua añadida en un molino de martillos, y posteriormente, el producto resultante se prensó y filtró mediante su paso forzado por un tornillo *sin-fin*, acoplado a un filtro. Para la elaboración de licuado de mijo se partió de su harina, la cual se maceró con licuado de chufa, en constante agitación, en un depósito con agitador mecánico. El producto resultante se prensó y filtró mediante el mismo equipo utilizado en la elaboración del licuado de chufa (tornillo *sin-fin* y filtro). Para el deslodado y desnatado de los licuados se utilizó una centrífuga autodeslodante (Westfalia Separator, A.G., modelo MSA-7-06-076, serie 166-230-2) (GEA Westfalia Separator Group, Alemania) y la desnatadora de laboratorio Elecrem (Vanves, Francia), respectivamente. El desnatado del producto se realizó a la temperatura de producto de 40 °C.

En la *Etapa 4* (ver *Capítulo 1*), previamente a la aplicación de los tratamientos de higienización, se añadió al licuado un 1% de estabilizante regulador del pH (IKOTAM-E, E-339ii, E-331iii) (Ikofa, S.A., Santa Perpètua de Mogoda, España), un 2% de emulgente (Base HC9, E-472c+E-473) (Cargill, S.L., Barcelona, España) y un 0,05 % del enzima Bialfa T (Biocon Española, S.L., Les Franqueses del Vallès, España). El licuado se homogenizó en un homogenizador de doble etapa, a las presiones de 18 + 2

MPa (LAB tipo: 22.51, Rannie, Denmark) y se pasteurizó mediante un intercambiador térmico tubular indirecto (6500/010, GEA Finnah GmbH Ahaus, Alemania) de 1000 L/h de caudal, a 90 °C durante 30 s. Los licuados se envasaron a una temperatura de 20 °C, en botellas de cristal, de tapón tipo *twist-off*.

Capítulos 7, 8 y 9

La horchata de chufa se elaboró según el procedimiento tradicional de elaboración de horchata de chufa (Anónimo, 1999; CRCHV, 2014). Se realizaron algunas modificaciones del proceso para adaptarlo a los equipos e instalaciones disponibles en la Planta Piloto de Tecnología del CERPTA (Figuras 3.3 y 3.4). Se realizaron un total de tres producciones diferentes.



Figura 3.3. Acondicionamiento de las chufas para la elaboración de licuado. (a) Con agua potable, en agitación y a T^a ambiente, (b) Inmersión de las chufas en agua potable, durante 12 h y a T^a ambiente, (c) Inmersión en una solución del 0,1% de NaClO.

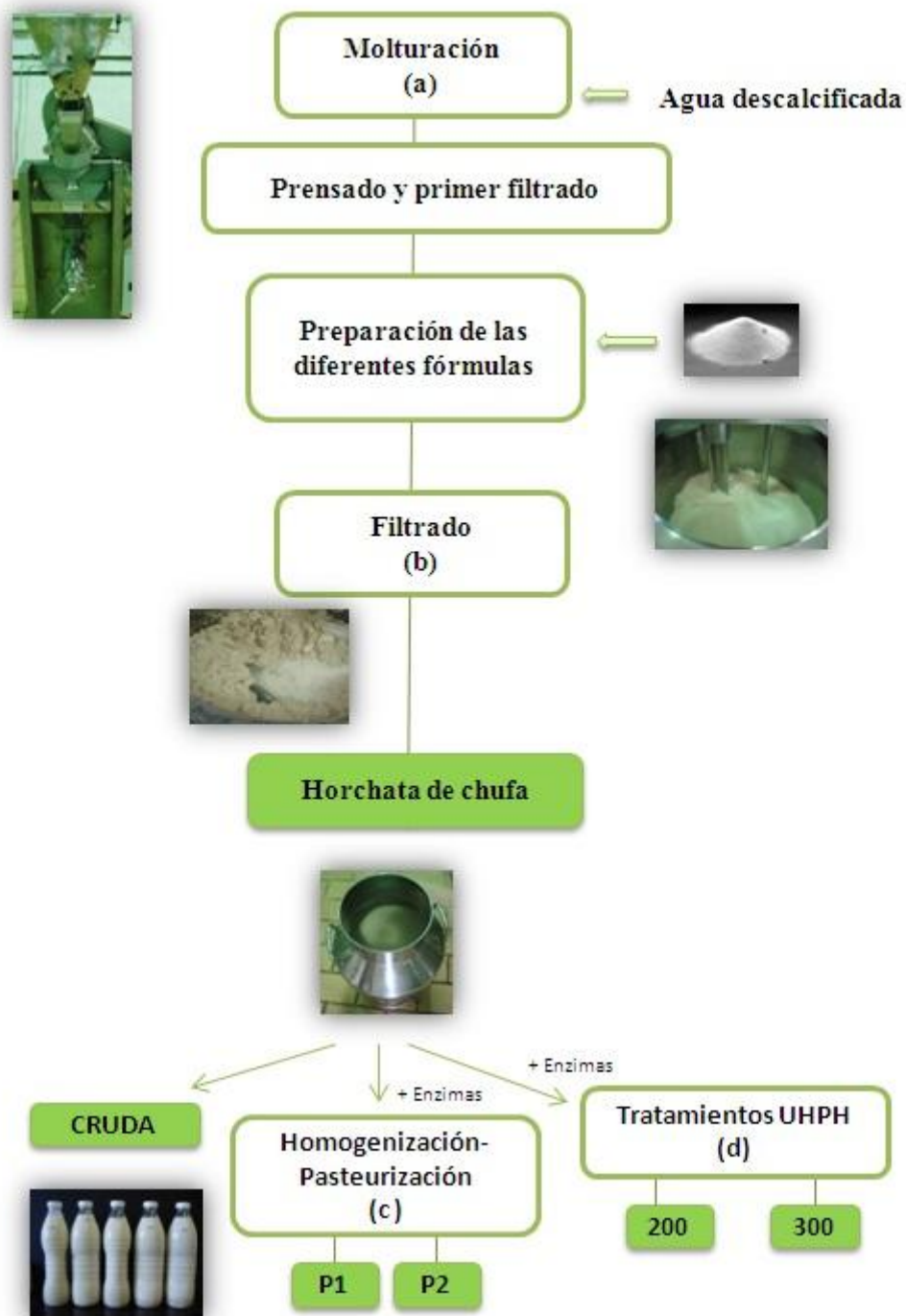


Figura 3.4. Elaboración y tratamiento de las horchatas de chufa. (a) Proporción chufa:agua (kg chufa seca/L) 1:8, a T^a ambiente, (b) Tamiz vibratorio 100 μ m, (c) 18+4 MPa y 80 $^{\circ}$ C, 15s, (d) 200 y 300 MPa, T_i = 40 $^{\circ}$ C.

3.4.1. Fórmula de las horchatas de chufa

La Tabla 3.1 muestra la relación de ingredientes y aditivos que se utilizaron en la elaboración de las diferentes horchatas. Se añadió un 8% de azúcar en todas las bebidas, porcentaje similar al que se añade en las horchatas del mercado. Los aditivos añadidos en la horchata pasteurizada P2 se seleccionaron en base a los criterios utilizados en algunas de las industrias horchateras actuales. Se añadió un porcentaje de enzima significativo a las bebidas sometidas a una temperatura ≥ 70 °C, para evitar la gelificación del almidón.

Tabla 3.1. Ingredientes y aditivos añadidos a las horchatas de chufa.

Horchata	Ingredientes y/o Aditivos añadidos (%)			
	Azúcar ¹	Enzima ²	Emulgente ³	Estabilizante ⁴
Cruda	8	-	-	-
P1, 200 y 300	8	0,5	-	-
P2	8	0,5	2	1

¹Sacarosa (Azucarera, S.L., Barcelona, España). Añadida directamente sobre el producto en agitación.

²Alfa-amilasa (Bialfa, Biocon Española, S.A., España). Añadida al producto antes de su pasteurización o homogenización a ultra alta presión (mantenimiento del producto en agitación 15 min).

³Emulgente Base HC9 (E-472c + E-473) (Cargill, S.L., Barcelona, España). Añadido previamente mezclado con una alícuota de producto, en caliente.

⁴Aditivo regulador de pH IKOTAM-E (E-339ii + E-331iii) (Ikofa, S.A., Santa Perpètua de Mogoda, España). Añadido directamente sobre el producto, en constante agitación.

3.4.2. Tratamientos de conservación aplicados

Tal y como muestra la Figura 3.4, las horchatas elaboradas (a excepción de la horchata *cruda*) se sometieron a los tratamientos de higienización que se exponen a continuación:

Pasteurización. Las horchatas P1 y P2 se homogenizaron con un homogenizador de doble etapa, a 18 + 4 MPa (LAB tipo: 22.51, Rannie, Dinamarca) y pasteurizaron mediante un intercambiador térmico tubular indirecto (6500/010, GEA Finnah GmbH Ahaus, Alemania), a 80 °C durante 15 s. Previamente a su homogenización, el producto

se estabilizó, dentro del intercambiador, a 60 °C durante 60 s. La temperatura programada de salida del producto fue de 20 °C. El caudal del equipo fue de 1000 L/h.

UHPH. Los tratamientos de homogenización a ultra alta presión se realizaron con un equipo UHPH modelo FPG11300 (Stansted Fluid Power Ltd., Stansted, Reino Unido). Se trabajó con un caudal de 120 L/h, provisto de dos intensificadores impulsados por una bomba hidráulica. Se realizaron dos tratamientos de UHPH distintos, a 200 y 300 MPa, gracias a la válvula cerámica instalada capaz de soportar presiones de trabajo de hasta 350 MPa. En ambos tratamientos, la horchata se precalentó a una temperatura de 40 °C antes de su entrada en el equipo, con un sistema de intercambiadores térmicos situado justo a su entrada (Garvía, Barcelona, España). Después del tratamiento de UHPH, el producto se enfrió rápidamente a la temperatura de 4 °C, mediante los intercambiadores situados después de la válvula de alta presión. Se realizó un control de la temperatura del producto en diferentes puntos del sistema mediante las sondas correspondientes, registrándose las temperaturas de entrada (T_i) y salida (T_o) del producto al equipo, así como la temperatura del producto antes de entrar en la válvula de UHPH (T_1) y justo en su salida (T_2) (Figura 3.5).

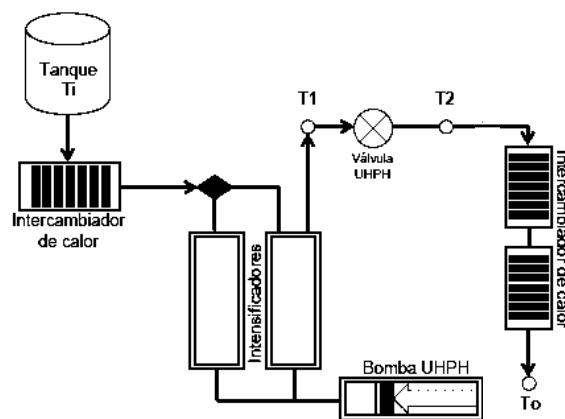


Figura 3.5. Sistema de UHPH de la Planta de Tecnología de Alimentos del CERPTA.

3.4.3. Envasado y almacenamiento

Las horchatas elaboradas se envasaron en botellas PET estériles, con tapón de rosca, de 1 L de capacidad. Los productos pasteurizados y homogenizados a ultra alta presión, a su salida de los respectivos equipos, se recogieron dentro de una cabina de flujo laminar. Todas las horchatas se conservaron en refrigeración (4 °C) y apartadas de la luz solar durante su vida útil, abriéndose las botellas en el correspondiente día de análisis.

3.5. Caracterización físico-química, microbiológica y sensorial de los licuados

3.5.1. Dureza del agua

Para la elaboración de las horchatas se utilizó agua descalcificada de uso alimentario de la Planta Piloto del CERPTA. La dureza del agua se determinó al inicio de cada producción, mediante una valoración complexométrica con el kit analítico Total Hardness H2 (Panreac, Barcelona, España). Los resultados se expresaron en base a miligramos de CaCO₃ por litro de agua.

3.5.2. Composición de los licuados

Capítulos 5 y 6

Para la determinación del extracto seco, grasa y proteína de los licuados se utilizaron los métodos propuestos por la AOAC (AOAC, 2002). Para la conversión del nitrógeno en proteína, se aplicó el factor 6,25. Las medidas se realizaron por triplicado.

Capítulo 7

La composición de los licuados (sólidos totales, grasa y cenizas) se determinó mediante los métodos propuestos por la AOAC (2002). El contenido en nitrógeno se determinó según el método Dumas (FIL-IDF, 2002), aplicando el factor 6,25 para la conversión del nitrógeno en proteína. Las materias extractivas libres de nitrógeno (MELN) se determinaron por diferencia, a partir de los porcentajes anteriores. Los °Brix de las horchatas se determinaron con un refractómetro (Rochester, New York, Estados Unidos), atemperando las muestras, previamente a su lectura, a ~ 20 °C. Para la

determinación cualitativa del almidón se utilizó el kit *Total Starch Assay Procedure (Amyloglucosidase/ α -amylase method)* (K-TSTA 404/2009, Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda).

3.5.3. pH

El pH de los productos se determinó mediante un método potenciométrico (pHmetro Crison micropH 2001, Alella, España), atemperando los licuados, previamente a su lectura, a ~ 20 °C. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.4. Color

El color de las horchatas se determinó de manera similar a lo descrito en el apartado 3.2.3. Las muestras líquidas se depositaron dentro del vaso de medida, y se utilizó el ensamblaje *aro y disco* diseñado por HunterLab, para la medida del color en líquidos translúcidos (HunterLab, 2008). El colorímetro se calibró frente los estándares blanco y negro y se realizaron medidas de los parámetros L^* , a^* y b^* , dentro del espacio de color CIELab, propuesto por la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Se evaluaron las diferencias de color (ΔE^*), el índice de blancura (WI) y el croma (C^*), según las ecuaciones $WI = ((100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ y $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. En el *Capítulo 7*, el parámetro ΔE^* se evaluó tomando de referencia la horchata cruda, y en el *Capítulo 8*, para cada tipo de producto, su correspondiente homólogo a día 1. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.5. Viscosidad

El análisis reológico de las horchatas se efectuó con un reómetro rotacional (Haake Rheo Stress 1, Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania), acoplado a un baño termostático Thermo Haake Phoenix C25P. Para la determinación de la viscosidad, se realizó una curva de flujo a 21°C, mediante la sonda DC60/2° Ti L (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania). El barrido de gradiente de velocidad se realizó de 0,1 a 100 s^{-1} durante un 1 min. Las curvas de flujo se ajustaron a la ley de potencia ($\tau = K\dot{\gamma}^n$), siendo τ el esfuerzo cortante (Pa), K el índice de consistencia ($Pa \times s$), $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación (s^{-1}) y n el índice de comportamiento de flujo. Para el caso de fluidos Newtonianos, $n \sim 1$, por lo que el valor de K coincide con el valor de viscosidad

del producto. Los datos obtenidos se procesaron según el programa Rheowin 3 Job Manager (ThermoHaake GmbH, Alemania). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.6. Oxidación lipídica

La determinación de los compuestos derivados de las reacciones de oxidación primaria en los licuados se realizó según el método propuesto por Ostdal et al. (2000), con algunas modificaciones. Se partió de la mezcla de horchata (4 mL), metanol (4 mL) y cloroformo (8 mL), la cual se agitó durante 30 minutos aproximadamente. Después de su centrifugación ($12000 \times g$, 10 min, 20 °C), 1 mL de la fase de cloroformo se transfirió a un tubo de ensayo, y se mezcló con 1 mL de Fe (II)/tiocianato en metanol/cloroformo (1:1). La disolución se mezcló y se dejó reaccionar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una lectura de absorbancia de la mezcla a 500 nm. Se preparó una curva de calibración según se describe en la norma de la IDF (1991). Los resultados se expresaron como miliequivalentes de peróxido/mL de muestra, según describe Hornero-Méncuez *et al.* (2001). Los análisis se realizaron a día 1, 14 y al final de la vida útil de las muestras. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la determinación de las reacciones secundarias de oxidación de la grasa se consideró la cantidad total de los aldehídos de la horchata. Los aldehídos hexanal, nonanal y octanal se analizaron y cuantificaron por microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, según se describe en el apartado 3.5.14.

3.5.7. Actividad peroxidasa

La actividad de la peroxidasa se determinó mediante el método propuesto por Shindler et al. (1976), con algunas modificaciones. Las muestras (50 μ L para horchata cruda y 100 μ L para las horchatas pasteurizadas y UHPH) se mezclaron con 5 mL de una solución de ABTS 1 mM (ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, EEUU) en tampón fosfato (0,1 M a pH = 6). Se tomó una alícuota de 2,5 mL de la mezcla, a la que se le añadieron 50 μ L de H₂O₂ (5

mM) en el momento previo a la lectura. La actividad del enzima se determinó mediante la lectura de la absorbancia (a 413 nm) de la muestra durante los 5 min iniciales de la reacción, y a temperatura ambiente, con un espectrofotómetro CECIL 9000 (CECIL Instruments, Cambridge, Reino Unido). Los resultados se expresaron en base al incremento de una unidad de absorbancia por minuto, correspondiente a la pendiente de la parte lineal de la curva obtenida, así como también se expresó el porcentaje de actividad residual del enzima después de los tratamientos aplicados de pasteurización y UHPH, en comparación con el producto sin tratar (horchata cruda). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.8. Determinación del tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula se determinó con un equipo Beckman Coulter por difracción laser (LS 13 320 series, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU). Las muestras se diluyeron previamente en agua destilada, para conseguir el porcentaje de obscuración laser apropiado (2-7 %). Se aplicó un modelo óptico basado en la *teoría de Mie* para la dispersión de partículas esféricas, utilizando las siguientes condiciones: índice de refracción real del producto = 1,46 (calculado mediante un refractómetro (Spectronic Instruments, Inc. Rochester, New York, EEUU); índice de refracción del fluido (agua) = 1,332; índice de refracción imaginario = 0; velocidad de la bomba = 20%. La distribución del tamaño de partícula se caracterizó por los parámetros D50 y D90 (diámetro bajo el cual se encuentran el 50 y 90 % de las partículas del producto, respectivamente) y los parámetros $d_{3,2}$ (diámetro medio en relación a la superficie-peso de las partículas) y $d_{4,3}$ (diámetro medio en relación al volumen-peso las partículas, relacionado con la presencia de agregados de partículas en el producto). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5.9. Estabilidad coloidal: Turbiscan™

La estabilidad de las horchatas se determinó a través de la migración con el tiempo de las partículas del producto mantenido en reposo, con un equipo Turbiscan™ Classic MA 2000 (Formulacion, Tolouse, Francia). Las muestras de horchata se transfirieron en recipientes de cristal borosilicato (de 27,5 × 50,0 mm), realizando la lectura hasta una altura de ~ 40 mm. Los recipientes se almacenaron en refrigeración (4 °C) durante

el tiempo en que se realizaron las medidas puntuales de estabilidad. Los resultados se expresaron en base a los cambios en la transmisión de luz en las diferentes partes del recipiente; el incremento de la señal luz refractada en el producto, o más comúnmente denominada *backscattering* (ΔBS), es directamente proporcional a la concentración de partículas, lo que se traduce a la existencia de los fenómenos de desestabilización de sedimentación y cremado en el fondo y la superficie del recipiente, respectivamente (Figura 3.6).



Figura 3.6. Representación de los principales fenómenos de desestabilización (sedimentación y cremado) en bebidas, determinados por el equipo Turbiscan™ Classic MA 2000.

Se utilizó un software específico (Turbisoft 2.0, Formulacion Toulouse, Francia) para calcular el grosor (mm) de las capas formadas en la parte inferior y superior del recipiente durante su conservación en frío, la velocidad de migración de estas partículas ($\mu\text{m}/\text{min}$) y el índice de estabilidad del producto (*Turbiscan Stability Index*, TSI). Este parámetro indica las variaciones detectadas en la muestra dando una idea de la estabilidad de la emulsión en el tiempo. A mayores valores del índice de estabilidad TSI, peor es la estabilidad coloidal del producto.

Las determinaciones se realizaron por triplicado, durante la vida útil microbiológica de los diferentes licuados.

3.5.10. Microscopia confocal

El estudio de la microestructura de las horchatas se realizó mediante microscopía confocal laser, según describe Michalski *et al.* (2002). La matriz proteica se tiñó añadiendo el fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC, Fluka, Steinheim, Germany), reactivo con los grupos amino de las proteínas, péptidos y otras moléculas. Los glóbulos de grasa se tiñeron con *rojo Nilo* (Sigma, Steinheim, Alemania), reactivo que se suele acumular en los glóbulos de grasa, tiñéndolos de rojo. Las muestras de horchata (10 mL) se tiñeron con dos gotas de FITC y tres gotas de *rojo Nilo*. Posteriormente, de 3 a 4 gotas de las muestras se transfirieron a las cavidades cóncavas de los porta, y la cavidad se cubrió con un cubre, sellándose para prevenir la evaporación de la muestra. Las preparaciones se conservaron en refrigeración (4°C) durante un máximo de 3 horas.

El microscopio confocal con el que se realizó este estudio (Leica TCS SP2 AOBS, Heidelberg, Germany) estaba equipado con un objetivo *oil-coupled Leica*, de 63 × y una apertura numérica de 1,4. La fluorescencia de las muestras se excitó a 488 nm, con un laser de argón. Las imágenes se obtuvieron simultáneamente en dos canales (501 a 549 nm y 574 a 626 nm), mediante diferentes cortes a distancia constante de 1,024 × 1,024 píxeles en el plano horizontal x-y, a lo largo del plano z. Se obtuvieron imágenes tridimensionales con la media de la proyección de 4 cortes con el software Leica (Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite 1.8.1.).

3.5.11. Microscopia de transmisión electrónica

El estudio realizado de la microestructura de las horchatas mediante la técnica de microscopía de transmisión electrónica (TEM), se realizó según describe Cruz *et al.* (2007). El licuado de chufa se mezcló con glutaraldehído (concentración final del 3%) en un vial, al cual se le añadió agar de gelificación a baja-temperatura (al 2%) atemperado (tipo VII, Sigma Aldrich), en la proporción 1:1. Los viales se conservaron en refrigeración (4 °C) para la gelificación de la agarosa. Posteriormente, el gel se cortó en cubos de 1 mm³. Se realizaron dos lavados consecutivos de los cubos con una solución tampón de cacodilato de sodio 0,1 M (pH 7,2), durante 30 y 60 min, respectivamente. Posteriormente, la solución se reemplazó y los cubos se sumergieron nuevamente durante 2 h con 1 mL de una disolución al 50% de tetróxido de osmio al

2% y al 50% de tampón cacodilado/HCl. A continuación, la solución se reemplazó por 1 mL de acetato de uranio durante 30 min, después de los cuales los cubos se lavaron con agua desionizada previamente a su deshidratación. La deshidratación de los cubos se realizó mediante sucesivos lavados con etanol (50, 70 y 90% durante 5, 30 y 180 min., respectivamente).

Las muestras se fijaron en resina Eponate 12TM (Ted Pella Inc., Redding, California, EEUU) y se polimerizaron a 60 °C durante 48 h. Se cortaron secciones semifinas de los cubos (0,03 - 0,05 µm de grosor) con un microtomo Reichert Ultracut, y se colocaron en rejillas de cobre. Las muestras se tiñieron con las soluciones convencionales de Reynolds de uranil acetato y citrato de cobre, durante 30 min. Finalmente, las secciones pasaron a ser observadas con un microscopio de transmisión electrónica (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) equipado con una cámara Gatan Ultrascan ES1000 CCD (EEUU).

3.5.12. Análisis microbiológicos

Para la realización de los análisis microbiológicos, se prepararon las diluciones decimales correspondientes, en agua de peptona, de las muestras de horchata a analizar.

Los análisis microbiológicos que se realizaron se exponen a continuación:

- Recuento total de microorganismos mesófilos aerobios en medio PCA (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK), incubado durante a 30 °C durante 48 h.
- Recuento total de microorganismos psicrótrofos en medio PCA (Oxoid), incubado durante a 21°C durante 72 h.
- Enterobacterias en agar Bilis Rojo Violeta Glucosado (VRBG, Oxoid), incubado a 37 °C durante 24 h.
- Coliformes y *E.coli*, en medio BrillianceTM *E.coli* / Coliform Selective Medium (Oxoid), incubado a 37 °C durante 24 h.
- Lactobacilos en agar Rogosa (Oxoid) incubado a 30 °C durante 72 h.
- Recuento de esporas mesófilas aerobias en medio PCA (Oxoid), incubado a 30 °C durante 48 h. Previamente a la preparación de las diluciones decimales, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico de 80 °C, durante 10 min, y posterior enfriamiento en agua helada (Westhoff, 1981).
- Hongos y levaduras en medio rosa de bengala con cloramfenicol (Oxoid), incubado a 25 °C durante 5 días.

La metodología utilizada para la realización de estos análisis fue la descrita por la ICMSF (ICMSF, 1999). Las cinéticas de crecimiento de los microorganismos psicrótrofos se caracterizaron mediante el programa DMFIT, versión 2.1 (<http://modelling.combase.cc/DMFIT.aspx>), del “Institute of Food Research” (Norwich, Reino Unido). Mediante este programa se estimó la fase de latencia (fase lag) y la velocidad máxima de crecimiento (μ máx) de los microorganismos.

3.5.13. Análisis sensorial

Para la realización de la evaluación sensorial de los licuados se realizaron tres test diferentes.

Selección del panel catador. Se seleccionaron diez jueces entrenados de entre el personal del Departamento de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona, con experiencia previa en la evaluación sensorial de licuados vegetales. La mayor parte de ellos eran consumidores del licuado horchata de chufa.

Test descriptivo: Se realizó un test descriptivo de los diferentes licuados, en el que se evaluaron los atributos de color (intensidad de amarillo), olor (intensidad, tostado/cocido, extraños), cuerpo (viscosidad, sensación acuosa, presencia de partículas) y sabor (intensidad, dulzor, tostado/cocido, metálico, extraños) (ver *Anexo I*). Los jueces evaluaron las diferencias existentes entre las características de la horchata cruda (la cual fue considerada como control) y las horchatas procesadas, mediante una escala de nueve puntos (- 4 a 4), en la que - 4 = muy diferente, menor intensidad, 0 = no diferente, 4 = muy diferente, mayor intensidad, respecto a la muestra control.

Test hedónico de ordenación: Las horchatas caracterizadas en el apartado anterior se ordenaron por orden de preferencia, según una escala hedónica de seis puntos.

Test hedónico de puntuación: En este ensayo, los jueces valoraron la aceptación global de las diferentes horchatas de manera independiente. Los licuados se dieron a probar en momentos independientes y de manera aleatoria, de manera que cada juez expresó su grado de aceptación de cada una de las horchatas descritas evaluadas en los ensayos anteriores. Según la aceptación recibida, cada horchata recibió una puntuación, dentro

de una escala de nueve puntos: 9 (me gusta muchísimo), 8 (me gusta mucho), 7 (me gusta moderadamente), 6 (me gusta ligeramente), 5 (ni me gusta ni disgusta), 4 (me desagrada ligeramente), 3 (me desagrada moderadamente), 2 (me desagrada mucho) y 1 (me desagrada muchísimo).

Los test se realizaron en los días 3, 14, 21, 28 y 55 de la vida útil de las horchatas. Para la realización de las catas, solamente se tuvieron en consideración los licuados que presentaban unas características microbiológicas acordes con la legislación. Se preparó horchata de chufa cruda, como producto control, el día anterior de realización de las catas.

3.5.14. Determinación del perfil volátil

Los análisis relacionados con la optimización del método analítico de extracción e identificación de los compuestos volátiles de las horchatas se realizaron a partir de una horchata de chufa comercial tipo UHT obtenida en un mercado local, de composición estándar comercial (agua, chufas, azúcar, emulsionante, proteína láctea, antioxidante y aromatizantes).

Para la realización del estudio del efecto de los tratamientos de pasteurización convencional y UHPH sobre el perfil volátil de la horchata de chufa, se utilizaron las horchatas elaboradas y procesadas en este trabajo de tesis. Se realizaron diferentes análisis del perfil volátil de las horchatas durante su conservación en refrigeración, correspondientes al inicio, medio y final de su vida útil (día 1 para la horchata cruda, días 1, 14 y 21 para las horchatas P1 y P2, días 1, 14 y 30 para la horchata homogenizada a 200 MPa y días 1, 14, 30 y 54 para la horchata homogenizada a 300 MPa).

3.5.14.1. Optimización del método de extracción

Los diferentes compuestos volátiles fueron aislados mediante la técnica de microextracción en fase sólida o SPME, en la que la fase sólida o fibra se expone en un espacio hermético en el que coexiste con la muestra. Los viales que se utilizaron en este estudio tuvieron una capacidad de 10 mL. La extracción de los compuestos volátiles se

realizó sumergiendo los viales en un baño precalentado y en constante agitación de la muestra (agitación magnética a 700 rpm).

3.5.14.2. Selección de la fibra

En este estudio se probaron cuatro tipos de recubrimiento de fibra diferentes: PDMS/DVB (polidimetilsiloxane/divinil benzeno, 65 $\mu\text{m} \times 10 \text{ mm}$), CAR/PDMS (carboxeno/polidimetilsiloxane, 85 $\mu\text{m} \times 10 \text{ mm}$), PA (poliacrilato, 85 $\mu\text{m} \times 10 \text{ mm}$) y DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxane, 50/30 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Las fibras se acondicionaron diariamente antes de su utilización, según las recomendaciones del fabricante. La selección de la fibra más óptima se realizó según los resultados obtenidos de diferentes extracciones (tres extracciones diferentes por cada tipo de fibra), las cuales se realizaron bajo las siguientes condiciones: 4 mL de volumen de muestra, 10 min de tiempo de equilibrio, 60 min de tiempo de extracción y 40 °C de temperatura de extracción.

3.5.14.3. Diseño experimental multifactorial para la optimización de las condiciones de extracción

Una vez seleccionado el recubrimiento de extracción de fibra más óptimo, se procedió al establecimiento de las condiciones óptimas de extracción de los volátiles de la horchata en el espacio de cabeza. Se estableció un diseño experimental de tres variables, a dos niveles. Las variables fueron el volumen de muestra utilizado en la extracción (2 o 4 mL), la temperatura de extracción (40 o 60 °C) y la fuerza iónica del medio mediante la adición de NaCl a la muestra hasta su nivel de saturación (peso/volumen). El tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza para la extracción de los compuestos volátiles se fijó en 60 min. En todos los experimentos realizados se añadió a la muestra de horchata 3 μL de un estándar interno (4-metil-2-pentanol, en metanol (Sigma-Aldrich)). Previamente a la exposición de la fibra, la muestra se equilibró durante un tiempo de 10 min a la misma temperatura de extracción, y en constante agitación (700 rpm, con agitador magnético). Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Los parámetros considerados óptimos se seleccionaron teniendo en consideración el perfil obtenido de compuestos volátiles, el número de picos en el cromatograma y, especialmente, la suma total de las áreas de los picos.

3.5.14.4. Extracción de los compuestos volátiles de las horchatas cruda, pasteurizadas y UHPH

Para la extracción de los compuestos volátiles en las horchatas cruda, pasteurizadas P1 y P2 y homogenizadas a ultra alta presión (200 y 300 MPa), se utilizaron las condiciones de extracción consideradas óptimas obtenidas en el punto anterior. La fibra que se utilizó fue la DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxane, Supelco, 50/30 μm x 20 mm). Se partió de un volumen de 4 mL de muestra, en el que se le añadieron 3 μL del estándar interno 4-metil-2-pentanol (5 ppm, en metanol). Previamente a la exposición de la fibra, la muestra se equilibró durante un tiempo de 10 min a 60 °C y en constante agitación (700 rpm, con agitador magnético). Posteriormente, a esta misma temperatura, la fibra se expuso al espacio de cabeza del vial durante un tiempo de 60 min.

3.5.14.5. Análisis CG-MS

La separación e identificación de los compuestos volátiles de este estudio se realizó mediante un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890, acoplado a un espectrofotómetro de masas 5975 MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Se utilizó una columna capilar tipo J&W HP-INNOWAX (60 m x 0,251 mm x 0,25 μm), recubierta de la fase estacionaria polietilen glicol. Los compuestos volátiles se desadsorbieron en la boca de inyección del equipo, en el modo *splitless* y a 250 °C, durante un tiempo de 3 min, aunque la fibra se mantuvo en el puerto de inyección durante un total de 15 min para su correcto lavado. Se utilizó el gas helio como gas portador, a una velocidad de 1 mL/min (25,641 cm/s). La temperatura inicial de la columna fue de 40 °C durante 5 min, y posteriormente, esta incrementó hasta los 220 °C según la relación 10 °C/min, durante un tiempo total de 10 min.

3.5.14.6. Identificación y caracterización de los compuestos volátiles

Se realizó una identificación tentativa de los compuestos volátiles obtenidos mediante la comparación de su espectro de masas con los espectros de masas de la librería Wiley 7NL. Adicionalmente, también se calcularon los índices de retención lineales de los hidrocarburos alifáticos C₈ hasta C₁₂, disueltos en metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, EEUU) y C₉ hasta C₃₆, disueltos en cloruro de etileno (Restek, Bellafonte, PA, EEUU), a partir de los cuales se calcularon los correspondientes índices de retención de Kovatz (o índice de retención) de los compuestos analizados, y se compararon con los existentes en la literatura. Se utilizaron diferentes estándares internos para confirmar la identificación de ciertos compuestos volátiles. La cuantificación de los compuestos volátiles detectados se realizó expresando los resultados en base al estándar interno inyectado en la muestra, como nanogramos de 4-metil-2-pentanol por mililitro de horchata de chufa.

El límite de cuantificación (LOQ) es la menor cantidad de un analito cuya señal puede ser distinguida de la del ruido. En este estudio, los LOQ se calcularon a partir de la suma de 10 áreas correspondientes al ruido detectado en 10 cromatogramas diferentes, en diferentes blancos obtenidos en días varios. El valor de LOQ se obtuvo de la relación del valor medio de estas áreas más diez veces la desviación estándar de los valores obtenidos.

La linealidad del método se verificó a partir de soluciones estándar de hexanal, 4-metil-2-pentanol, 2-pentilfurano, 2-nonanona y benzaldehído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), en las concentraciones comprendidas entre los 0,1 y 0,5 ppm. Se calculó la desviación estándar relativa (% RSD) de cada analito, después de 5 determinaciones de cada uno de ellos. En este estudio, tan solo se tuvieron en consideración los compuestos con un % RSD inferior al 10%.

3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los capítulos de esta tesis se trataron a través del análisis de varianza (ANOVA), utilizando el modelo GLM mediante el programa estadístico Statgraphics (Statgraphics Inc., Chicago, IL, USA). Para determinar las diferencias entre los valores obtenidos se realizó el test de Tukey. Las evaluaciones se establecieron bajo un nivel de significación de $P < 0,05$. En el Capítulo 8, el análisis de componentes principales (o PCA) se realizó con el programa R (R software, Nueva Zelanda). En los Capítulos 7 y 9, para los datos obtenidos en el análisis sensorial (test hedónicos) se calculó la media, la moda y la frecuencia relativa de los valores obtenidos. Para el análisis de la significancia de las medias obtenidas se procedió como se ha descrito previamente.

Capítulo 4

Estudio comparativo de cuatro tipos de chufa (Cyperus esculentus L.) de diferente origen geográfico. Características físico-químicas, fraccionamiento proteico y caracterización de las fracciones aisladas.

Estudio comparativo de cuatro tipos de chufa (*Cyperus esculentus* L.) de diferente origen geográfico. Características físico-químicas, fraccionamiento proteico y caracterización de las fracciones aisladas

4.1. Introducción

Las chufas (*Cyperus esculentus* L.) son pequeños tubérculos procedentes de las raíces de una planta herbácea denominada bajo el mismo nombre, la cual se cultiva en abundancia en diferentes países mediterráneos (Coşkuner *et al.*, 2002). A diferencia de otros tubérculos, las chufas aportan una alta cantidad de energía (~ 400-450 kcal/100 g), principalmente debido a su contenido en almidón y grasa (26-30% y 21-25%, respectivamente). La mayor parte de los ácidos grasos del aceite de chufa son de naturaleza monoinsaturada (> 60%), por lo que el perfil de su aceite es muy similar al de los aceites de oliva o nuez (Dubois *et al.*, 2007). Estos tubérculos también presentan un buen porcentaje en proteína (3-8%) y fibra (8-10%), así como destaca en su composición la presencia de vitaminas (E y C) y minerales (fosforo y potasio) (Adejuyitan, 2011; Arafat *et al.*, 2009; Bosch *et al.*, 2005; Chukwuma *et al.*, 2010; Enyinnana *et al.*, 2009; Tigernuts Traders S.L., 2014).

Por su composición y perfil nutricional, el consumo de chufas se ha relacionado con diferentes beneficios para la salud, como son la prevención de enfermedades coronarias, el buen funcionamiento del sistema digestivo y su idoneidad para la población diabética y deportista (Borges *et al.*, 2008; Chukwuma *et al.*, 2010; Tigernuts Traders, 2014). Actualmente, estos tubérculos se pueden consumir como *snacks*, su harina se ha añadido exitosamente en diferentes productos de panificación, bollería y derivados cárnicos, así como también se ha utilizado como agente aromatizante en algunos helados (Sánchez-Zapata *et al.*, 2012). La principal aplicación de este tubérculo es la obtención de licuados vegetales, bebidas no alcohólicas típicas de las regiones del Mediterráneo. En Valencia destaca la conocida *horchata de chufa*, licuado tradicional refrescante y de sabor dulce cuyo consumo en la península data del siglo XIII. En África, también encontramos diferentes bebidas en base a este tubérculo, conocidas bajo el nombre de *Kunun aya* (Tigernuts Traders S.L., 2014).

Actualmente el mercado de la chufa está ganando cada vez más importancia, entre otros, debido al crecimiento de la producción y exportación del licuado *horchata de chufa* a diferentes países del mundo (CRCHV, 2014; Sánchez-Zapata *et al.*, 2012; Tigerntus Traders S.L., 2014). Las principales regiones productoras de chufas (españolas y africanas) han devenido grandes exportadoras de este tubérculo, compitiendo entre ellas por la calidad y el precio de las partidas de chufa que ponen a disposición de la industria alimentaria europea. Diferentes estudios han evidenciado la importancia de las características de las chufas (físico-químicas y de composición) en la elaboración de productos derivados de gran calidad (Sánchez-Zapata *et al.* 2012), pero aunque la mayor parte de los lotes que se comercializan están previamente caracterizados, en algunos casos, y dependiendo del origen de los tubérculos, estas partidas quedan sin tipificar (Belewu, 2007).

Por ello, el **objetivo** de este trabajo fue comparar las características de calidad de cuatro partidas de chufa procedentes de diferente origen geográfico (Valencia-España, Burkina Faso-África y Níger-África), las cuales actualmente se comercializan en el mercado europeo para la elaboración de productos derivados. Para ello, se (1) evaluaron las características físico-químicas peso, forma, color superficial, composición (humedad, proteína, grasa, fibra, cenizas y MELN) y factores antinutricionales (fitatos y taninos) de los tubérculos (ver *Capítulo 3, apartado 3.2*). También (2) se realizó una caracterización de sus fracciones proteicas según su solubilidad y se caracterizaron los polipéptidos de las fracciones aisladas por electroforesis SDS-PAGE (ver *Capítulo 3, apartado 3.2*), una información que actualmente es escasa y que podría suponer un punto de partida para la obtención de nuevos ingredientes para la industria alimentaria.

4.2. Resultados y discusión

La Figura 4.1 muestra una imagen representativa de las diferentes variedades de chufa caracterizadas en este estudio. Destacar que en el momento de su recepción, las partidas de chufa de procedencia africana (CHB1, CHB2 y CHN) presentaron unos niveles de contaminación inicial (piedras, arena, restos de raíces, chufas dañadas, cáscaras de otros granos, etc.) muy superiores a los de las chufas valencianas (CHV), las cuales llegaron a nuestras instalaciones prácticamente sin impurezas.



Figura 4.1. Imagen de las chufas valencianas – CHV (A), nigerianas – CHN (B) y burkineanas – CHB1 (C) y CHB2 (D) caracterizadas en este estudio.

4.2.1. Caracterización física

4.2.1.1. Forma

La Tabla 4.1 muestra los valores obtenidos en la clasificación de las chufas según su forma. Como se puede observar, los sacos de chufa presentaron una mezcla de chufas redondas, ovaladas y alargadas, siendo las chufas redondas las predominantes en todos los casos. En general, éstas agruparon cerca de la mitad de los tubérculos en los distintos sacos de producto (~ 50-72% del total), mientras que las de forma alargada y ovalada les siguieron en importancia con un ~ 13-28% y ~ 16-27% del total, respectivamente.

Para un mismo tipo de chufa, se obtuvieron diferentes medidas de longitud (Lg) y grosor (G) de los tubérculos; el grosor de las chufas varió entre los 5,70 y 9,05 mm, mientras que su longitud osciló entre los 7,10 y 14,37 mm. Las chufas que presentaron mayor tamaño fueron las valencianas, mientras que las africanas presentaron valores de longitud y grosor más parecidos entre sí. Estos valores correspondieron con los descritos previamente por Morell *et al.* (1983) en sus estudios realizados con chufas de origen valenciano. Destacar que según lo expuesto en la Denominación de Origen *Chufa de Valencia*, las chufas valencianas analizadas en este estudio cumplirían con las

dimensiones preestablecidas (longitud y grosor correspondiente a 0,9-1,6 y 0,7-1,1 cm, respectivamente) estando dentro de la categoría de *chufas secas granza*.

Tabla 4.1. Longitud (Lg), grosor (G) y chufas de cada forma/saco (%).

Tipo ³	Forma ²	Longitud ¹ (mm)	Grosor ¹ (mm)	% por saco
CHV	Alargada	14,37 ^a ± 1,59	8,21 ^a ± 1,95	25,67 ^y ± 2,08
	Ovalada	11,58 ^a ± 1,18	8,41 ^a ± 1,77	27,00 ^y ± 1,01
	Redonda	10,00 ^a ± 1,28	9,05 ^a ± 1,49	51,33 ^x ± 2,21
CHB1	Alargada	9,66 ^c ± 0,12	5,77 ^b ± 0,62	27,00 ^y ± 1,00
	Ovalada	9,29 ^b ± 0,88	6,49 ^c ± 0,65	22,01 ^y ± 2,00
	Redonda	7,62 ^c ± 0,11	7,48 ^c ± 0,88	49,79 ^x ± 2,16
CHB2	Alargada	12,03 ^b ± 0,94	7,61 ^a ± 1,22	13,33 ^y ± 1,53
	Ovalada	8,92 ^b ± 0,76	7,66 ^b ± 1,01	16,33 ^y ± 0,58
	Redonda	8,91 ^b ± 0,72	8,06 ^b ± 0,89	70,67 ^x ± 1,53
CHN	Alargada	9,05 ^c ± 0,11	5,70 ^b ± 0,65	28,00 ^y ± 2,02
	Ovalada	11,19 ^a ± 0,10	6,45 ^c ± 0,79	23,44 ^z ± 1,53
	Redonda	7,10 ^d ± 0,15	7,88 ^b ± 0,11	49,33 ^x ± 0,57

¹ Media ± desviación estándar.

² Según la relación propuesta por Morell *et al.* (1983).

³ CHV: Chufas de Valencia; CHB1 y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger.

^{a-d} Para cada forma, valores en la misma columna con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

^{x-z} Para cada tipo de chufa, valores en la misma columna con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Relacionando el tamaño de las chufas con su forma, en todos los casos se observó que las chufas alargadas fueron las que presentaron mayores dimensiones (Tabla 4.1). Djomdi *et al.* (2007) y Ejoh *et al.* (2006) estudiaron la influencia del tamaño de las chufas sobre su cinética de hidratación. Estos autores observaron que el ratio de absorción de agua era inversamente proporcional al tamaño del tubérculo, mientras que a temperatura de hidratación ≥ 80 °C, el equilibrio hídrico se conseguía en el mismo período de tiempo, cualesquiera que fuera la dimensión del grano. Por ello, la caracterización del lote de chufas según su forma constituiría un parámetro de interés para la industria horchatera, para la optimización del tiempo de hidratación de los tubérculos en la elaboración de bebidas en base a chufa. A su vez, esta información también sería de utilidad para el diseño de los equipamientos para el procesado y

almacenamiento de los tubérculos, en el cual las características físicas de los granos que se procesan es una premisa clave.

4.2.1.2. Peso

El peso medio determinado en los tubérculos se expone en la Tabla 4.2. Como se observa, este parámetro es muy variable entre chufas del mismo tipo (o forma), lo que no es de extrañar debido a que sus dimensiones también lo son.

Tabla 4.2. Peso de las chufas analizadas.

Forma	Peso (g) ^{1,2}			
	CHV	CHB1	CHB2	CHN
Mix ³	0,40 ^a ± 0,16	0,27 ^{bc} ± 0,07	0,25 ^c ± 0,02	0,30 ^b ± 0,74
Alargada	0,51 ^{ax} ± 0,17	0,29 ^{bx} ± 0,07	0,27 ^{bx} ± 0,09	0,30 ^{bx} ± 0,08
Ovalada	0,39 ^{ay} ± 0,15	0,25 ^{by} ± 0,05	0,26 ^{bx} ± 0,06	0,24 ^{by} ± 0,09
Redonda	0,36 ^{ay} ± 0,15	0,25 ^{cy} ± 0,07	0,23 ^{cx} ± 0,07	0,30 ^{bx} ± 0,06

¹ CHV: Chufas de Valencia; CHB1 y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger.

² Media ± desviación estándar.

³ Mezcla de chufas de diferente forma.

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias ($P < 0,05$).

^{x-z} Para cada tipo de chufa, valores en la misma columna con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los pesos unitarios medios de los tubérculos oscilaron entre 0,27 y 0,51 g en las chufas alargadas, 0,24 y 0,39 g en las ovaladas y 0,23 y 0,36 g en las redondas, siendo en general las chufas alargadas las más pesadas. El peso de los tubérculos depende de su grosor, y para un mismo grosor este incrementa a razón de su longitud. Esto explicaría que las chufas valencianas fueran las más pesadas (con un peso medio de ~ 0,40 g), ya que también fueron las más grandes. Las chufas africanas presentaron pesos unitarios inferiores, y más parecidos entre sí, ya que sus dimensiones también fueron similares. La chufa nigeriana presentó un peso medio de ~ 0,30 g, a la que le siguieron las chufas CHB1 y CHB2, con un peso medio de ~ 0,27 y ~ 0,25 g, respectivamente. Cabe tener en cuenta que el peso del grano también aumentará a razón de su contenido en humedad, por lo que los tubérculos con mayor cantidad de agua tienden a ser los más pesados (*ver contenido en humedad de los tubérculos en Tabla 4.4*).

4.2.1.3. Color

Las coordenadas de color determinadas en los tubérculos se exponen en la Tabla 4.3. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los parámetros de luminosidad (L^* , blanco-negro), a^* (rojo-verde) y b^* (azul-amarillo) de las diferentes chufas. Las chufas burkineanas CHB1 y CHB2 fueron las que presentaron valores de L^* (más blanco), a^* (más rojo) y b^* (más amarillo) más elevados, no presentando grandes diferencias entre ellas. Por el contrario, los valores más bajos en las tres coordenadas triestímulo se observaron en las chufas de origen valenciano. Los valores obtenidos en los parámetros de luminosidad y a^* en las chufas CHN no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0,05$) en comparación con los obtenidos en las chufas CHV, aunque el valor del parámetro b^* en CHN fue superior.

Tabla 4.3. Parámetros de color de la piel de las chufas.

Tipo ¹	Parámetros de color ^{1,2}			ΔE^*
	L^*	a^*	b^*	
CHV	37,58 ^b ± 0,79	9,80 ^c ± 0,48	10,03 ^c ± 1,35	-
CHB1	43,31 ^a ± 0,61	11,33 ^a ± 0,08	22,38 ^a ± 0,46	6,23 ^a ± 0,75
CHB2	44,18 ^a ± 0,79	10,75 ^b ± 0,13	21,18 ^a ± 0,30	7,02 ^a ± 0,79
CHN	37,81 ^b ± 0,22	10,37 ^{bc} ± 0,27	17,15 ^b ± 0,29	2,00 ^b ± 0,25

¹ Media ± desviación estándar. CHV: Chufas de Valencia; CHB1 y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger.

^{a-d} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

A simple vista, las cuatro variedades de chufas se pudieron clasificar en dos grupos principales: las más claras o amarillas (CHB1 ~ CHB2) y las más oscuras o marrones (NTN > VTN). Estas ligeras diferencias de color entre chufas se evidenciaron a través del parámetro ΔE^* , el cual indica diferencias de color entre las chufas valencianas CHV y el resto. Según estos valores (Tabla 4.3.), el color global de las chufas CHN fue el más similar al de las CHV, mientras que no se observaron diferencias de este parámetro entre los tubérculos burkineanos, los cuales fueron los más diferentes en comparación al control CHV.

Todo ello evidenció nuevamente la variabilidad de color en la piel de las chufas del mercado. En algunas aplicaciones (como por ejemplo en la fabricación de *snacks* o harina de chufa), los tubérculos suelen someterse a un ligero pelado en el que también

se eliminan las raicillas de la parte inferior del grano, por lo que los productos resultantes son más claros que originariamente, de color más homogéneo y mejor valorados por el consumidor final. También en la elaboración de licuados en base a chufas se suele pelar el tubérculo previo a su molturación, para eliminar un exceso de fibras insolubles en el licuado final, las cuales sedimentarán en el fondo del envase con el reposo del producto.

4.2.2. Caracterización química

4.2.2.1. Composición nutricional

Los resultados obtenidos en el análisis de la composición de los tubérculos se exponen en la Tabla 4.4. Aunque se observan ligeras diferencias entre el contenido en proteína y grasa de los tubérculos, todas las chufas presentaron un perfil nutricional similar, caracterizado por los componentes principales MELN y grasa (con un 45,05-58,66% y 25,35-35,21%, respectivamente). Estos resultados explicarían que las chufas se consideren un producto altamente energético (~ 400-450 kcal/100g), especialmente si se comparan con otros tubérculos como son la patata (*Solanum tuberosum*) o la batata (*Ipomea batatus*), cuyos contenidos energéticos son de ~ 71 y 100 kcal/100 g, respectivamente (Enyinnana *et al.*, 2009; Farran *et al.*, 2003; Tigernuts Traders, S.L., 2014).

Todas las chufas presentaron contenidos muy bajos en humedad (6,38-8,66%). De hecho, era de esperar que presentaran porcentajes de humedad de ~ 10%, ya que una vez recolectados, los tubérculos se someten a una etapa de secado que es fundamental para garantizar su conservación durante su expedición y almacenaje. Este bajo contenido en humedad enfatiza la importancia de la operación de hidratación de las chufas en la elaboración de licuados vegetales. En este proceso, la rehidratación del grano es fundamental para facilitar su molturación, así como para optimizar la difusión de los nutrientes del grano hacia el extracto acuoso (Ejoh *et al.*, 2006).

Las MELN constituyeron el componente principal en todas las muestras que se analizaron (Tabla 4.4.). Los porcentajes determinados en las diferentes chufas fueron: CHB2 = CHN > CHB1 > CHV. El contenido en carbohidratos en las chufas está determinado por su variedad y estado de germinación (Coşkuner *et al.*, 2002). Morell *et*

al. (1983) observaron que, en las chufas, el ~ 65% de los carbohidratos del tubérculo correspondían a almidón, el cual constituye el principal carbohidrato del tubérculo. En este estudio, los porcentajes medios de fibra bruta que se obtuvieron presentaron valores similares, comprendidos entre el 8,42 y 9,31%. Las chufas CHV y CHB1 presentaron los contenidos en fibra bruta más elevados, similares a los descritos previamente por otros autores; Karababa *et al.* (2001) destacaron contenidos de fibra bruta del 5-13% en chufas de origen africano y Coşkuner *et al.* (2002) obtuvieron valores medios del ~ 8,91% en este componente, en chufas procedentes de Turquía. En cuanto al contenido en fibra dietética, las chufas CHN, CHB1, CHB2 y CHV presentaron unos porcentajes del $18,52 \pm 0,50$, $21,00 \pm 0,42$, $25,84 \pm 1,57$ y $27,77 \pm 0,01\%$, respectivamente. Se conoce que la fibra dietética de las chufas tiene un buen perfil para su aplicación en diferentes productos alimentarios. Sánchez-Zapata *et al.* (2010) destacaron el potencial del residuo sólido, rico en fibra, obtenido en el proceso de elaboración de horchata de chufa como ingrediente potencial para la elaboración de diferentes derivados cárnicos, entre los que destacó las salchichas curadas de cerdo o las hamburguesas.

Tabla 4.4. Composición (% en base seca) de las chufas.

Componentes mayoritarios	Chufas ^{1,2}			
	VTN	B1TN	B2TN	NTN
Humedad	8,66 ^a ± 0,04	7,75 ^b ± 0,27	6,38 ^c ± 0,45	7,45 ^b ± 0,31
Grasa	35,21 ^a ± 3,07	25,77 ^c ± 0,77	25,35 ^c ± 1,85	28,19 ^b ± 0,37
Proteína	8,45 ^a ± 0,20	7,32 ^b ± 0,20	5,62 ^c ± 0,09	3,28 ^d ± 0,10
MELN	45,05 ^c ± 3,13	55,94 ^b ± 0,91	58,66 ^a ± 1,82	58,19 ^a ± 0,76
Fibra	9,31 ^a ± 0,09	9,07 ^{ab} ± 0,21	8,42 ^c ± 0,15	8,75 ^{bc} ± 0,59
Cenizas	1,97 ^a ± 0,01	1,90 ^a ± 0,04	1,95 ^a ± 0,16	1,60 ^b ± 0,02

¹ Media ± desviación estándar.

² CHV: Chufas de Valencia; CHB1y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger.

^{a-d} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El contenido medio de grasa de todas las variedades de chufa estuvo comprendido entre el 25,35 y 35,2%. En comparación con otros tubérculos, el contenido en grasa de la chufa destaca por su cantidad, ya que la mayoría de tubérculos suelen presentar contenidos en grasa < 1% (Farran *et al.*, 2003). La chufa procedente de Valencia fue la más grasa (~ 35%), presentando unos valores dentro de lo establecido por la DO *Chufa*

de Valencia, mientras que los tubérculos procedentes de Burkina Faso (CHB1 y CHB2) presentaron los porcentajes en grasa más bajos (25,35 y 25,77%, respectivamente), no mostrando diferencias significativas entre ellas ($P < 0,05$). Estos valores evidenciaron nuevamente el alto contenido en grasa de las chufas en comparación a otros tubérculos (0,13% en el yacon, 0,16% en la patata o 0,30% en la mandioca) (Adekanmi *et al.*, 2009; Farran *et al.*, 2003; Lombardo *et al.*, 2012; Maives *et al.*, 2012; Scher *et al.*, 2009).

El aceite que se extrajo de las chufas se caracterizó por presentar una coloración amarilla-clara y un aroma suave. El perfil de este aceite se caracteriza por su contenido en ácidos grasos insaturados (~ 83%), similar al descrito en los aceites de oliva (~83%), maíz (~83%) o soja (82%), con predominio de los ácidos grasos oleico, palmítico y linoleico (Coşkuner *et al.*, 2002; Hunter, 2001; Kim *et al.*, 2007; Linssen *et al.*, 1988). Tanto la variedad como la zona de cultivo tendrán una influencia significativa en las diferentes fracciones del aceite de chufa, por lo que recientemente se ha demostrado que el perfil del aceite de la chufa se podría utilizar como marcador de autenticidad geográfica del tubérculo (López-Cortés *et al.*, 2013). Por todo ello, este subproducto ha sido recientemente revalorizado para diferentes aplicaciones, como por ejemplo, en la industria alimentaria para procesos de cocción o propósitos nutricionales, así como también en la elaboración de productos cosméticos y fármacos en las industrias química y farmacéutica (Sánchez-Zapata *et al.*, 2012). Yeboah *et al.* (2012) describieron que el aceite de chufa también contiene moderadas cantidades de fitoesteroles (~ 0,5-0,6 g/g aceite), lo que a la vez optimiza el valor nutricional de este subproducto.

El porcentaje en proteína de las chufas fue el parámetro que más variabilidad presentó entre partidas (3-8,5%). Ejoh *et al.* (2006) describieron la variabilidad entre el contenido proteico de diferentes chufas en función de su origen y variedad (6,57-8,30%). Enyinnana *et al.* (2009) también destacaron la variabilidad del contenido en proteína de la chufa en función de su estado de germinación (de 8,23-12,40%), principalmente debido a la relación de este componente respecto a los contenidos de carbohidratos y grasa del grano. La chufa valenciana fue la más rica en proteína (8,45%), dentro de lo establecido por la DO *Chufa de Valencia*, seguida por las chufas burkineanas (7,32 y 5,62% para CHB1 y CHB2, respectivamente) y los tubérculos procedentes de Níger ($\leq 4\%$).

En comparación con otros tubérculos, el contenido en proteína de las chufas es alto. En el taro (*Colocasia esculenta*), la mandioca o el ñame (*Dioscorea spp.*), los porcentajes de proteína están comprendidos entre el 0,5 - 3% (Abara, 2011; Linssen *et al.*, 1988; Maives *et al.*, 2012). Las proteínas de los tubérculos tienen la función principal de reserva de nitrógeno, carbono y sulfuro para permitir el crecimiento y germinación de la planta en períodos en que las condiciones son adversas. A parte, algunas de las proteínas de los tubérculos tienen una doble funcionalidad, contribuyendo tanto a la resistencia del tubérculo al estrés biótico como abiótico. Entre otras, algunas de las funcionalidades de estas proteínas se relacionan con actividades biológicas de protección del tubérculo frente a agentes patógenos, así como destaca también su papel frente a inhibidores de enzimas digestivos como son la tripsina o la quimotripsina (Shewry, 2003). Finalmente, destacar que estudios previos describen el limitado valor biológico de las proteínas de la chufa, si se comparan las proporciones de los aminoácidos esenciales de su proteína con la pauta recomendada con la FAO/OMS. La arginina es el aminoácido más abundante, seguido en importancia por los ácidos aspártico y glutámico (Sánchez-Zapata *et al.*, 2012).

El contenido en cenizas de las diferentes chufas que se estudiaron fue el que más similitud presentó, cuyos valores fueron a la vez muy parecidos a los descritos en la bibliografía en este tipo de tubérculo (Lombardo *et al.*, 2012; Scher *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 1984). En comparación con otros tubérculos, las chufas presentaron unos contenidos en cenizas similares a los de la mandioca (1-2,4%) o el boniato (0,66-1,98%), pero muy inferiores a los descritos en otros tubérculos como la patata (de hasta ~ 6%). La chufa de Níger fue la que presentó el contenido más bajo en cenizas (1,60%), mientras que las otras presentaron contenidos ligeramente más elevados en este componente (1,90-1,97%), pero estadísticamente no diferentes ($P < 0,05$) entre ellos. Estos resultados coincidieron con lo descrito por Valls *et al.* (1980), quienes caracterizaron la chufa como un tubérculo rico en potasio (0,55%) y fósforo (0,20%). Todo ello repercute en que nutricionalmente, las bebidas elaboradas en base a este tubérculo se consideren ricas en minerales (Tigernuts Traders S.L., 2014).

4.2.2.2. Componentes antinutricionales

En este estudio, todas las chufas presentaron unos contenidos bajos en los componentes antinutricionales taninos y fitatos (Tabla 4.5). Estos componentes destacan por su papel en la limitación de la biodisponibilidad de algunos nutrientes en el tracto intestinal, disminuyendo su absorción (Chukwuma *et al.*, 2010). En este estudio, el contenido en taninos de los tubérculos osciló entre los ~ 0,08-0,19%, siendo el más elevado y el más bajo el obtenido en los tubérculos CHB2 y CHV, respectivamente. Las chufas CHN y CHB1 no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellas por lo que al contenido en taninos se refiere. Addy *et al.* (1984), en chufas nigerianas, determinaron un contenido medio en taninos del 0,16%, resultados similares a los observados en este estudio, pero por el contrario, Chukwuma *et al.* (2010) determinaron una concentración de taninos de ~ 0,01% en chufas del mismo origen. Esto apuntaría, nuevamente, a la gran variabilidad existente en algunos de los componentes entre variedades de chufas. La actividad de los taninos se relaciona con la inhibición de algunos enzimas digestivos (como las lipasas o amilasas), debido a que se unen a proteínas dificultando su digestibilidad en el tracto intestinal. En referencia a los taninos también se han descrito actividades antimicrobianas y de prevención de algunas infecciones bacterianas (Sánchez-Zapata *et al.*, 2012).

Tabla 4.5. Contenido en fitatos y taninos (en base seca) en las chufas.

Factores antinutricionales	Tipo ^{1,2}			
	VTN	B1TN	B2TN	NTN
Taninos (g / 100 g)	0,08 ^c ± 0,00	0,12 ^b ± 0,03	0,18 ^a ± 0,01	0,11 ^{bc} ± 0,02
Fitatos (mg / 100 g)	16,27 ^b ± 0,88	17,11 ^b ± 1,06	9,31 ^c ± 1,44	22,55 ^a ± 1,23

¹ Media ± desviación estándar.

² CHV: Chufas de Valencia; CHB1 y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger.

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

El contenido medio en fitatos de las chufas osciló entre los 9,31 y 22,55 mg/100 g (Tabla 4.5). El contenido en este componente determinado en la chufa CHN fue el más elevado, mientras que no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las chufas CHV y CHB1. Las chufas CHB2 presentaron el contenido en taninos más bajo. Estos resultados coincidieron con lo descrito por Adekanmi *et al.* (2009) en chufas

nigerianas (21,42 mg/100g), pero fueron más elevados que los descritos por Chukwuma *et al.* (2010) en chufas del mismo origen (1,97 mg/100 g). Los fitatos actúan en los alimentos como quelantes de minerales divalentes (como son el magnesio o el calcio), por lo que limitan su absorción en el tracto intestinal.

En la bibliografía, otros autores también han descrito la presencia de los compuestos alcaloides, esteroides, resinas, glicósidos cianogénicos, saponinas e inhibidores trópticos en chufas crudas (Addy *et al.*, 1984; Chukwuma *et al.* (2010); Okafor *et al.*, 2003). A pesar de ello, estos estudios también demostraron que las etapas de hidratación, cocción o tostado de las chufas (o de los derivados obtenidos) reducen el porcentaje de estos componentes en el producto final, debido principalmente a su sensibilidad a las altas temperaturas y a su pérdida por difusión en el medio de hidratación.

4.2.2.3. Caracterización de las fracciones proteicas de las chufas

Una de las propiedades más importantes de las proteínas vegetales es su solubilidad. La Tabla 4.6 muestra los porcentajes de las fracciones proteicas de las chufas que se aislaron en este estudio. Según el protocolo de fraccionamiento que se utilizó, el NNP se cuantificó junto con la fracción de albúminas. El NNP está representado por compuestos de origen no proteico que contienen nitrógeno, como el amoníaco, los nitratos y nitritos, la urea o el ácido úrico, entre otros. En la chufa, a diferencia de otros tubérculos, el NNP representa un porcentaje muy bajo del nitrógeno total. Mientras estudios realizados apuntan que el contenido de NNP en chufa valenciana es ~ 0,58% del N total del tubérculo, en otros tubérculos como el boniato, esta fracción puede representar entre el 10 y 15% del N total del producto (Morell *et al.*, 1983; Walter *et al.*, 1984).

Como se puede observar en los resultados obtenidos, la fracción proteica predominante en todas las chufas que se estudiaron correspondió a la fracción de albúminas + NNP (~ 82-91%), mientras que las otras fracciones solubilizadas (globulinas, prolaminas y glutelinas) estuvieron representadas por unos porcentajes muy inferiores (~ 0,63-3,96%). El contenido en nitrógeno residual osciló entre el ~ 4,7% en la CHV y el ~ 12% en la CHB1.

El contenido en albúminas entre chufas varió significativamente ($P < 0,05$), el cual estuvo comprendido entre el 82,23 y 91,93% del total de la proteína aislada. La chufa

valenciana presentó el contenido más elevado en esta fracción (~ 91%), seguida por las chufas de Níger (~ 84,07%) y las de Burkina Faso (~ 82,23-82,75%). El contenido en globulinas también fue muy variable entre chufas, comprendido entre el 2,10 y 3,96% en los diferentes tubérculos. Los porcentajes de la fracción de prolaminas oscilaron entre el 0,91 y 1,61% en las chufas CHV, CHB1 y CHB, a diferencia de la chufa CHN, en la que esta fracción estuvo representada por un porcentaje muy superior al resto, del ~ 3,45%. Finalmente, la chufa valenciana presentó el contenido más bajo en glutelinas (0,63%), el cual fue significativamente diferente ($P < 0,05$) al resto de chufas (del ~ 2% en todas ellas). Estos resultados coincidieron con los descritos en la bibliografía por Morell *et al.* (1983), quienes obtuvieron porcentajes de ~ 81, 5, 2 y 0,9% en las fracciones de albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas, respectivamente, aisladas en chufa de origen valenciano.

Tabla 4.6. Fracciones proteicas de las chufas según la clasificación propuesta por Osborne.

Fracciones proteicas	Tipo (%) ^{1,2}			
	CHV	CHB1	CHB2	CHN
Albúminas (+NNP)	91,93 ^{aw} ± 0,39	82,23 ^{ay} ± 0,50	82,75 ^{ay} ± 0,19	84,07 ^{ax} ± 0,65
Globulinas	1,11 ^{cdz} ± 0,04	2,76 ^{cx} ± 0,10	3,96 ^{cw} ± 0,03	2,10 ^{dy} ± 0,12
Prolaminas	1,61 ^{cx} ± 0,36	1,13 ^{dx} ± 0,20	0,91 ^{ex} ± 0,17	3,45 ^{cw} ± 0,41
Glutelinas	0,63 ^{dx} ± 0,34	1,96 ^{cw} ± 0,04	1,92 ^{dw} ± 0,13	1,98 ^{dv} ± 0,01
Residuo Insoluble	4,72 ^{bz} ± 0,33	11,93 ^{bw} ± 0,44	10,42 ^{bx} ± 0,52	7,90 ^{by} ± 0,62

¹ Media ± desviación estándar.

² CHV: Chufas de Valencia; CHB1y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger.

^{a-e} Valores en la misma columna con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

^{w-z} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las albúminas y las globulinas son las fracciones más abundantes de los tubérculos. En la patata, Gorinstein *et al.* (1988) describieron que estas fracciones representaban el 67 y 23% del total de la proteína, respectivamente, mientras que en el taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), Monte-Neshich *et al.* (1995) observaron que ~ 11% de la proteína correspondía a la fracción de albúminas y ~ 80% a la de globulinas. La relación entre estas dos fracciones está sujeta a cambios con el tiempo, debido a la degradación de la proteína que tiene lugar durante el crecimiento de la planta en condiciones adversas (Shewry, 2003). Tecnológicamente, en las chufas, la existencia de esta fracción

mayoritaria soluble en agua representa un beneficio para la optimización de la extracción de la proteína en la elaboración de licuados. Sánchez-Zapata *et al.* (2012) demostraron que los subproductos líquidos obtenidos en el proceso de elaboración de horchata de chufa eran ingredientes potenciales para la industria alimentaria, por su composición y propiedades, como sustitutos del agua de adición en muchos preparados alimenticios. En relación a ello, actualmente, se han descrito propiedades funcionales de proteínas procedentes de tubérculos (emulsionantes, espumantes, gelificantes, antioxidantes, etc.), valorizando el uso de estos aislados y/o extractos acuosos como ingredientes de interés para su utilización en la industria alimentaria (Hou *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2006; Scher *et al.*, 2009; Waglay *et al.*, 2014). La solubilización de estas proteínas es una premisa necesaria para la obtención de estos nuevos ingredientes, los cuales posteriormente se transformarán en concentrados de fácil manejo para su introducción en diferentes formulaciones (Walter, 1970).

4.2.2.4. Electroforesis de gel SDS-PAGE

La Figura 4.2 muestra la composición de las fracciones de Osborne aisladas y analizadas mediante electroforesis de gel SDS-PAGE. Los cuatro tipos de chufa presentaron perfiles proteicos muy parecidos, caracterizados por una amplia variedad de bandas de diferentes pesos moleculares. Como se puede observar, se aislaron bandas de igual peso molecular en todas las fracciones, lo que evidenció la existencia de proteínas de igual peso molecular y diferente solubilidad.

Las fracciones de albúminas de las chufas presentaron un perfil muy similar, caracterizado por presentar el mayor número de bandas (~ 18-20) de pesos moleculares muy diversos (15-200 kDa). En todas ellas, destacaron por su intensidad los polipéptidos de peso molecular correspondiente a 20, 25, 37, 55, 75 y ~ 106 kDa, así como con menor intensidad también se apreciaron bandas a 33, 41, 64 y 96 kDa. En el intervalo comprendido entre los 15 y 200 kDa, también se observaron bandas muy difusas en los geles de electroforesis obtenidos. Estos resultados son similares a los observados por Gorinstein *et al.* (1988) en sus estudios, quienes aislaron más de 10 bandas diferentes en la fracción de albúminas de la patata, destacando las bandas de peso molecular 20, 25 y 45 kDa por su intensidad.

A diferencia de las albúminas, las fracciones de globulinas presentaron un perfil electroforético con menor cantidad de bandas, cuyos pesos moleculares coincidieron, en gran parte, con los pesos moleculares observados en la fracción soluble en agua. En todas las chufas, se detectaron bandas a 18-19, 25 y 31 kDa, siendo estas bandas más intensas en las chufas CHV y CHB2. En el taro, Monte-Neshich *et al.* (1995) aislaron tres globulinas mayoritarias de pesos moleculares correspondientes a 12,5, 22 y 24 kDa, similares a los observados en las globulinas aisladas en las chufas de este estudio, cuyo papel atribuyeron al de proteínas de reserva de la planta, debido a que durante la germinación del tubérculo su cantidad disminuía. En relación a ello, en la batata, diferentes autores observaron que algunas de las proteínas de reserva del tubérculo cuyos pesos moleculares correspondieron a ~ 22-31 kDa, presentaron también actividad antitripsina (Maeshima *et al.*, 1985; Yao *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 1997). De hecho, en estudios previos, Addy *et al.* (1984) describieron la presencia de estos inhibidores en chufas, lo que apuntaría la posible relación entre las globulinas aisladas y este papel. En las chufas CHV también se aislaron dos bandas de pesos moleculares comprendidos entre los 41 y 55 kDa. En relación a ello, Park *et al.* (1983), Racusen *et al.* (1980) y Shewry (2003) aislaron en la patata una glicoproteína de peso molecular ~ 40-45 kDa, cuya actividad relacionaron con la defensa biológica de la planta frente a los ataques producidos por plagas (Galliard, 1971; Shewry, 2003). A parte, se conoce que esta proteína posee actividad antioxidante y constituye un excelente agente escumante y emulsionante (Van Koningsveld *et al.*, 2006, 2002; Waglay *et al.*, 2014).

En todas las chufas, las prolaminas fueron las fracciones que presentaron menor número de bandas. La banda más intensa estuvo comprendida entre los 18 y 19 kDa, mientras que también se observaron bandas más difusas entre los 25 y 31 kDa. A diferencia de las otras chufas, la chufa CHB2 presentó una banda más intensa de 20 kDa y una de menor intensidad de 50 kDa.

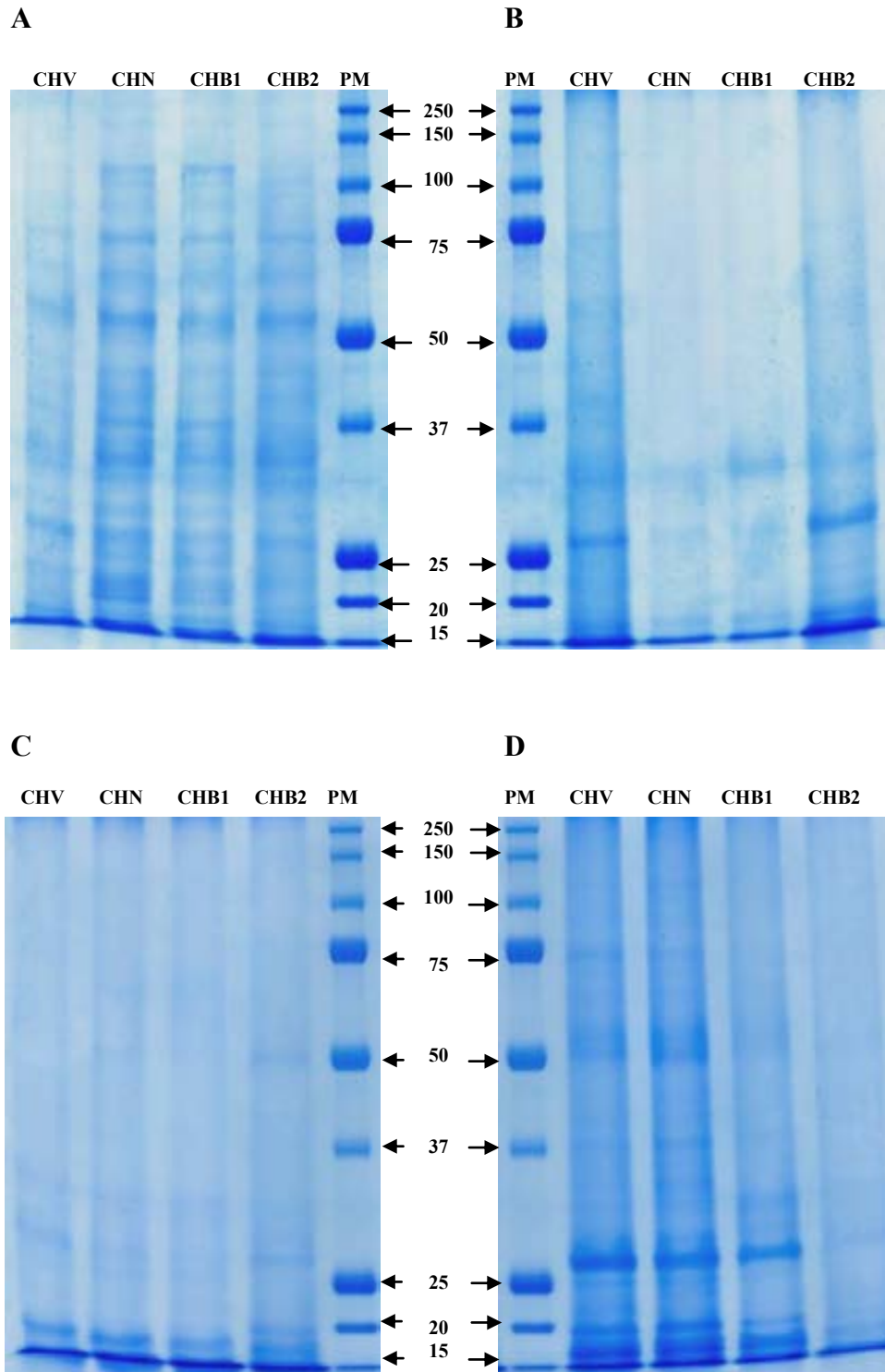


Figura 4.2. Geles de electroforesis SDS-PAGE correspondientes a las fracciones de proteína aisladas en los diferentes tipos de chufa. Albúminas (A), Globulinas (B), Prolaminas (C) y Glutelinas (D). CHV: Chufas de Valencia; CHB1y CHB2: Chufas de Burkina Faso; CHN: Chufas de Níger. PM: Marcador de peso molecular, correspondiente a 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 and 250 kDa.

En las fracciones de glutelinas se aislaron bandas más intensas que en las prolaminas. En las chufas CHV, CHN y CHB1 destacaron bandas a 18-19, 20 y a 25 kDa, mientras que en el tubérculo CHB2 también se pudieron apreciar estas bandas, pero con una intensidad muy inferior. En las chufas CHV y CHN también se aislaron bandas de poca intensidad a 37, 50 y 78 kDa, y en el intervalo comprendido entre los 20-31 y 31-37 kDa. En la patata, las bandas de prolaminas y glutelinas de mayor intensidad que se han descrito corresponden a los pesos moleculares 12 y 25 kDa, y 12, 25 y 150 kDa (Goristein *et al.*, 1988), respectivamente, similares a los obtenidos en las chufas de este estudio.

4.3. Conclusiones

Los resultados observados en este estudio demostraron que las características físico-químicas y de composición de las partidas de chufa del mercado actual son muy variables, y dependen en gran parte del origen geográfico de los tubérculos. Por el contrario, las características del perfil proteico de este tubérculo son más similares entre chufas, por lo que a la solubilidad proteica y caracterización de sus polipéptidos se refiere.

Por lo que a ello respecta, las partidas de chufa del mercado deberían seleccionarse de acuerdo a los productos que la industria quisiera elaborar, con el objetivo de optimizar los procesos productivos y las características físico-químicas y sensoriales de los productos derivados.

Capítulo 5

Optimización del los parámetros aplicados en las operaciones de hidratación y molturación de las chufas para la obtención de un licuado de composición mejorada

5

Optimización de los parámetros aplicados en las operaciones de hidratación y molturación de las chufas para la obtención de un licuado de composición mejorada

5.1. Introducción

El diseño del proceso de elaboración de los licuados vegetales suele basarse en la optimización del rendimiento de extracción de los nutrientes del grano. Si bien las características físico-químicas de las materias primas son determinantes en la composición del licuado obtenido, las condiciones aplicadas en las diferentes etapas del proceso también repercutirán sobre su composición final.

El proceso estándar para la elaboración de licuado de chufa consta de las etapas de desinfección, hidratación y molturación de los tubérculos, seguidas por el prensado y filtrado del producto (Morell *et al.*, 1983). Las características nutricionales de la chufa constituyen un factor fundamental para obtener un producto de calidad, las cuales, tal y como se ha observado en el capítulo anterior (*Capítulo 4*), son muy variables y están intrínsecamente relacionadas con el origen del tubérculo. Diferentes autores han destacado la influencia de los parámetros de trabajo en las etapas de elaboración de este licuado sobre el rendimiento de extracción de los componentes del tubérculo (Djomdi *et al.*, 2007; Ejoh *et al.*, 2007; Morell *et al.*, 1983). Se conoce que la temperatura del agua de hidratación, el tiempo de hidratación de las chufas, el tiempo de molturación del grano o la maceración reiterada con agua de los diferentes residuos sólidos obtenidos después del filtrado de la torta (o producto molturado) determinarán las características del producto final sin embargo, aún quedan incógnitas relacionadas con la optimización de este proceso pendientes por determinar.

El **principal objetivo** de este estudio fue optimizar las condiciones de las etapas de hidratación y molturación-extracción en el proceso de elaboración de licuado de chufa para optimizar la composición del producto final. En primer lugar, (1) se caracterizaron

físico-químicamente (peso, forma, cinética de hidratación y composición) las chufas que se utilizaron en este ensayo, para conocer la materia prima de la cual partió (ver *capítulo 3, apartado 3.2*). A continuación, (2) se ajustaron los parámetros tiempo de inmersión (6, 12, 18 y 24 h) y temperatura del agua de hidratación (10, 20 y 30 °C) en la etapa de hidratación de las chufas y los parámetros proporción de chufa:agua (1:3, 1:4, 1:5 y 1:7), temperatura del agua de extracción (20 y 40 °C), maceración (0 y 5 min) y pH del producto molturado (estándar, 6 y 9) en la etapa de molturación-extracción del proceso de obtención del licuado (ver *Capítulo 3, apartado 3.4*). Con ello, se determinaron las condiciones óptimas para maximizar la extracción de proteína del tubérculo, resultados que podrían ser de interés para la posterior obtención de un licuado que pudiera servir de base para la elaboración de otras bebidas vegetales.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Caracterización físico-química de la chufa y cinética de hidratación

Coincidiendo con los resultados obtenidos en el *Capítulo 4* de este trabajo, la partida de chufas con la que se trabajó en este estudio presentó una mezcla de tubérculos de distinta forma, siendo las chufas redondas las predominantes con el 55% de representación total. Las chufas ovaladas y alargadas representaron el 18 y 27% restante, respectivamente. La Tabla 5.1 muestra las dimensiones y el peso correspondientes a los tubérculos que se analizaron en este estudio.

Tabla 5.1. Longitud¹, grosor¹ y peso¹ de las chufas africanas que se utilizaron en este estudio.

Forma ²	Longitud (mm)	Grosor (mm)	Peso (g)
Alargada	8,14 ^a ± 2,02	4,96 ^b ± 0,81	0,74 ^a ± 0,19
Ovalada	6,34 ^b ± 1,19	4,93 ^b ± 0,87	0,60 ^b ± 0,17
Redonda	5,30 ^c ± 1,14	5,20 ^a ± 0,79	0,64 ^b ± 0,14

¹ Media ± desviación estándar.

^{a-c}Valores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

² Relación propuesta por Morell *et al.* (1983).

Capítulo 5

Como se puede observar, las chufas alargadas fueron las que presentaron mayores dimensiones. Los pesos unitarios de los tubérculos oscilaron entre 0,43 - 1,14, 0,32 - 1,10 y 0,40 - 0,92 g para las chufas alargadas, ovaladas y redondas, respectivamente, siendo el peso medio de la chufa de $0,63 \pm 0,87$ g. La variabilidad de tamaños existente entre chufas de la misma forma se reflejó en los respectivos pesos, que también fueron muy variables.

En la Tabla 5.2 se exponen los resultados obtenidos en el análisis de la composición de los tubérculos. Las materias extractivas libres de nitrógeno (MELN) representaron el componente mayoritario de la composición de la chufa ($\sim 62\%$), seguidas por las fracciones de grasa ($\sim 22,5\%$) y fibra ($\sim 8,73\%$). Destacó nuevamente el bajo contenido en proteína de este tubérculo ($\sim 4,6\%$), así como su bajo contenido en humedad ($\sim 7,5\%$) indicando nuevamente la importancia del proceso de hidratación del grano para la elaboración del licuado vegetal.

Tabla 5.2. Composición (% en base seca) de las chufas.

Componentes mayoritarios	(%)¹
Humedad	$7,47 \pm 0,19$
Grasa	$22,55 \pm 0,92$
MELN	$62,43 \pm 0,99$
Fibra	$8,73 \pm 0,19$
Proteína	$4,59 \pm 0,26$
Cenizas	$1,69 \pm 0,02$

¹ Media \pm desviación estándar.

El estudio de la cinética de hidratación de las chufas se realizó con una mezcla de chufas de distinta forma (redondas, ovaladas y alargadas). Previamente, otros autores han observado la relación inversamente proporcional entre el diámetro de las chufas y su ganancia en humedad en el tiempo (Djomdi *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que en este estudio se utilizaron partidas de chufas de diámetros muy similares (Tabla 5.1), no se consideró el factor *diámetro* como variable en el proceso de hidratación de las chufas. La Figura 5.1 muestra la cinética de hidratación de los tubérculos a las temperaturas de hidratación de 10, 20 y 30 °C, bajo un tiempo de inmersión de 24 h. Esta cinética correspondió con el modelo propuesto por Pelleg (1988), el cual predice la ganancia en humedad de los alimentos durante su proceso de hidratación. Por su

simplicidad, este modelo es uno de los más utilizados (Djomdi *et al.*, 2007; Turhan *et al.*, 2002). Djomdi *et al.* (2007) observaron previamente que el modelo propuesto por Pelleg (1988) se ajustaba a la cinética de hidratación de las chufas, a partir del estudio de la cinética de hidratación de chufas de diferentes tamaños bajo distintas temperaturas de agua de hidratación (20, 40, 60, 80 y 100 °C), finalizando su experiencia cuando el contenido en humedad de los tubérculos llegó al equilibrio.

Según este modelo, la cinética de absorción de agua de los tubérculos se describe mediante la ecuación:

$$M = M_0 \pm \frac{t}{K_1 + K_2 t},$$

dónde M corresponde al contenido en humedad (%) del tubérculo a tiempo t (h), M_0 es su contenido en humedad inicial, y K_1 y K_2 son las denominadas constantes de Pelleg; K_1 (h/%) está relacionada con la velocidad de absorción a $t = t_0$, y K_2 (1/%) se relaciona con el máximo contenido en humedad alcanzable a $t \rightarrow \infty$ (capacidad de absorción). Este modelo se linealiza según la ecuación: $t / (M - M_0) = K_1 + K_2 t$ dónde las constantes K_1 y K_2 son determinadas por la representación de $t / (M - M_0)$ en relación al tiempo de hidratación. En este estudio, para el cálculo de la constante K_1 se tomó el valor de la constante K_2 preestablecida por Djomdi *et al.* (2007) en chufas de diámetro parecido e hidratadas bajo condiciones similares (a 20 °C), cuyo valor fue de 0,022 %⁻¹. Se observó una disminución del valor de la constante K_1 con el incremento de la temperatura de hidratación de los tubérculos (0,651, 0,552 y 0,291 h/% para las temperaturas de 10, 20 y 30 °C, respectivamente), lo que indicó el incremento de la velocidad de absorción de agua con la temperatura, debido a una mayor permeabilidad de la membrana celular del tubérculos. Para las tres temperaturas ensayadas, el incremento más notable del contenido en humedad de las chufas se apreció transcurridas las primeras horas del proceso de hidratación. Probablemente, la posterior disminución de velocidad se deba a la progresiva saturación capilar de la membrana del tubérculo debida a la ganancia en humedad del grano con el tiempo.

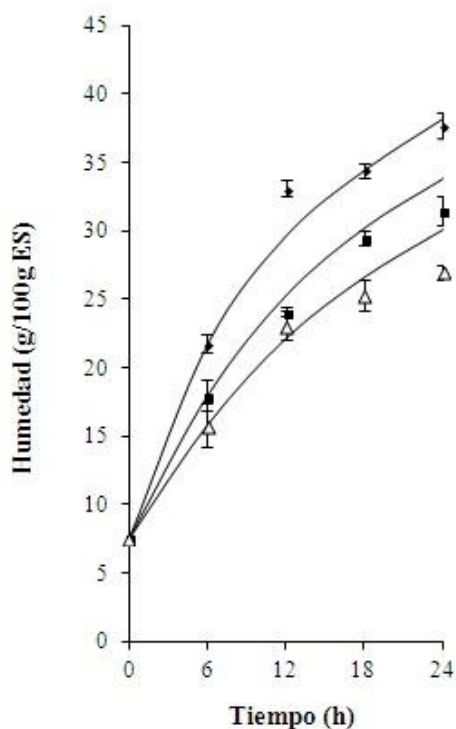


Figura 5.1. Cinética de hidratación de las chufas en agua a 10 °C (Δ), 20 °C (■) y 30 °C (◆).

Tecnológicamente, el incremento de temperatura del agua de hidratación optimizó el tiempo de la operación. Transcurridas las 12 h de inmersión, el contenido en humedad de los tubérculos hidratados a 30 °C fue similar al obtenido a 20 °C durante 24 h y muy superior al obtenido a 10 °C durante 24 h. Hidratando las chufas a estas tres temperaturas y durante 24 h se prevé no haber llegado al máximo contenido en humedad posible, ya que Djomdi *et al.* (2007) demostraron que la saturación capilar del grano de chufa (de diámetro < 1 cm) a temperatura ambiente se conseguía a las ~ 40 h de hidratación del tubérculo. En el nuestro estudio, la ganancia en humedad de los tubérculos transcurrió lentamente probablemente debido a que los valores de temperatura de agua de hidratación, cercanos a temperatura ambiente, no favorecieron el incremento de permeabilidad de la membrana celular externa del tubérculo, responsable de la consiguiente entrada de humedad (Djomdi *et al.*, 2007; Ejoh *et al.*, 2006).

Para la elaboración de licuado de chufa, el mínimo contenido en humedad recomendado para proceder a la molturación de los tubérculos corresponde a ~ 10% (Morell *et al.*,

1986), por lo que hidratando las chufas bajo cualquier de las tres temperaturas ensayadas se finalizaría esta etapa en menos de 6 h. Algunos horchateros que elaboran la horchata según el método tradicional tienden a hidratar los tubérculos durante períodos más largos (de casi el doble de tiempo), asegurándose llegar al nivel de turgencia óptimo, pero la excesiva proliferación de los microorganismos a temperaturas ambientales supone el principal riesgo de esta etapa, ya que repercute en la calidad higiénica del producto final. Por ello, también es una práctica habitual hidratar las chufas a mayores temperaturas ($\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$), por lo que los tiempos de hidratación del tubérculo se acortan ($\sim 3\text{ h}$), optimizando a la vez el tiempo total del proceso de elaboración del licuado.

5.2.2. Influencia de los parámetros aplicados en las operaciones de hidratación y molturación del tubérculo sobre la composición final del licuado vegetal (sólidos totales, grasa y proteína)

Los valores obtenidos en el análisis de los parámetros físico-químicos del agua que se utilizó para la elaboración de los licuados vegetales fueron los siguientes: $T^a = 20 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} (20\text{ }^{\circ}\text{C}) = 7,69 \pm 0,30$ y dureza total (mg Ca/L) = $1,5 \pm 0,5$. Destacar que la posible difusión con el transcurso del tiempo de parte de las sustancias solubles de la chufa al agua de hidratación no se tuvo en consideración. Estudios anteriores con licuado de chufa demostraron que a temperaturas de hidratación $\geq 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ existía una ligera difusión de componentes solubles del tubérculo en el agua de inmersión, aunque estas pérdidas fueron mínimas. En estudios realizados con soja, Lo *et al.* (1968) demostraron que hasta tiempos de inmersión de 72 h, existían ligeros cambios en la composición de las semillas, aunque el efecto de dichas pérdidas era despreciable sobre la composición final del licuado vegetal.

5.2.2.1. Influencia del tiempo de inmersión de la chufa en agua y de la temperatura del agua de hidratación

Los resultados numéricos obtenidos a partir de los análisis de sólidos totales, proteína y grasa de los licuados elaborados se exponen en las Tablas 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6. La extracción de sólidos totales del tubérculo fue independiente de las condiciones de

Capítulo 5

hidratación, aunque en algunos casos se apreció un ligero incremento de extracción en licuados elaborados a partir de chufas hidratadas durante más de 6 h. Sin embargo, otros autores observaron un efecto significativo del proceso de hidratación sobre la extracción de sólidos totales del tubérculo, probablemente debido a que trabajaron con intervalos de tiempo y temperatura superiores, así como bajo unas condiciones de extracción diferentes (Djombdi *et al.*, 2007; Ejoh *et al.*, 2006). Así por ejemplo, Djomdi *et al.* (2007) realizaron sus análisis directamente a partir del líquidos que extraían del tubérculo hidratado al prensarlo, por lo que pudieron observar el incremento en sólidos totales de los extractos líquido obtenidos a partir de las chufas hidratadas a mayor temperatura, probablemente debido al efecto de la temperatura sobre la estructura física de la pared de las chufas; a mayores temperaturas de hidratación la pared celular se reblandece, absorbiendo más agua y facilitando su rotura por presión.

Tabla 5.3. Porcentaje de extracto seco de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.

		ES (%) ¹			
Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Proporción chufa:agua			
		1:3	1:4	1:5	1:7
10	6	13.26 ^b ± 1,32	10.74 ^b ± 0,55	7.41 ^b ± 0,67	4.62 ^b ± 0,19
	12	15.20 ^{ab} ± 0,08	11.09 ^{ab} ± 0,34	7.55 ^b ± 0,02	4.13 ^c ± 0,09
	18	16.67 ^a ± 0,06	11.82 ^a ± 0,86	9.15 ^a ± 1,02	6.73 ^a ± 0,90
	24	14.42 ^{ab} ± 2,62	10.17 ^b ± 0,05	8.33 ^{ab} ± 0,14	5.16 ^b ± 0,51
20	6	15.83 ^a ± 0,85	11.69 ^a ± 0,32	9.02 ^a ± 0,60	5.40 ^b ± 0,10
	12	14.51 ^a ± 2,10	12.48 ^a ± 0,63	10.15 ^a ± 1,37	6.10 ^{ab} ± 0,65
	18	14.28 ^a ± 0,83	11.82 ^a ± 0,16	8.71 ^a ± 0,13	6.18 ^{ab} ± 0,38
	24	14.02 ^a ± 0,50	11.14 ^a ± 1,06	9.35 ^a ± 0,56	6.57 ^a ± 0,23
30	6	18.13 ^a ± 1,16	11.45 ^c ± 0,03	8.35 ^c ± 0,89	5.17 ^c ± 0,35
	12	18.06 ^a ± 1,33	13.93 ^a ± 1,05	11.91 ^a ± 1,29	8.54 ^a ± 1,65
	18	17.33 ^a ± 1,10	12.59 ^b ± 0,37	10.63 ^b ± 0,23	6.75 ^b ± 0,18
	24	14.61 ^a ± 0,52	13.21 ^{ab} ± 0,13	10.10 ^b ± 0,08	7.24 ^{ab} ± 0,12

¹ Media ± desviación estándar.

^{a-c}Valores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05).

La Tabla 5.4 muestra los porcentajes de grasa de los diferentes licuados, en la que se puede observar cierta variabilidad entre algunas muestras debido, probablemente, al mismo proceso de extracción. Como se puede observar, ni el tiempo de inmersión de las

chufas en agua ni la temperatura del agua de hidratación influenciaron significativamente ($P > 0,05$) la extracción de grasa del tubérculo.

Tabla 5.4. Porcentaje de grasa de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Grasa (%) ¹			
		Proporción chufa:agua			
		1:3	1:4	1:5	1:7
10	6	5.17 ^a ± 0,24	4.20 ^b ± 0,24	2.75 ^a ± 0,29	1.52 ^b ± 0,05
	12	5.67 ^a ± 0,32	4.52 ^a ± 0,05	3.20 ^a ± 0,41	2.35 ^a ± 0,47
	18	5.72 ^a ± 0,57	4.52 ^{ab} ± 0,06	2.65 ^a ± 0,44	2.35 ^a ± 0,50
	24	5.35 ^a ± 0,24	3.35 ^c ± 0,19	2.87 ^a ± 0,25	1.77 ^b ± 0,05
20	6	4.97 ^a ± 0,78	3.40 ^a ± 0,22	2.62 ^a ± 0,49	1.60 ^b ± 0,24
	12	4.62 ^a ± 0,61	3.67 ^a ± 0,46	3.00 ^a ± 0,75	1.92 ^a ± 0,05
	18	4.42 ^a ± 0,19	3.50 ^a ± 0,52	2.87 ^a ± 0,75	1.82 ^a ± 0,05
	24	4.37 ^a ± 0,61	3.37 ^a ± 0,10	3.07 ^a ± 0,15	1.90 ^a ± 0,08
30	6	5.40 ^a ± 0,20	5.02 ^a ± 1,70	4.12 ^a ± 1,17	1.89 ^a ± 0,54
	12	4.77 ^a ± 1,42	4.70 ^a ± 0,12	3.87 ^a ± 0,38	1.95 ^a ± 0,07
	18	4.25 ^a ± 1,91	4.55 ^a ± 0,06	3.50 ^a ± 0,22	1.92 ^a ± 0,03
	24	3.97 ^a ± 2,45	4.00 ^a ± 0,64	2.87 ^a ± 0,67	1.90 ^a ± 0,06

¹ Media ± desviación estándar..

^{a-b}Para una misma temperatura y concentración, valores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

La máxima extracción de proteína se obtuvo en los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas durante 12 y 18 h, independientemente de la temperatura de hidratación de los tubérculos. La Tabla 5.5 muestra los porcentajes de proteína obtenidos en los diferentes licuados y, para mejor visualización de los resultados, los datos obtenidos se representan también en la Figura 5.2. Se observó una peculiar relación entre el incremento de la extracción proteica y el estado de hidratación de la chufa, ya que, a partir de un mínimo contenido en humedad del tubérculo ($\geq 20\%$) la extracción de proteína dejó de incrementar.

Por ello, el contenido en proteína de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 30 °C durante 6 h fue similar al obtenido a partir de chufas hidratadas a 10 - 20°C durante 12 h, cuyos contenidos en humedad fueron $\geq 20\%$ en ambos casos.

Capítulo 5

El hecho de que la extracción proteica a partir de chufas hidratadas durante 24 h no fuera significativamente diferente ($P > 0,05$) a la extracción realizada en base a chufas hidratadas durante menor tiempo, y considerando el significativo incremento en humedad de la chufa, confirmó la no mejora de la extracción proteica a mayor porcentaje de agua absorbida.

Por consiguiente, para las tres temperaturas ensayadas y considerando obtener un licuado con el máximo contenido en proteína, no tuvo sentido hidratar más de 12 h el tubérculo.

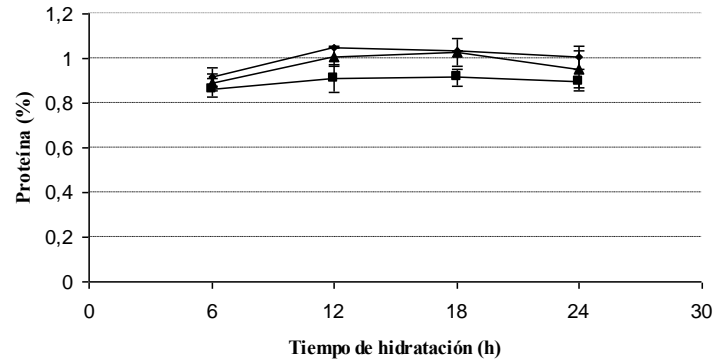
Tabla 5.5. Porcentaje de proteína de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Proteína (%) ¹			
		Proporción chufa:agua			
		1:3	1:4	1:5	1:7
10	6	0.89 ^c ± 0,07	0.69 ^c ± 0,02	0.53 ^a ± 0,05	0.37 ^c ± 0,02
	12	1.00 ^{ab} ± 0,05	0.74 ^b ± 0,02	0.64 ^a ± 0,10	0.50 ^a ± 0,06
	18	1.03 ^a ± 0,05	0.78 ^a ± 0,03	0.63 ^a ± 0,04	0.52 ^a ± 0,07
	24	0.95 ^{bc} ± 0,06	0.70 ^c ± 0,01	0.59 ^a ± 0,04	0.43 ^b ± 0,02
20	6	0.85 ^b ± 0,01	0.73 ^a ± 0,06	0.56 ^c ± 0,02	0.41 ^b ± 0,05
	12	0.92 ^a ± 0,04	0.72 ^a ± 0,02	0.70 ^a ± 0,02	0.43 ^{ab} ± 0,03
	18	0.90 ^a ± 0,03	0.76 ^a ± 0,02	0.62 ^b ± 0,01	0.45 ^{ab} ± 0,01
	24	0.88 ^a ± 0,03	0.70 ^a ± 0,04	0.60 ^b ± 0,03	0.47 ^a ± 0,06
30	6	0.92 ^b ± 0,05	0.75 ^b ± 0,02	0.54 ^c ± 0,02	0.41 ^a ± 0,06
	12	1.13 ^a ± 0,10	0.86 ^a ± 0,05	0.75 ^a ± 0,02	0.54 ^a ± 0,11
	18	1.05 ^a ± 0,06	0.75 ^b ± 0,00	0.63 ^b ± 0,06	0.47 ^a ± 0,04
	24	1.07 ^a ± 0,13	0.75 ^b ± 0,03	0.66 ^b ± 0,03	0.50 ^a ± 0,03

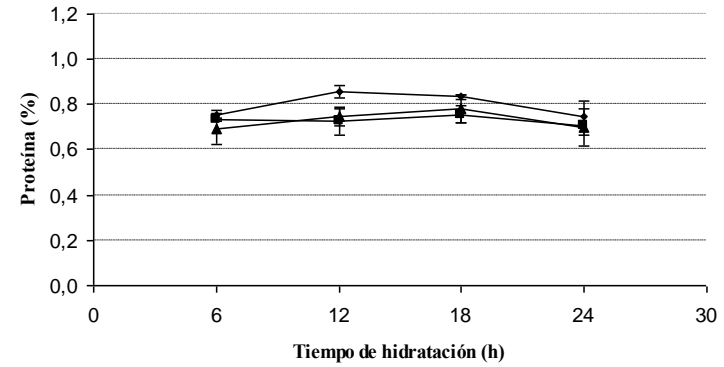
¹ Media ± desviación estándar.

^{a-c} Valores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

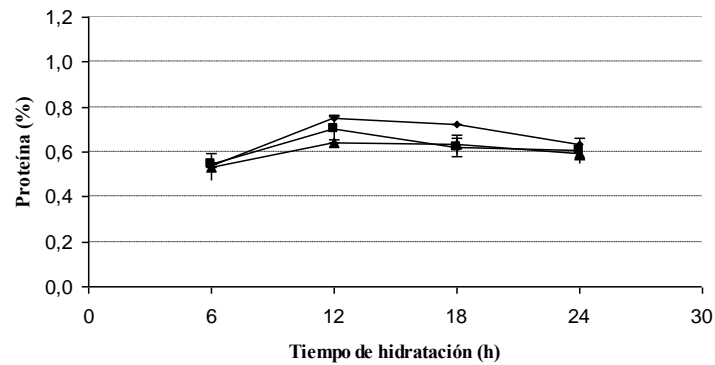
a)



b)



c)



d)

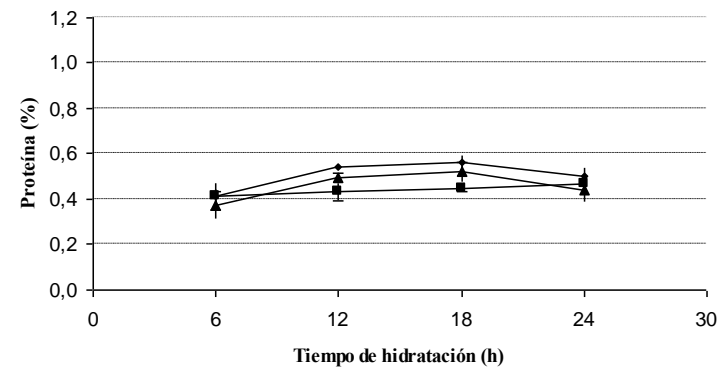


Figura 5.2. Porcentaje de proteína de los licuados elaborados a partir de chufas hidratadas a 10 °C (▲), 20 °C (■) y 30 °C (◆) durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3 (a), 1:4 (b), 1:5 (c) y 1:7 (d).

5.2.2.2. Influencia del porcentaje de agua añadido durante la molturación (proporción chufa:agua).

Los resultados numéricos obtenidos a partir de los análisis de sólidos totales, proteína y grasa de los licuados elaborados a distintas proporciones chufa:agua se exponen en las Tablas 5.3, 5.4 y 5.5. Como se puede observar, el contenido en proteína, grasa y sólidos totales de los licuados fue inversamente proporcional a la cantidad de agua añadida en las distintas extracciones. Por consiguiente, la adición gradual de agua durante el proceso de molturación no mejoró la extracción cuantitativa de sólidos totales, grasa o proteína de la de chufa, sino que tuvo un único efecto diluyente sobre la composición final del licuado.

5.2.2.3. Influencia de la temperatura del agua de extracción y de la maceración del producto molturado previa a su prensado y filtrado

La Tabla 5.6 muestra los resultados obtenidos de extracto seco, proteína y grasa de los licuados elaborados a diferente temperatura de agua de molturación (20, 40, 50 y 60 °C), con y sin posterior mantenimiento (o maceración) durante 5 min al baño maría. Como se puede observar, el incremento de la temperatura del agua adicionada durante la molturación (agua de extracción) no tuvo ningún efecto sobre la extracción de sólidos totales de la chufa, así como tampoco influyó en la extracción del contenido graso y proteico del tubérculo. Conociendo el perfil graso de la chufa, caracterizado principalmente por el alto contenido en ácido oleico (Morell *et al.*, 1983; Karababa *et al.*, 2001), se podría considerar que bajo las temperaturas de trabajo ensayadas, la mayor parte de grasa se presenta en forma líquida, por lo que probablemente, su estado físico influyó por igual en la extracción. La maceración de los extractos molturados tampoco tuvo influencia sobre el contenido en sólidos totales y grasa del producto final (Tabla 5.6).

Por lo que a la proteína se refiere, conociéndose que su solubilidad es directamente proporcional al incremento de temperatura (Fennema, 1993) y que la máxima temperatura ensayada (60°C) no es suficiente para la precipitación por desnaturalización de la proteína de la chufa (Ejoh *et al.*, 2006), las diferencias no significativas ($P > 0,05$) entre la cantidad de proteína extraída en los distintos licuados apuntarían la posibilidad de que otros factores afectasen en esta extracción. El hecho de mantener el producto

molturado a la misma temperatura del agua de extracción durante un tiempo de 5 min y en agitación constante, no mejoró la extracción de proteína, sino al contrario, observándose una ligera tendencia en los licuados macerados a presentar un contenido en proteína inferior a sus homólogos, a excepción del licuado macerado a temperatura de 60 °C, cuyo contenido proteico no fue significativamente distinto a su homólogo sin mantenimiento.

Tabla 5.6. Extracto seco, proteína y grasa de los licuados elaborados a temperatura de agua de molturación de 20, 40, 50 y 60 °C con mantenimiento durante 5 min al baño maría (Lm) y sin mantenimiento (L).

Tipo de licuado L -Temperatura del agua de extracción (C°)	ES (%)	Proteína (%)	Grasa (%)
L-20	15,01 ± 0,76 ^a	0,89 ± 0,14 ^a	5,29 ± 0,34 ^a
Lm-20	14,95 ± 0,61 ^a	0,81 ± 0,11 ^{ab}	5,21 ± 0,26 ^a
L-40	15,40 ± 1,33 ^a	0,88 ± 0,11 ^a	5,21 ± 0,29 ^a
Lm-40	15,23 ± 0,97 ^a	0,80 ± 0,06 ^{ab}	5,14 ± 0,29 ^a
L-50	15,34 ± 0,99 ^a	0,84 ± 0,09 ^{ab}	5,06 ± 0,57 ^a
Lm-50	15,82 ± 1,31 ^a	0,78 ± 0,11 ^b	4,79 ± 1,01 ^a
L-60	14,86 ± 0,53 ^a	0,79 ± 0,06 ^{ab}	5,06 ± 0,50 ^a
Lm-60	14,69 ± 1,12 ^a	0,82 ± 0,09 ^{ab}	5,14 ± 0,42 ^a

^{a-b} Media ± desviación estándar.

^{a-b}Valores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Estos resultados también apuntarían la posibilidad que el agua de molturación se saturara parcialmente, no mejorando la solubilización de más nutrientes. Por ello, una posible solución para optimizar el rendimiento de sólidos extraídos de la torta sería realizar esta maceración con agua *nueva*. De hecho, Morell *et al.* (1983) propusieron realizar dos etapas de *lavado* de la torta (con agua nueva), lo que incrementó con éxito el rendimiento de extracción de los componentes del residuo sólido.

5.2.2.4. Influencia del pH en el producto molturado

La Tabla 5.7 del muestra los valores de pH obtenidos en los licuados elaborados en los ensayos anteriores. Como se puede observar, en todos los casos, el pH de los licuados

Capítulo 5

estuvo próximo a la neutralidad, tal y como era de esperar para este tipo de producto (Monerri *et al.*, 1998; Anónimo, 1999).

Tabla 5.7. Valores de pH de los licuados obtenidos a partir de chufas hidratadas a 10, 20 y 30 °C, durante 6, 12, 18 y 24 h, en proporciones de chufa:agua de 1:3, 1:4, 1:5 y 1:7.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	pH ¹			
		Extracción			
		1:3	1:4	1:5	1:7
10	6	6,89 ^a ± 0,01	7,02 ^a ± 0,02	7,07 ^a ± 0,07	7,22 ^a ± 0,08
	12	6,82 ^b ± 0,01	6,58 ^a ± 0,98	7,03 ^a ± 0,06	7,11 ^a ± 0,04
	18	6,87 ^a ± 0,02	7,01 ^a ± 0,02	7,01 ^a ± 0,02	7,19 ^a ± 0,04
	24	6,80 ^b ± 0,06	6,95 ^a ± 0,09	6,95 ^a ± 0,92	7,12 ^a ± 0,03
20	6	6,91 ^a ± 0,01	6,97 ^a ± 0,10	7,55 ^a ± 0,58	7,07 ^a ± 0,11
	12	6,89 ^a ± 0,02	6,81 ^b ± 0,02	6,85 ^b ± 0,04	6,91 ^a ± 0,08
	18	6,75 ^b ± 0,04	6,88 ^b ± 0,03	6,88 ^b ± 0,08	6,95 ^a ± 0,01
	24	6,91 ^a ± 0,05	7,00 ^a ± 0,05	7,00 ^a ± 0,03	7,05 ^a ± 0,07
30	6	6,80 ^a ± 0,11	6,97 ^a ± 0,06	7,05 ^a ± 0,01	7,22 ^a ± 0,08
	12	6,72 ^a ± 0,10	6,79 ^b ± 0,09	7,03 ^a ± 0,06	7,11 ^a ± 0,04
	18	6,73 ^a ± 0,05	6,78 ^b ± 0,07	7,13 ^a ± 0,03	7,19 ^a ± 0,04
	24	6,78 ^a ± 0,01	6,83 ^b ± 0,01	7,03 ^a ± 0,01	7,12 ^a ± 0,03

¹ Media ± desviación estándar.

^{a-b} Valores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

En un inicio, para realizar este ensayo, se decidió ajustar el pH del agua adicionada en la molturación del tubérculo (pH estándar, 6 o 9). Debido a la gran capacidad tampón de los compuestos de la chufa, para cualesquiera que fuera el pH del agua utilizada el producto molturado presentó un pH similar al producto control (agua con pH estándar), por lo que reajustar el pH del agua de extracción no tenía efecto alguno sobre el pH del producto final. Por este motivo, se decidió realizar la molturación de las chufas con agua a pH estándar (sin reajuste de pH) y reajustar el pH del producto una vez molturado, hasta conseguir anular el efecto tampón de los componentes del tubérculo.

El producto se mantuvo al nuevo pH durante un tiempo de 3 min, en agitación constante, y posteriormente, se filtró. El pH del agua que se utilizó en estas extracciones fue $7,73 \pm 0,09$. En los licuados control, el pH del producto molturado fue similar al obtenido en los licuados filtrados. Para las demás extracciones, el ajuste de pH del producto molturado se reflejó en el licuado vegetal final (Tabla 5.8). La Tabla 5.8 muestra los resultados del análisis de proteína de los diferentes licuados. No se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la extracción de proteína de los

licuados cuyo pH se ajustó a 6 y a 9, respecto el licuado control, así como tampoco entre los licuados extraídos a 20 y 40 °C. Basándonos en los resultados obtenidos en el experimento anterior, donde la extracción de proteína no difirió molturando el tubérculo con agua precalentada a distinta temperatura, las diferencias no significativas obtenidas en este ensayo apuntaron a que la temperatura no tuvo efecto sinérgico con el ajuste de pH del producto molturado.

Según los resultados obtenidos en el capítulo anterior sobre fraccionamiento proteico de las chufas (*Capítulo 4*), las albúminas constituyen la fracción proteica mayoritaria de la chufa, por lo que su extracción se ve favorecida por el proceso de elaboración del licuado. De hecho, entre el licuado control y el licuado cuyo pH se ajustó a 6 no se esperaban diferencias notables en cuanto al contenido en proteína, ya que ambos pH fueron muy próximos entre ellos, así como similares a las condiciones consideradas óptimas para la extracción de albúmina. Por el contrario, en los licuados cuyo pH se reajustó a 9 sí se esperaba observar algunos cambios en cuanto a la solubilidad proteica, entre otros, debido a la variación de la solubilidad de ciertas proteínas vegetales en medio alcali. Bijoi *et al.* (2009) en el amaranto (*Amaranthus blitum*), obtuvieron una máxima solubilización de las albúminas y globulinas a pH = 8, mientras que a pH > 8 incrementó la solubilidad de las fracciones de prolaminas y glutelinas.

Tabla 5.8. Porcentajes de proteína extraídos¹ en los diferentes licuados después de reajustar el valor de pH del producto molturado.

Temperatura Extracción (°C)		pH del producto molturado	pH del producto filtrado	Proteína (%)
20	+ NaOH	9,00 ± 0,02	8,90 ± 0,03	0,65 ^a ± 0,10
	Control	6,53 ± 0,40	6,84 ± 0,12	0,64 ^a ± 0,17
	+ HCl	6,00 ± 0,02	5,82 ± 0,30	0,69 ^a ± 0,10
40	+ NaOH	9,00 ± 0,02	9,05 ± 0,12	0,59 ^a ± 0,11
	Control	6,62 ± 0,47	6,80 ± 0,18	0,68 ^a ± 0,03
	+ HCl	6,00 ± 0,02	6,14 ± 0,02	0,61 ^a ± 0,05

¹ Media ± desviación estándar.

^aValores en la misma columna con distinto superíndice indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Capítulo 5

Destacar que se apreciaron cambios de estabilidad física en los licuados elaborados cuyo pH se ajustó a 6, basados en una ligera sedimentación de algunos de los componentes del licuado (Figura 5.4).

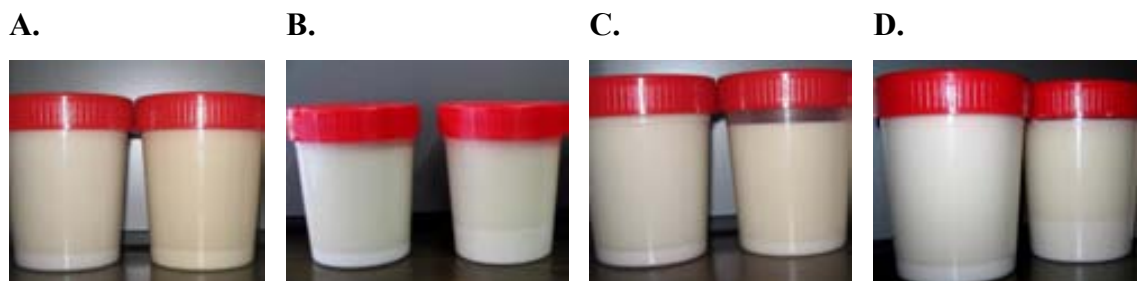


Figura 5.4. Licuados obtenidos a temperatura de agua de molturación de (A,B) 20 °C y 40 °C (C,D). En las distintas imágenes, el licuado izquierdo corresponde al licuado *control*, siendo el de la derecha el licuado obtenido después de ajustar el pH del producto molturado a valores de 9 (A,C), mediante la adición de NaOH 0,5N, o 6 (B,D), mediante la adición de HCl 0,5 N.

5.3. Conclusiones

Las chufas africanas presentaron una calidad muy heterogénea en cuanto a las características físicas forma y peso. Más uniformidad presentó su composición, caracterizada por el alto contenido en materias extractivas libres de nitrógeno (MELN) y grasas, y un bajo contenido en proteína.

En general, la modificación de las condiciones de hidratación de la chufa (10, 20, 30 °C durante 6, 12, 18 y 24 h) no influyó la extracción de sólidos totales y grasa del tubérculo, no obstante, la extracción de proteína mejoró a partir de chufas con un contenido en humedad $\geq 20\%$. En la etapa de molturación, la adición gradual de agua (1:3-1:7) tuvo un efecto diluyente sobre la composición química del licuado, no mejorando la extracción de los componentes de la chufa. Tampoco el incremento de la temperatura de esta agua ($20 \leq T^a \leq 60$ °C) y el reajuste de pH del producto molturado (pH = 6 o 9) influenciaron la extracción de los componentes del tubérculo (sólidos totales, grasa y proteína). El hecho de mantener el producto molturado en agitación (5 min), previamente a la operación de filtrado provocó una disminución del contenido en proteína en el licuado final. Por lo tanto, la composición de los licuados elaborados

dependió de la composición físico-química de los tubérculos, de su estado de hidratación y de la proporción chufa:agua utilizada.

La máxima extracción de proteína se obtuvo en los licuados elaborados a partir de chufas con un contenido en humedad $\geq 20\%$ y bajo la proporción chufa:agua 1:3, para cualesquiera que fuera la temperatura del agua de molturación (20-60 °C) y el pH del producto molturado (pH = estándar, 6 o 9). Sin embargo, el bajo contenido en proteína obtenido en el licuado apuntaría la necesidad de complementar este producto con otras fuentes proteicas, con el objetivo de mejorar su perfil nutricional.

Capítulo 6

*Elaboración de un licuado de chufa de composición mejorada mediante la adición de mijo perla (*Pennisetum glaucum*) como fuente de proteína*

Elaboración de un licuado de chufa de composición mejorada mediante la adición de mijo perla (*Pennisetum glaucum*) como fuente de proteína

6.1. Introducción

Como se ha comentado en los capítulos anteriores, una de las aplicaciones más destacadas de la chufa es la elaboración de licuados vegetales, tanto por su composición y cualidades organolépticas como por el valor cultural que representa este tubérculo en diferentes países del mundo (Tigernuts Traders, 2014). Existen varios estudios que enfatizan las características nutricionales del licuado de chufa (CRCHV, 2014) pero, debido a su bajo contenido en proteína, en algunas ocasiones ciertos autores han planteado enriquecerlo con otras fuentes vegetales más ricas en este componente, sobre todo en regiones dónde la disponibilidad e ingesta de productos equilibrados nutritivamente es escasa (Addy *et al.*, 1984; Belewu, 2006). Considerando que el desarrollo de nuevos licuados vegetales es una tendencia emergente, la industria alimentaria persigue la búsqueda de nuevas fuentes vegetales que puedan servir de base para la elaboración y complementación de estos licuados, entre las que destacan numerosas semillas y granos de procedencia africana. La explotación de los cultivos africanos para la elaboración de diferentes productos nos ofrece una oportunidad para la valorización de estos ingredientes mediante su introducción en el mercado alimentario actual (Cassandra *et al.*, 2002; Van Wyk, 2011).

El mijo es una planta herbácea de grano pequeño que se cultiva en zonas de clima templado y tropical. El mijo perla (*Pennisetum glaucum*) es la especie que más se cultiva en África, la cual constituye un ingrediente base en su alimentación (Simwebwa *et al.*, 1984; Taylor, 2004). Su composición nutricional, determinada en gran parte por las condiciones medioambientales del cultivo, se caracteriza por su alto contenido en grasas (de ~ 5%, de las cuales un 75% corresponde a ácidos grasos insaturados) y almidón (~ 66,7%), lo que repercute en que el aporte energético de la semilla sea alto (1475 kJ/100

g). A diferencia de otros mijos, el mijo perla también destaca por su elevado porcentaje en proteína (~ 10,6%), así como por su riqueza en los minerales fósforo, potasio, hierro, zinc y calcio, y su perfil en aminoácidos, algo mejorado respecto a otros cereales como el sorgo o el maíz (Ejeta *et al.*, 1987; Opoku *et al.*, 1981). Cabe destacar que la calidad nutricional del mijo puede verse afectada por la presencia de sustancias antinutricionales, las cuales afectan negativamente a la biodisponibilidad de algunos nutrientes del cereal, reduciendo su absorción (Agte *et al.*, 1997; Honke *et al.*, 1998; Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000). Por ello, previamente a su consumo, las semillas de mijo se suelen someter a diferentes operaciones (descascarillado, germinación, fermentación, tostado) con el objetivo de reducir o eliminar las sustancias antinutricionales del grano, aunque a la vez se pierdan algunos de los componentes nutritivos de la semilla (Honke *et al.*, 1998; Lestienne *et al.*, 2005, 2007).

Por todo ello, y considerando las características nutricionales y organolépticas del licuado de chufa, se decidió realizar un estudio para desarrollar un licuado en base a dos materias primas de procedencia africana, como son la chufa y el mijo, ambas con un destacado papel en la alimentación de esta población (Taylor *et al.*, 2008).

El **principal objetivo** de este estudio fue la obtención de un licuado en base a chufas de contenido en proteína mejorado, mediante la adición de mijo perla como fuente proteica. Para cumplir con el objetivo previamente descrito, se realizaron los estudios que se detallan a continuación. Previamente a la elaboración del licuado, (1) se realizó una caracterización físico-química del mijo perla, para generar más información sobre uno de los mijos africanos más típicos. Se evaluaron las características físicas y de composición del mijo, así como también se determinaron las características de las fracciones proteicas (*ver Capítulo 3, apartado 3.3*). A parte, también se realizó un estudio de germinación de las semillas de mijo para la evaluación del efecto de este proceso sobre la reducción de factores antinutricionales en la semilla. La chufa no se caracterizó, ya que se trabajó con la chufa previamente caracterizada en el *Capítulo 4* de esta tesis (chufa CHB1). Posteriormente, se realizaron diferentes pruebas en la Planta Piloto de la UAB, con el objetivo de (2) definir bajo qué protocolo de fabricación del licuado se obtenía un producto final con unas características de composición determinadas (contenido en proteína $\geq 1,5\%$, ~ 3,5% en grasa y extracto seco del ~ 18%) (*ver Capítulo 3, apartados 3.4 y 3.5*).

6.2. Resultados y discusión

6.2.1. Caracterización físico-química del mijo

6.2.1.1. Características físicas

La Tabla 6.1 muestra las propiedades físicas del mijo perla que se caracterizó en este estudio. Como se puede observar, los valores de las medidas realizadas en la base del grano D_2 y D_3 fueron similares entre sí, siendo D_1 , que corresponde al valor de la elongación que presenta el grano respecto a su base, ligeramente superior. Estos resultados confirmaron la forma cono-esférica (o forma de *gota*) de la semilla, descrita previamente en esta variedad de mijo, la cual se caracteriza por presentar una base esférica con una superficie relativamente plana de la cual emerge una estructura cónica (Baryeh, 2002; Jain *et al.*, 1997). Normalmente, la dimensión D_1 del grano de mijo perla tiene unas medidas comprendidas entre los 1,5 y 2,5 mm, aunque se encuentran granos de mayor altura, como es el caso del mijo caracterizado en este estudio (Cassandra *et al.*, 2002).

Tabla 6.1. Propiedades físicas del mijo perla.

Propiedad física	Valores obtenidos ¹
Forma	
Dimensión D_1 (mm)	$3,17 \pm 0,46$
Dimensión D_2 (mm)	$2,57 \pm 0,37$
Dimensión D_3 (mm)	$2,40 \pm 0,32$
Volumen (mm ³)	$8,75 \pm 2,68$
Área de la superficie (mm ²)	$20,72 \pm 4,24$
Esfericidad (Φ)	$0,98 \pm 0,01$
Factor forma (λ)	$0,97 \pm 0,07$
Peso de 1000 semillas (g)	$9,09 \pm 0,30$
Color	
L*	$59,28 \pm 0,52$
a*	$1,64 \pm 0,17$
b*	$18,60 \pm 0,25$

¹Media \pm desviación estándar.

El valor de esfericidad (o *índice de redondez*) y el factor forma de la semilla (λ) presentaron valores de ~ 1 , mientras que el volumen medio de las semillas y su área

superficial correspondieron a $8,75 \text{ mm}^3$ y $20,726 \text{ m}^2$, respectivamente. Estos valores fueron similares a los descritos por otros autores en sus estudios con mijo perla (Baryeh, 2002; Jain *et al.*, 1997). Baryeh *et al.* (2002) observaron que la variabilidad que se observa entre las dimensiones de los granos de mijo del mercado se correlaciona directamente con su contenido en humedad. Por el contrario, estos autores observaron que otros parámetros, como la esfericidad del grano, no se correlacionaron tan directamente con el porcentaje de humedad de la semilla. El peso de 1000 granos del mijo correspondió a 9,09 g, valores que coincidieron con los descritos previamente en la literatura (5 - 15 g) (Abdelrahman *et al.*, 1984; Cassandra *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 1997). Nuevamente, este parámetro estará determinado por el contenido en humedad de la semilla (Baryeh, 2002). Todos estos parámetros son de especial interés para el diseño de la maquinaria e instalaciones de procesamiento de las semillas, ya que de sus características dependerán las condiciones en que se realicen las operaciones de lavado, trillado, ventado, descascarillado, etc., de los granos.

La Figura 6.1 muestra una imagen de las semillas de mijo caracterizadas en este estudio. Como se puede observar, y como su nombre indica, esta especie de mijo se caracteriza por su forma de gota y su coloración gris perla.



Figura 6.1. Imagen del mijo perla caracterizado en este estudio.

En la Tabla 6.1, también se exponen los parámetros de color obtenidos en el análisis instrumental de color del mijo perla. Estos resultados difieren de los descritos por Kolawole *et al.* (2013) para otra variedad de mijo de la misma especie ($L^* = 47,21$, $a^* =$

4,81 y $b^* = 22,18$), lo que no es de extrañar porque existe una amplia gama de colores entre mijos de la misma especie. En el grano, los pigmentos que caracterizarán su color superficial se encuentran, mayoritariamente, en el pericario de la semilla. Por este motivo, en la elaboración de productos derivados del mijo, el grano suele someterse a operaciones de blanqueado, descascarillado, etc., operaciones que eliminan su color y evitan los tonos grisáceos frecuentemente indeseados en los productos derivados (Rathy *et al.*, 2004).

6.2.1.2. Composición química

Los resultados obtenidos en el análisis de composición de la semilla se exponen en la Tabla 6.2. El porcentaje de humedad de la semilla fue del $\sim 11,71\%$. Normalmente, debido a los procesos de secado a los que se someten los granos antes de su comercialización, las semillas suelen presentar un contenido en humedad cercano al 10%, el cual garantiza su conservación durante su transporte y almacenamiento (Abdalla *et al.*, 1997; Baryeh *et al.*, 2002; Hulse *et al.*, 1980; Kasaoka *et al.*, 1999; Taylor, 2004). El componente mayoritario del mijo fueron las materias extractivas libres de nitrógeno (MELN), las cuales representaron $\sim 77\%$ del extracto seco de la semilla, valores dentro de lo descrito previamente por otros autores (59,8-90,6%). Las MELN están representadas principalmente por almidón, el principal carbohidrato de los mijos ($\sim 55-70\%$), el cual se encuentra mayoritariamente en el endospermo harinoso de la semilla y contiene el 20-22% de amilosa (Cassandra *et al.*, 2002; Lestienne *et al.*, 2007; Muralikrishna *et al.*, 1986). La fibra bruta estuvo representada por $\sim 3\%$, componente que suele estar comprendido entre el 0,9 y 3,6% en este cereal (Lestienne *et al.*, 2007; Kulp *et al.*, 2000). Esta fracción se encuentra, principalmente, en las capas que recubren la semilla, por lo que durante el descascarillado del cereal (operación habitual en la producción de harina) se perderá aproximadamente la mitad de su contenido (Lestienne *et al.*, 2007).

El porcentaje proteico de la semilla fue del 10,63%, corroborando que el mijo perla es uno de los mijos más ricos en proteína. Normalmente, su contenido en proteína oscila entre el 7 y 21%, dependiendo en gran parte de las características ambientales del cultivo y de la variedad de mijo. Este cereal contiene bajos niveles de los aminoácidos

esenciales lisina (3,3%), triptófano (1,6%) y treonina (3,9%), aunque en comparación con otros mijos, se caracteriza por presentar altos porcentajes en estos componentes (Abdalla *et al.*, 1997; Chandna *et al.*, 1990; Kulp *et al.*, 2000; Lestienne *et al.* 2007; Opoku *et al.*, 1981).

También destacó el alto contenido en grasa del mijo, de ~ 8%, similar al descrito por otros autores, en el mijo perlado (3-7,4%) (Abdalla *et al.*, 1997; Kasaoka *et al.*, 1999; Hulse *et al.*, 1980; Taylor, 2004). El perfil de la grasa está definido por los ácidos grasos insaturados linoleico (44-46%), oleico (~ 26%) y palmítico (19-20%). Por este motivo, después de su molturación del grano, la harina suele desprender con mucha rapidez olores a rancio, debido a los procesos de oxidación de esta grasa por la alta actividad enzimática del producto y la carencia de suficientes antioxidantes naturales en la semilla.

Tabla 6.2. Composición (% en base seca) de la semilla de mijo perla.

Parámetro analizado	(%)¹
Humedad	11,72 ± 0,04
MELN	77,11 ± 0,91
Proteína Bruta	10,63± 0,04
Grasa	7,92 ± 0,52
Fibra Bruta	2,93 ± 0,12
Cenizas	1,39 ± 0,02
Fitatos	0,29 ± 0,03
Taninos (mg/100g)	0,57 ± 0,02
Inhibidores trísicos (TIU/g)	11,47 ± 0,13

¹ Media ± desviación estándar.

Por lo que refiere a su composición en minerales, el porcentaje de cenizas de la semilla (~ 1,39%) también estuvo dentro de lo descrito por otros autores (0,3 - 5,1%) (Taylor, 2004). El mijo perla destaca por su riqueza en los minerales P, K, Fe, Zn y Ca, aunque su absorción se puede ver afectada por la presencia de factores antinutricionales, como son los fitatos o los polifenoles (Lestienne *et al.*, 2007).

La Tabla 6.3 muestra el porcentaje de los factores antinutricionales fitatos, taninos e inhibidores trísicos determinados en la semilla de mijo que se caracterizó en este estudio.

El contenido medio en fitatos fue del 0,29%. Otros autores obtuvieron valores similares en sus experimentos (Simwemba *et al.*, 1984) aunque también encontramos referencias de mijos de la misma especie que presentan contenidos en fitatos de hasta ~ 0,72% (Lestienne *et al.*, 2005). En el grano de mijo, los fitatos se localizan mayoritariamente en el germen (60%) y endospermo (30%) de la semilla, encontrándose en una menor cantidad en el salvado (10%) (Abdelrahmann *et al.*, 1984). Estos compuestos se encuentran en abundancia en los granos de cereales, actuando como agentes quelantes de cationes divalentes y limitando su absorción. Entre otros, la hidratación y germinación del grano son etapas en las cuales se consigue reducir exitosamente su contenido, mejorando de este modo la calidad nutricional del grano (Lestienne *et al.*, 2005; Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000).

Los taninos son compuestos fenólicos que se encuentran en la cubierta de la semilla. En el grano de mijo estudiado, se determinó un contenido en taninos correspondiente a 0,57 mg/100 g de materia seca. Estos componentes constituyen uno de los factores antinutricionales de importancia en los mijos, ya que inhiben la actividad de algunos enzimas digestivos y, en consecuencia, la digestibilidad de diferentes nutrientes. En mijo perla, Nithya *et al.* (2006) determinaron una cantidad de taninos ligeramente superior a la observada en este estudio, del 1,52%, mientras que Osman (2011) obtuvieron un porcentaje del 0,01%. En mijo africano (*Eleusine coracana*), Mbithi-Mwikya *et al.* (2000) observaron que el proceso de germinación de la semilla se presentaba como alternativa para reducir su porcentaje de taninos, incrementando la biodisponibilidad de los nutrientes en el grano. Osman (2011) también observaron una reducción del porcentaje de taninos en mijo perla fermentado el cereal.

En cuanto a la presencia de inhibidores trísicos, en este estudio se obtuvieron unos valores de ~ 11,5 TIU/g de mijo. Estos compuestos constituyen uno de los inhibidores de enzimas naturales de las plantas, comúnmente detectado en los mijos en concentraciones variables (Osman, 2011). Chandrasekher *et al.* (1982) aislaron dos tipos de inhibidores trísicos en mijo perla, cuyos valores de TIU correspondieron a 12 y 36 TIU/g de semilla, respectivamente. Entre otros, este componente se inhibe

fácilmente con el calor, así como también se ha observado una reducción de su actividad con la germinación del grano (Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000).

6.2.1.3. Estudio de germinación del mijo

Con la hidratación y germinación del grano de mijo, el contenido en fitatos, taninos e inhibidores trísicos de la semilla disminuyó significativamente ($P < 0,05$). La Figura 6.2 muestra dos imágenes de los granos de mijo germinados durante (A) 24 y (B) 48 h, respectivamente. Después de 12 h de hidratación de los granos, su contenido en fitatos se redujo $\sim 17,6\%$, incrementándose esta disminución en $\sim 40\%$ con el proceso de germinación. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la cantidad de fitatos del mijo entre las 24 y 48 h de germinación. Mbithi-Mwikya *et al.* (2000) observaron reducciones similares en el contenido en ácido fítico en mijo africano (*Eleusine coracana*) germinado bajo las mismas condiciones de este estudio. Estas reducciones son supuestamente debidas a la activación de las fitasas endógenas del grano, enzimas que durante su hidratación y germinación hidrolizan el ácido fítico de la semilla, mejorando la biodisponibilidad de minerales del grano (Agte *et al.*, 1997).

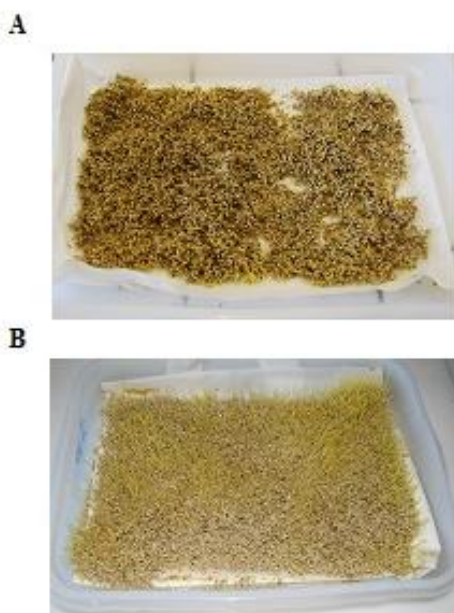


Figura 6.2. Semillas de mijo germinadas en el laboratorio durante (A) 24 y (B) 48 h.

El porcentaje de taninos del grano también disminuyó con la hidratación y posterior germinación de la semilla, disminución directamente proporcional al tiempo de germinación (Figura 6.3). Durante la hidratación de los granos, esta disminución (~ 28,7%) se podría atribuir tanto a la solubilización de los taninos en el medio de hidratación, como al incremento de la hidrólisis enzimática de los polifenoles (Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000). Después de 48 h de germinación, la reducción del contenido en taninos del grano fue del 63,2%. Algunos autores atribuyen esta reducción a la formación de asociaciones hidrofóbicas entre los taninos, las proteínas y las enzimas presentes en las semillas, más que a la pérdida o degradación de los taninos *per se* (Butler *et al.*, 1973; Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000).

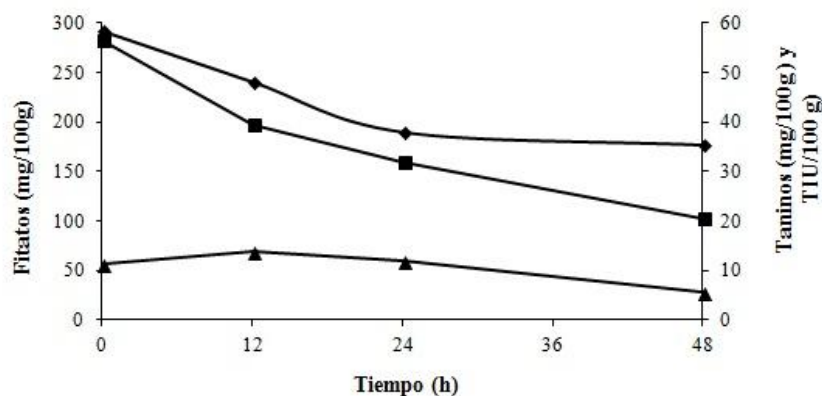


Figura 6.3. Cambios en el contenido en fitatos (◆, mg/100 g), taninos (■, mg/100 g) y actividad trípica (▲, TIU/100 g) durante la germinación del mijo a 30 °C. Resultados expresados sobre materia seca.

Después de las 48 h de germinación, la actividad del inhibidor de tripsina también disminuyó significativamente ($P < 0,05$), aproximadamente un 50% del valor inicial (Figura 6.3). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el contenido en TIU del grano seco y el germinado durante 24 h. Algunos estudios apuntan que, durante la germinación del grano, la parte vegetativa de la planta puede sintetizar de nuevo a este inhibidor después de ser degradado en el endospermo de la semilla (Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000).

6.2.1.4. Fraccionamiento proteico

Los resultados obtenidos en la extracción de las diferentes fracciones proteicas del mijo se exponen en la Tabla 6.3. El porcentaje de nitrógeno obtenido en el residuo insoluble fue elevado, de ~ 60%, porcentaje similar al descrito previamente en la literatura por otros autores (Chandna *et al.*, 1990; Ramachandra *et al.*, 1978; Ravindran, 1992). Como se puede observar, las prolaminas representaron la fracción proteica mayoritaria (~ 16%), seguidas por las fracciones de albúminas (+ NNP) (~ 11,7%), glutelinas (~ 6,3%) y globulinas (~ 5%).

Tabla 6.3. Fracciones proteicas del mijo según la clasificación propuesta por Osborne.

Fracciones proteicas	(%)¹
Albúminas (+ NNP)	11,70 ± 0,06
Globulinas	4,69 ± 0,34
Prolaminas	15,94 ± 0,21
Glutelinas	6,30 ± 0,54
Residuo Insoluble	61,35 ± 0,34

¹ Media ± desviación estándar.

Las prolaminas constituyen la fracción mayoritaria de las proteínas de reserva de la mayoría de cereales, debiéndose su nombre a su contenido en los aminoácidos prolina y glutamina (Osborne *et al.*, 1914). Los valores obtenidos en este estudio difirieron de los descritos por Chandna *et al.* (1990) en sus estudios con cuatro variedades de mijo perla diferentes, en los que observaron que el ~ 75% del total de las fracciones proteicas obtenidas correspondían a la suma de las fracciones de prolaminas y glutelinas. Ramachandra *et al.* (1978), en mijo africano (*Eleusine coracana*), también describieron que las fracciones mayoritarias del grano estaban representadas por las prolaminas (22,1-29,7%) y las glutelinas (14,5-16,2%).

Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio podrían deberse al método de solubilización, así como también a que en este estudio se cuantificó el nitrógeno no proteico (NNP) (cuyo contenido en los mijos no es despreciable) junto a la fracción de albúminas, por lo que esta fracción fue la segunda

en importancia. Ravindran (1992) determinó la cantidad de NNP de tres especies de mijo diferentes (*Eleusine coracán*, *Panicum miliaceum* y *Stearia itálica*) y observó que el NNP determinado correspondía al 17,3, 12,5 y 17%, respectivamente, del nitrógeno total. Por ello, estos autores destacaron la sobreestimación del contenido total de proteína de los mijos (de ~ 1-3%) cuando se contabiliza el NNP de la semilla como proteína verdadera.

6.2.1.5. Electroforesis SDS-PAGE

La Figura 6.4 muestra las fracciones proteicas separadas mediante el gel de electroforesis SDS-PAGE. Como se puede observar, la fracción que más variedad de polipéptidos presentó correspondió a las albúminas (+NNP), seguida por las globulinas, las glutelinas y las prolaminas. Se observaron bandas de igual peso molecular en las diferentes fracciones solubilizadas, siendo la mayoría de estas de peso molecular inferior a los 65 kDa. Chandna *et al.* (1990) observaron resultados similares a los descritos en este estudio en sus estudios con mijo perla.

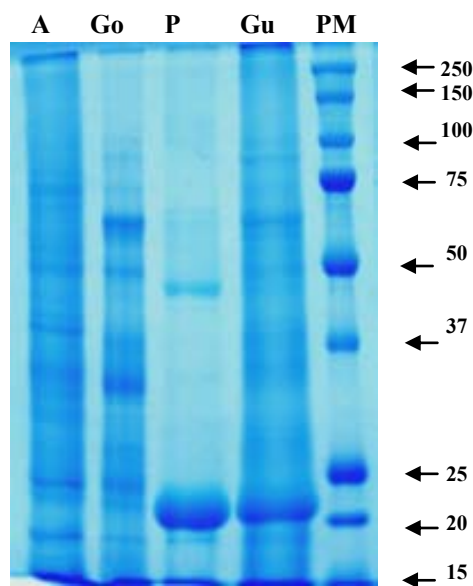


Figura 6.4. Gel de electroforesis SDS-PAGE de las fracciones aisladas. A: Albúminas + NNP; Go: Globulinas; P: Prolaminas; Gu: Glutelinas; PM: Marcador de peso molecular, correspondiente a 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa.

La fracción de albúminas (+NNP) presentó una gran variedad de bandas de diferente peso molecular, comprendidas principalmente entre los 17 y 72 kDa. Destacaron con mayor intensidad las bandas correspondientes a los pesos moleculares 20,6, 25, 30, 34, 50, 67 y 72 kDa. Por encima de los 72 kDa, se observaron dos bandas muy difusas, de pesos moleculares correspondientes a los 76 y 97 kDa. La fracción de globulinas también estuvo representada por diferentes polipéptidos, algunos de igual peso molecular que los determinados en la fracción de albúminas. Se identificaron dos bandas de mayor intensidad a 22,5 y ~ 56 kDa, observándose también la presencia de bandas más difusas entre los 34-38 kDa y los 76-102 kDa. Las prolaminas fueron las que presentaron polipéptidos de menor variabilidad de pesos moleculares (19, 21, 26, 44, 108 y 206 kDa). Chandna *et al.* (1990) aislaron un solo tipo de polipéptido en la fracción de prolaminas de mijo perla (de 25-26 kDa), destacando también la poca variabilidad de péptidos de diferente peso molecular que tiene esta fracción, en comparación con las prolaminas de otros cereales. A diferencia de las otras fracciones, por su intensidad y grosor, destacaron las bandas de peso molecular correspondiente a 21 y ~ 44-47 kDa. En la literatura, otros autores ya describieron la existencia de una prolamina de peso molecular ~ 20-25 kDa en diferentes especies de mijos, que en el caso del mijo perla, se correlaciona con una posible actividad antifúngica (Parameswaran *et al.*, 1997).

Las glutelinas también presentaron una gran variedad de bandas de pesos moleculares diferentes, comprendidos entre los 21 y 100 kDa, de las cuales destacaron los polipéptidos de peso molecular correspondiente a 34,7, 50 y 62 kDa. En los mijos, esta fracción suele presentar un gran número de polipéptidos de pesos moleculares muy variables (6-50 kDa) (Ramachandra *et al.*, 1978).

6.2.2. Estandarización del proceso de elaboración de un licuado de chufas de composición mejorada

En este estudio se decidió elaborar un licuado en base a chufa y mijo cuyo porcentaje en proteína fuera $\geq 1,5\%$, en grasa del $\sim 3,5\%$ y de $\sim 18\%$ de extracto seco.

Para ello, se partió de una de las chufas caracterizadas en el *Capítulo 4* de esta Tesis (CHB1) y del mijo caracterizado en el apartado anterior. Aunque en el estudio de

germinación del mijo quedó demostrada la efectividad de esta etapa en la reducción de los factores antinutricionales de la semilla, en el desarrollo del licuado vegetal se trabajó con mijo sin germinar. Considerando que la aplicación del tratamiento térmico de higienización del producto también puede reducir la cantidad de factores antinutricionales en los granos, en este estudio se dejó abierta la posibilidad de estudiar de si bajo las condiciones de elaboración del licuado de chufa y mijo, la etapa de germinación del mijo perla sería o no fundamental desde un punto de vista nutricional.

Para la estandarización del proceso de elaboración del licuado de chufa y mijo se realizaron tres etapas de trabajo diferentes: una *primera etapa* para definir el formato de adición de las materias primas chufa y mijo (en forma de harina o en base a licuado del grano), una *segunda etapa* cuyo objetivo fue la estandarización del proceso de elaboración del licuado y por último, una *tercera etapa* para la aplicación de un tratamiento térmico de higienización al producto.

6.2.2.1. Forma de adición de las materias primas chufa y el mijo

En esta primera etapa se contemplaron tres opciones para la adición de las materias primas chufa y mijo (en la etapa de molturación-extracción de la elaboración del licuado): trabajar con (1) los dos granos enteros, (2) harina de mijo y licuado de chufa, y (3) chufas hidratadas y licuado de mijo.

Por lo que refiere a la primera opción de trabajo, en las pruebas preliminares realizadas en el laboratorio se observó que, en la mezcla con agua, la harina de mijo dificultaba considerablemente la molturación de las chufas, limitando a la vez la extracción de los componentes de la semilla, por lo que esta opciones no se tuvo en consideración en adelante. La segunda y tercera opción de trabajo (molturación de chufas hidratadas con harina de mijo o maceración de la harina de mijo con licuado de chufa) se presentaron viables desde un punto de vista de la fabricación en planta. La Tabla 6.4 muestra los resultados de composición obtenidos en estos dos ensayos. Como se puede observar, el pH de todos los licuados fue similar, aunque los licuados elaborados a partir de licuado de mijo presentaron valores de pH ligeramente inferiores.

En todos los casos, el incremento de la proporción de chufa o mijo aumentó el contenido en sólidos totales, grasa y proteína del producto final. Todos los licuados elaborados presentaron un contenido en sólidos totales y grasa superior a lo pre-establecido en un inicio, aunque por el contrario, el contenido en proteína mínimo requerido tan solo se obtuvo partiendo de licuado de chufa y harina de mijo, bajo las proporciones de 1:3 y 1:5.

Por ello, en adelante se decidió trabajar con licuado de chufa y harina de mijo, a la proporción 1:3. El alto contenido en sólidos totales y grasa del licuado apuntó a la necesidad de reducir la proporción de estos dos componentes en la bebida final, por lo que se contemplaron las etapas de desludado y desnatado del producto en el proceso de elaboración del licuado en la Planta Piloto de la UAB.

Tabla 6.4. Composición de los licuados de mijo y chufa obtenidos en el laboratorio.

Ensayo	Licuado ¹	Parámetros determinados ²			
		pH	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
A	<i>Licuado de chufa</i>	6,67 ± 0,01	11,73 ± 0,15	2,50 ± 0,20	0,93 ± 0,03
	1:3	6,47 ± 0,02	28,45 ± 0,14	7,05 ± 0,30	1,79 ± 0,02
	1:5	6,52 ± 0,01	26,04 ± 0,25	6,02 ± 0,40	1,55 ± 0,04
	1:10	6,62 ± 0,01	20,82 ± 0,08	4,01 ± 0,30	1,19 ± 0,01
B	<i>Licuado de mijo</i>	6,96 ± 0,03	16,20 ± 0,10	4,90 ± 0,01	0,85 ± 0,01
	1:3	6,67 ± 0,01	21,69 ± 0,23	7,03 ± 0,15	1,18 ± 0,05
	1:5	6,73 ± 0,02	20,37 ± 0,11	6,04 ± 0,10	1,16 ± 0,03
	1:10	6,72 ± 0,01	18,18 ± 0,16	5,06 ± 0,03	0,88 ± 0,03

¹Proporciones de harina y licuado de 1:3, 1:5 y 1:10 (p:v).

²Media ± desviación estándar.

6.2.2.2. Estandarización del diagrama de elaboración del licuado

Para la estandarización del diagrama de elaboración del licuado se utilizaron las instalaciones de la Planta Piloto de la UAB. La Tabla 6.5 muestra la composición de los productos obtenidos después de las diferentes operaciones a las que se sometió el licuado. Como se puede observar, con la operación de desludado se consiguió eliminar ~ 54% de los sólidos totales del producto, principalmente de naturaleza insoluble (fibras

y almidón). Con esta operación, los contenidos en grasa y proteína del licuado también disminuyeron ~ 12 y 23%, respectivamente.

Tabla 6.5. Composición del licuado después de la secuencia de operaciones realizadas en la etapa 3.

Licuado ²	Parámetros determinados ¹			
	pH	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
LCH	6,96 ± 0,02	16,17 ± 0,52	5,03 ± 0,01	0,85 ± 0,02
LCHm	6,39 ± 0,05	23,19 ± 0,86	7,05 ± 0,02	2,06 ± 0,05
LCHm _d	6,54 ± 0,04	13,33 ± 1,31	6,20 ± 0,10	1,59 ± 0,07
LCHm _{d+d}	6,65 ± 0,01	10,77 ± 0,04	3,50 ± 0,05	1,51 ± 0,03

¹Media ± desviación estándar.

²LCH: licuado de chufa; LCHm: licuado de chufa y mijo; LCHm_d: licuado de chufa y mijo desludado; LCHm_{d+d}: licuado de chufa y mijo desludado y desnatado.

Con el desnatado del producto se consiguió estandarizar los porcentajes de grasa y proteína a los previamente establecidos (3,5 y 1,5%, respectivamente), pero por el contrario, la reducción en sólidos totales fue excesiva, siendo el porcentaje de este componente en el licuado final inferior al deseado (del ~ 10,8% respecto al 18% establecido). A parte, debido a la gran cantidad de almidón del licuado de chufa y mijo, tecnológicamente, la operación de desludado del producto no se presentó como una operación de *fácil ejecución en planta*, por lo que se decidió introducir algunos cambios en la secuencia de operaciones a seguir. Se planteó estandarizar el contenido en sólidos totales y grasa del licuado de chufa previamente a la adición de la harina de mijo, para mejorar tecnológicamente el proceso de desludado del producto, así como trabajar bajo las proporciones de harina:licuado de 1:3, 1:3.5 y 1:4. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 6.6.

Según esta secuencia de operaciones, el manejo del licuado de chufa durante el desludado y desnatado del producto mejoró respecto al ensayo anterior. La operación de desludado del producto disminuyó un porcentaje importante los sólidos totales del producto (~ 43%), así como el contenido en proteína del licuado (~ 15,5%). El porcentaje en grasa del licuado prácticamente quedó igual. Con el desnatado del producto ya desludado se estandarizó su contenido en grasa al 3,5%, observándose una reducción en los contenidos en sólidos totales y proteína del licuado (~ 11 y 1%,

respectivamente). Con la adición de harina de mijo en el producto, el porcentaje en sólidos totales y proteína de los licuados mejoró, no observándose grandes diferencias entre el contenido graso de los licuados desnatados y con harina de mijo añadida (LCH_{d+d} y LCHm_{d+d}) (Tabla 6.6). El licuado final que presentó unas características de composición dentro de lo establecido en la premisa inicial, fue el licuado elaborado a partir de la proporción harina:licuado de 1:4, por lo que se decidió estandarizar el proceso de obtención de este producto en base a esta proporción.

Tabla 6.6. Composición del licuado después de la secuencia de operaciones realizadas en la *etapa 4*.

Licuado ²	Parámetros determinados ¹			
	pH	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
LCH	6,62 ± 0,05	15,55 ± 0,34	5,33 ± 0,11	0,84 ± 0,02
LCH _d	6,88 ± 0,06	8,88 ± 0,36	5,25 ± 0,08	0,71 ± 0,09
LCH _{d+d}	6,91 ± 0,03	7,80 ± 0,20	3,50 ± 0,07	0,70 ± 0,03
LCHm _{d+d} (1:3)	6,37 ± 0,06	21,68 ± 0,68	3,60 ± 0,08	1,88 ± 0,04
LCHm _{d+d} (1:3.5)	6,38 ± 0,04	19,77 ± 0,56	3,58 ± 0,05	1,66 ± 0,03
LCHm _{d+d} (1:4)	6,42 ± 0,03	17,87 ± 0,31	3,53 ± 0,03	1,50 ± 0,04

¹Media ± desviación estándar.

²LCH: licuado de chufa; LCHm: licuado de chufa y mijo; LCHm_d: licuado de chufa y mijo desludado; LCHm_{d+d}: licuado de chufa y mijo desludado y desnatado, bajo las proporciones de harina de mijo:licuado de chufa de 1:3, 1:3.5 y 1:4. .

6.2.3. Aplicación de un tratamiento de higienización al licuado de chufa y mijo

El licuado obtenido se sometió a un tratamiento de pasteurización (90 °C durante 30 s) con previa homogenización del producto a doble etapa (18 + 2 MPa). Previamente al tratamiento térmico, se añadió la cantidad del 2% de emulgente y 1% de estabilizante al licuado, así como también un enzima amilásico que evitó la gelificación del almidón con el tratamiento térmico que se aplicó al licuado (ver *Capítulo 3, apartado xxx*).

La aplicación del tratamiento térmico no modificó la composición (sólidos totales, grasa y proteína) del licuado de chufa y mijo crudo (Tabla 6.7). Por el contrario, el valor del pH del producto final fue ligeramente superior al del producto crudo, probablemente debido al efecto regulador de pH de las sales estabilizantes que se añadieron. Con el

reposo, en los productos apareció cierta desestabilización física en el licuado, principalmente debida a la migración de las partículas más densas hacia el fondo del envase.

Los valores obtenidos en el color en las coordenadas triestímulo fueron $L^* = 59,283 \pm 0,521$, $a^* = 1,642 \pm 0,276$ y $b^* = 18,613 \pm 0,257$. En comparación con un licuado de chufa, el color del producto oscureció, probablemente debido a la harina de mijo que se añadió y al efecto del tratamiento de pasteurización térmica sobre los componentes del producto. El comportamiento reológico del producto pasteurizado correspondió a un comportamiento de flujo Newtoniano, cuyo valor de viscosidad fue de $5,05 \pm 1,03$ mPa/s, algo superior a la descrita en licuados de soja o chufa (1,5 - 4 mPa/s) (Cruz, 2008; Schwart *et al.*, 1985).

Tabla 6.7. Composición del licuado de chufa y mijo después de la aplicación de cada operación.

Licuado ¹	Parámetros determinados ²			
	pH	Sólidos totales (%)	Grasa (%)	Proteína (%)
LCH_{d+d} + mijo	6,37 ± 0,04	18,09 ± 0,55	3,52 ± 0,05	1,56 ± 0,02
LH-P	7,00 ± 0,08	17,96 ± 0,37	3,54 ± 0,02	1,53 ± 0,03

¹ LCH_{d+d} + mijo: licuado de chufa desludado y desnatado con mijo, a la proporción 1:4. LH-P: licuado homogenizado y pasteurizado (18+2 MPa, 90 °C, 30 s).

²Media ± desviación estándar.

El producto también se evaluó sensorialmente por cinco catadores, los cuales destacaron de manera unánime el sabor herbáceo de la bebida, debido principalmente al mijo y a la no adición de azúcar ni aditivos enmascaradores del sabor. En poblaciones africanas en las que el mijo constituye un ingrediente básico, es tradición añadir diferentes tipos de especias (diente de león, regaliz de jengibre, pimienta de cocodrilo, etc.) o azúcar a los productos elaborados en base a este cereal, mejorando así su perfil organoléptico y apetecibilidad (Belewu, 2006).

6.3. Conclusiones

Las características físico-químicas del mijo que se utilizó en este estudio coincidieron en gran parte con las descritas para este tipo de mijo. Las semillas presentaron una forma cono-esférica, y se caracterizaron por su alto contenido en MELN (~ 77%) y proteína (~ 10,6%). Esta proteína se caracterizó por la presencia de la fracción de prolaminas, la cual representó ~ 16% del total de fracciones aisladas. Se observaron bandas de igual peso molecular en las diferentes fracciones solubilizadas, siendo la mayoría de estas de peso molecular inferior a los 65 kDa. Con la germinación (y previa hidratación) de la semilla, su contenido en fitatos, taninos e inhibidores de tripsina se redujo notablemente (~ 40, ~ 63 y ~ 50%), por lo que confirmó la efectividad de esta operación en la obtención de mijos con niveles reducidos en factores antinutricionales, mejorados nutricionalmente para su utilización como ingredientes base en la elaboración de productos derivados.

La utilización del mijo como fuente de proteína para la obtención de un licuado de chufa de composición mejorada (sólidos totales, grasa y proteína) se presentó como una opción de viable realización, aunque el proceso tecnológico de elaboración de este licuado fuera complejo. El licuado elaborado a partir de licuado de chufas y harina de mijo bajo la proporción 1:4 fue el que presentó una composición deseada. Las operaciones de deslodado y desnatado del producto se consideraron esenciales para la obtención de este producto, caracterizado por su color amarillento y sabor herbal. La adición de aditivos estabilizantes al producto no fue suficiente para la estabilización física del licuado después de la aplicación del tratamiento de homogenización-pasteurización. Estudio concluyó con la realización de las pruebas preliminares del desarrollo de este licuado, por lo que se considera que sería necesario realizar más ensayos para definir y mejorar su perfil organoléptico y físico-químico, así como determinar la evolución de sus características durante su conservación en refrigeración.

Capítulo 7

Evaluación del efecto de la ultra alta presión homogenización en la horchata de chufa cruda, en comparación con el tratamiento de homogenización-pasteurización convencional

Evaluación del efecto de la ultra alta presión homogenización en la horchata de chufa cruda, en comparación con el tratamiento de homogenización-pasteurización convencional

7.1. Introducción

La horchata de chufa es un producto nutritivo, típico de la región de Valencia, que habitualmente se consume en época estival. Sus componentes mayoritarios son los hidratos de carbono (~ 10%) y las grasas (~ 2%), y contiene un bajo porcentaje en proteína (< 1%). Diferentes autores han descrito las propiedades nutricionales asociadas al consumo de este licuado, principalmente por el perfil de sus grasas (caracterizado por los ácidos grasos oleico y linoleico), así como también por su contenido en fibra, minerales y enzimas (Alegría-Torán, 2003; Bixquert, 2006; Chukwuma *et al.*, 2010).

En los últimos años, el mercado de la horchata de chufa ha incrementado notablemente. Si bien este producto se consumía preferentemente en la Comunidad Valenciana, actualmente se consume en todo el territorio español y las exportaciones de horchata y maquinaria para la elaboración de este licuado se han ampliado hacia otros países del mundo (CRCV, 2014; Tigernuts Traders, 2004).

La elevada contaminación microbiológica del tubérculo, sus enzimas endógenos, así como la composición y pH próximo a la neutralidad del licuado hacen de la horchata una bebida altamente perecedera (Cortés *et al.*, 2004). Cabe tener en cuenta que a temperatura ambiente la alteración del licuado puede darse en menos de 12 h (Morell *et al.*, 1986). Por ello, la aplicación de tratamientos de conservación es fundamental para garantizar una mínima vida útil a este licuado. Tradicionalmente, el sistema de conservación de la horchata de chufa ha sido la refrigeración, condiciones bajo las cuales el licuado aumentaba su vida útil en 2-3 días y mantiene, en gran parte, sus características sensoriales y nutricionales. La limitación de esta tecnología para la venta al mayor y exportación de este producto desencadenó la aplicación de otras tecnologías de conservación en la horchata de chufa, entre las que destacan las tecnologías térmicas de pasteurización y esterilización. Estos tratamientos son esenciales para aumentar la

durabilidad del producto en el tiempo, y a su vez, mejorar su estabilidad físico-química, junto con la utilización de diferentes aditivos estabilizantes (emulgentes, correctores de la acidez, etc.).

Debido a la creciente demanda por parte del consumidor de productos cada vez más parecidos a sus homólogos crudos y con los mínimos aditivos añadidos, la industria de las bebidas busca tecnologías que permitan aumentar la vida útil de los productos, estabilizándolos y alternado al mínimo sus características organolépticas y nutricionales.

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la homogenización a ultra alta presión (UHPH) sobre las características de la horchata de chufa cruda, en comparación con el tratamiento térmico de pasteurización convencional. También se pretendió evaluar el efecto de añadir aditivos estabilizantes (emulgente y regulador del pH) en la horchata homogenizada-pasteurizada convencionalmente, en comparación con los productos crudo, homogenizado-pasteurizado convencionalmente sin aditivos y los homogenizados a ultra alta presión.

Para ello, se elaboraron cinco horchatas de chufa diferentes: una horchata cruda, dos horchatas homogenizadas-pasteurizadas convencionalmente bajo el mismo tratamiento térmico (80 °C, 15 s), con y sin la adición de aditivos estabilizantes (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), y dos horchatas homogenizadas a ultra alta presión, a dos presiones de trabajo diferentes (200 y 300 MPa, a $T_i = 40$ °C en ambos casos) (ver *Capítulo 3, apartado 3.4*). Después de su elaboración y procesado, todos los licuados se analizaron desde un punto de vista microbiológico, físico-químico y organoléptico, según se describe en el *apartado 3.5 del Capítulo 3*.

7.2. Resultados y discusión

7.2.1. Incremento de la temperatura del licuado con los tratamientos de pasteurización y UHPH

Los tratamientos térmicos de pasteurización convencional se realizaron bajo las condiciones que se exponen a continuación. En el equipo de tratamiento térmico, el producto se sometió a una primera retención (ver *Capítulo 3, apartado 3.2*) a la temperatura de $61,3 \pm 0,6$ °C, durante 1 min, la cual contribuye a la estabilidad físico-

química de los productos tratados térmicamente. Posteriormente, después de su homogenización (18 + 4 MPa), el producto se pasteurizó a $80,7 \pm 0,1$ °C, durante 15 s. La temperatura del producto a la salida del equipo fue de $20,3 \pm 0,3$ °C.

La Tabla 7.1 muestra los datos relacionados con las temperaturas registradas durante los tratamientos de UHPH a 200 y 300 MPa. Como se puede observar, las temperaturas de entrada del producto en el equipo (T_i) fueron de ~ 40 °C en ambos casos.

Tabla 7.1. Cambios de temperatura registrados en las horchatas durante el tratamiento de UHPH.

Tratamiento (MPa)	Temperatura registrada (°C) ^{1,2}			
	T_i	T_1	T_2	T_o
200	$40,2 \pm 0,2$	$55,9 \pm 2,1$	$92,1 \pm 1,7$	$15,3 \pm 1,1$
300	$40,4 \pm 0,3$	$58,5 \pm 3,1$	$116,3 \pm 4,3$	$17,1 \pm 1,6$

¹ T_i temperatura de entrada; T_1 = temperatura antes de la válvula de UHPH; T_2 = temperatura a la salida de la válvula de UHPH; T_o = temperatura de salida del equipo.

² Todos los datos corresponden a la media de la temperatura (\pm desviación estándar) de los valores obtenidos en 3 experimentos independientes.

En el equipo, la temperatura del producto incrementó de manera lineal durante ambos tratamientos, obteniéndose un incremento de $24,2$ °C por cada 100 MPa en el intervalo de presiones comprendido entre los 200 y 300 MPa ($T_i = 40$ °C). Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores en diferentes productos tratados por UHPH. En el mismo equipo de homogenización utilizado en este estudio, Poliseli-Scopel *et al.* (2012), Pereda *et al.* (2007) y Suárez-Jacobo *et al.* (2010) han descrito incrementos de temperatura de ~ 20 °C/100 MPa en licuado de soja, leche o zumo de manzana, respectivamente. Este incremento de temperatura se atribuye al calor generado en el equipo consecuencia de los fenómenos físicos de turbulencia, esfuerzo cortante, cavitación, etc., a los que el producto es sometido en su paso por la válvula de homogenización (Hayes *et al.*, 2003; Thiebaud *et al.*, 2003).

A la salida de la válvula de homogenización (T_2), el producto rápidamente se enfrió mediante su paso a través de un intercambiador térmico. La brusca bajada de

temperatura hizo que la horchata estuviera durante un período de tiempo muy corto (de $\leq 0,5$ s) a la temperatura T_2 (Tabla 7.1), por lo que el efecto térmico sobre el producto se consideró insignificante en comparación con los tratamientos térmicos convencionales.

7.2.2. Composición de las horchatas

La composición de las horchatas se expone en la Tabla 7.2. La aplicación de los tratamientos de higienización no modificó la composición básica de los licuados, en comparación con el producto sin tratar (horchata cruda). Todas las horchatas cumplieron con los requisitos de composición establecidos en la *Reglamentación Técnico-Sanitaria (RTS) para la elaboración y venta de horchata de chufa* (BOE, 1988), aunque algunas de ellas estuvieron cercanas al límite de lo establecido en la reglamentación, sobre todo en referencia al contenido graso y °Brix (mínimo 12% de sólidos totales, expresados como °Brix a 20 °C, y 2% de grasa).

Tabla 7.2. Composición (%) de las horchatas elaboradas en este estudio.

	Licuado ^{1,2}				
	Cruda	P1	P2	200	300
°Brix	11,80 ^b ± 0,27	13,90 ^a ± 0,89	14,00 ^a ± 0,71	13,20 ^a ± 0,27	12,90 ^{ab} ± 0,65
ST³	12,99 ^a ± 0,18	12,63 ^a ± 0,26	13,26 ^a ± 0,81	12,70 ^a ± 0,43	12,93 ^a ± 0,41
MELN³	10,30 ^a ± 0,60	10,15 ^a ± 0,43	10,54 ^a ± 0,77	10,12 ^a ± 0,43	10,25 ^a ± 0,51
Grasa	2,01 ^a ± 0,02	2,07 ^a ± 0,04	2,03 ^a ± 0,07	2,02 ^a ± 0,06	1,97 ^a ± 0,08
Proteína	0,54 ^a ± 0,02	0,51 ^{ab} ± 0,02	0,50 ^{ab} ± 0,02	0,50 ^{ab} ± 0,01	0,48 ^b ± 0,03
Cenizas	0,13 ^a ± 0,01	0,15 ^a ± 0,01	0,15 ^a ± 0,01	0,10 ^a ± 0,02	0,15 ^a ± 0,05
pH	7,02 ^b ± 0,19	7,11 ^b ± 0,13	7,37 ^a ± 0,08	7,21 ^b ± 0,13	7,16 ^b ± 0,15

¹ Media ± desviación estándar.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

³ ST: Sólidos totales; MELN: Materias extractivas libres de nitrógeno.

^{a-b} En la misma fila, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los carbohidratos, representados por las MELN, constituyeron el componente mayoritario de las horchatas (~ 10%), seguidos por la grasa (~ 2%). Ambos nutrientes

son los principales contribuyentes de su aporte calórico, el cual, en comparación con otras bebidas de origen vegetal, suele ser alto (≤ 400 kcal/L). El contenido en grasa del producto depende del contenido en grasa del tubérculo, así como de la proporción chufa:agua que se utilice. Normalmente, las horchatas del mercado pasteurizadas o esterilizadas suelen contener entre el 1 y 3% en grasa (Consumer, 2014).

Los azúcares libres representan el principal componente de las MELN. Aunque la proporción de chufa:agua que se utiliza en la elaboración de horchatas no es siempre la misma, la cantidad de azúcar que se añade suele estar comprendido entre el 8 y 10%, por lo que el porcentaje de este componente suele ser bastante constante entre las horchatas crudas, pasteurizadas y esterilizadas que se comercializan (10-15%) (Consumer, 2014). En el producto crudo, una parte importante de las MELN está representada por el almidón, el cual se hidroliza enzimáticamente en las horchatas tratadas térmicamente a temperaturas ≥ 70 °C, para evitar su gelificación. En este estudio, la prueba cualitativa de detección de almidón solo dio resultado positivo en el producto crudo (Figura 7.1), indicando la total hidrólisis del almidón en los productos higienizados (homogenizados-pasteurizados y UHPH).

A diferencia del contenido en MELN y grasa, en todas las bebidas destacó su bajo contenido en proteína, comprendido entre el 0,48 y 0,54%. El contenido en proteína de las chufas (~ 3 -8%) y la proporción chufa:agua que la industria horchatera suele utilizar para la elaboración de este licuado (1:8-1:10) hacen que el contenido habitual en proteína de las horchatas pasteurizadas y esterilizadas del mercado sea $< 1\%$ (Consumer, 2014). Por consiguiente, para mejorar la estabilidad física de la horchata de chufa homogenizada y tratada térmicamente, algunos horchateros suelen añadir ligeras cantidades de proteína láctea (en forma de caseinato sódico, mayoritariamente) al producto. Por el contrario, el contenido en proteína de las horchatas *frescas* (o crudas), de elaboración propia y que se suelen vender en horchaterías locales, suele ser más elevado, ya que la proporción chufa:agua que habitualmente utilizan estos horchateros corresponde a las proporciones 1:3-1:5. Con el objetivo de obtener una bebida final más rica en proteína, en la bibliografía, algunos autores proponen la elaboración de licuados en base a chufas y otras fuentes vegetales ricas en este componente (Addy *et al.*, 1984).

El contenido en cenizas del producto también fue muy bajo (0,10-0,15%), el cual, según estudios realizados, está representado principalmente por fósforo, magnesio, potasio, calcio y hierro (Bixquert, 2006; Morell *et al.*, 1983; Varo *et al.*, 1998).

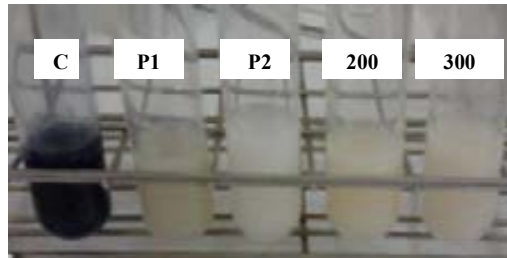


Figura 7.1. Resultado de la prueba cualitativa de detección de almidón en las horchatas. C: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

Diferentes autores han descrito las propiedades nutricionales asociadas al consumo de la horchata de chufa, principalmente por el perfil de sus grasas, pero también por su contenido en fibra y minerales. Se le atribuyen efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades coronarias, diabetes, obesidad y problemas gastrointestinales, así como también destaca por ser una bebida apta para la población celíaca e intolerante a la lactosa (Adejuyitan *et al.*, 2009; Alegría-Torán, 2003; Anderson *et al.*, 2009; Chukwuma *et al.*, 2010).

7.2.3. Recuentos microbiológicos

La Tabla 7.3 muestra los recuentos microbiológicos de las horchatas cruda, homogenizadas-pasteurizadas P1 y P2, y homogenizadas a ultra alta presión (200 y 300 MPa), inmediatamente después de su elaboración y procesado.

Los recuentos de microorganismos mesófilos totales en el producto crudo recién elaborado fueron altos, de 5,37 log ufc/mL, considerando que las chufas y las instalaciones se limpiaron y desinfectaron debidamente (Anónimo, 1999). Esto

evidenciaría la alta carga microbiana con la que los tubérculos suelen llegar a las instalaciones, así como la resistencia de algunas de estas poblaciones a los tratamientos germicidas que se aplicaron. Aún así, estos recuentos estuvieron dentro de lo establecido en la antigua legislación para la venta y consumo de la horchata de chufa (BOE, 1988), la cual establecía su máximo en 7×10^5 ufc/mL de producto crudo. Los elevados recuentos microbianos de la horchata cruda repercuten en su vida útil, normalmente no superior a tres días (Hernández *et al.*, 1967; Monerris *et al.*, 1999). De hecho, la mayor parte de los microorganismos de la horchata de chufa son capaces de crecer en condiciones de refrigeración, lo que explicaría que en este estudio se obtuvieran unos recuentos de microorganismos mesófilos y psicrótrofos muy similares (Tabla 7.3). Por este motivo, muchos horchateros conservan la horchata de chufa cruda a temperaturas muy bajas, comprendidas entre los 0 y 2 °C, aunque debido a que esta bebida se suele distribuir en verano, con frecuencia las condiciones meteorológicas hacen que la temperatura de conservación del producto acabe siendo $\geq 4^\circ\text{C}$.

Tabla 7.3. Recuentos microbiológicos (log ufc/mL) de las horchatas a día 1.

Grupo Microbiano	Tratamientos ^{1,2}				
	Cruda	P1	P2	200	300
Psicrótrofos	5,37 ^a ± 0,33	3,01 ^b ± 0,10	2,80 ^{bc} ± 0,10	3,00 ^b ± 0,11	2,37 ^c ± 0,13
Mesófilos totales	5,51 ^a ± 0,23	2,78 ^b ± 0,25	2,93 ^b ± 0,06	3,03 ^b ± 0,07	2,29 ^c ± 0,17
Esporas mesófilas	2,53 ^a ± 0,23	2,22 ^a ± 0,34	2,18 ^a ± 0,33	2,17 ^a ± 0,45	2,23 ^a ± 0,38
Enterobacterias	2,91 ^a ± 0,15	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b
Lactobacilos	2,58 ^a ± 0,20	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b
Mohos y levaduras	2,87 ^a ± 0,32	nd ^b	nd ^b	nd ^b	nd ^b

¹ Media ± error estándar. nd: no detectable.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} En la misma fila, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los recuentos totales de esporas mesófilas en la horchata cruda también fueron elevados, de 2,53 log ufc/mL. Las altas cantidades de organismos esporulados en la superficie del tubérculo, resistentes a la mayoría de tratamientos germicidas, pasarán fácilmente en su forma vegetativa y se desarrollarán en condiciones de refrigeración,

repercutiendo negativamente sobre la calidad final del licuado. Entre otros, en la horchata se ha descrito la presencia de diferentes esporas del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. brevis* y *B. cereus*), ampliamente encontradas en la naturaleza y caracterizadas por su elevada resistencia a los tratamientos convencionales de higienización, entre los que destaca la pasteurización.

Los recuentos de enterobacterias en la horchata cruda apuntaron que una parte importante de las bacterias del producto podrían ser de origen fecal, procedentes de los estiércoles que se utilizan para abonar la tierra de cultivo y de la posible contaminación de las aguas de riego. Las enterobacterias estuvieron representadas en gran parte por los coliformes ($2,31 \pm 0,30 \log \text{ufc/mL}$) y no se detectó la presencia de *E.coli* en ninguna de las muestras. En la horchata cruda, también se detectaron lactobacilos, unos microorganismos que se suelen encontrar en el terreno de cultivo (Tabla 7.3). Junto con las enterobacterias, estos microorganismos suelen contribuir en el proceso de alteración de la horchata de chufa, ya que son capaces de crecer a bajas temperaturas, fermentando los azúcares del producto con la consiguiente liberación de ácidos y gas. La existencia de unos recuentos importante de hongos y levaduras en la horchata cruda se explicaría por la existencia de cepas resistentes a los tratamientos germicidas que se aplicaron en las chufas, previos a la elaboración de la horchata.

Como se puede observar en la Tabla 7.3, todos los tratamientos de higienización que se aplicaron mejoraron significativamente ($P < 0,05$) la calidad microbiológica del producto base, siendo el tratamiento de homogenización a 300 MPa el más efectivo.

Con la pasteurización convencional se consiguió reducir $\sim 2 \log \text{ufc/mL}$ los recuentos totales de microorganismos mesófilos y psicrótrofos de la horchata cruda, no observándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las horchatas con y sin aditivos. Resultados similares se obtuvieron con el tratamiento de homogenización a 200 MPa, cuya reducción en los recuentos de estos microorganismos (mesófilos y psicrótrofos) también fue de $\sim 2 \log \text{ufc/mL}$ (Tabla 7.3). Por el contrario, con el incremento de la presión de homogenización a 300 MPa, la reducción en los recuentos microbiológicos (mesófilos y psicrótrofos) fue de $\sim 3 \log \text{ufc/mL}$. Calligaris *et al.* (2012), en zumo de banana, también observaron el efecto del incremento de la presión de homogenización de 150 a 200 MPa ($T_i = 4 \text{ }^\circ\text{C}$), en el incremento de la reducción de la carga microbiana

total del producto (de 3 a 4 log ufc/mL, respectivamente). Según lo descrito en la bibliografía, en los procesos de UHPH la reducción microbiana depende de la presión de homogenización a la que se trabaje, pero también de la temperatura de entrada del producto en el equipo. Poliseli-Scopel *et al.* (2012), en licuado de soja, observaron un incremento en la reducción de bacterias totales en el producto al incrementar la presión de trabajo (de 200 a 300 MPa), siendo los recuentos a 200 MPa ($T_i = 55\text{ °C}$) de 3,39 log ufc/mL y a 300 MPa ($T_i = 55\text{ °C}$) $< 0,5$ log ufc/mL, aunque con el aumento de la temperatura de entrada del producto ($T_i = 75\text{ °C}$), y bajo las mismas condiciones de presión, los recuentos microbianos en ambos licuados fueron $< 0,5$ log ufc/mL.

Cabe considerar que aparte de lo comentado anteriormente, la resistencia de los grupos microbianos existentes en los diferentes alimentos y el efecto de las características físico-químicas de la matriz alimentaria (composición, viscosidad, etc.) también serán determinantes en la efectividad del tratamiento de UHPH que se aplique, lo que explicaría algunas de las discrepancias existentes en la literatura (Donsì *et al.*, 2009).

Al contrario de lo observado en los recuentos de microorganismos mesófilos y psicrótrofos, en este estudio, ninguno de los tratamientos aplicados redujo los recuentos de esporas del licuado crudo. Estudios previos demuestran la alta resistencia de estos microorganismos a los tratamientos de UHPH, así como que la efectividad del tratamiento de UHPH sobre su letalidad está intrínsecamente relacionada con la combinación de los parámetros de presión de trabajo y temperatura de entrada del producto en el equipo de homogenización (Cruz *et al.*, 2007; Donsì *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2007; Suárez-Jacobo *et al.*, 2012; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013). El calentamiento del producto después de su paso por la válvula de UHPH (aunque durante tiempos muy cortos, de $\leq 0,5$ s), en combinación con los fenómenos físicos a los que es sometido en la misma válvula (cavitación, esfuerzo cortante, cizalla, etc.), son determinantes en la destrucción de estas formas esporuladas. Poliseli-Scopel *et al.* (2012), en licuado de soja, estudiaron el efecto del tratamiento de UHPH sobre la inactivación de *Bacillus cereus* y *Paenibacillus taichungensis*, aplicando tratamientos de UHPH a 200 y 300 MPa y a diferente temperatura de entrada del producto ($T_i = 55, 65, 75$ y 85 °C). Estos autores observaron que a medida que la T_i del producto incrementaba, aumentando también la temperatura del producto en su salida de la

válvula de UHPH, los recuentos en ambos microorganismos esporulados disminuían, siendo en todos los casos la reducción de esporas en el producto homogenizado a 300 MPa superior a la del producto homogenizado a 200 MPa. Valencia-Flores *et al.* (2013), en licuado de almendra, también observaron un efecto sinérgico en la reducción de *Bacillus cereus* entre el incremento de la temperatura de entrada del licuado (de 55, 65 y 75 °C) y las presiones de trabajo empleadas (de 200 y 300 MPa). Mientras que en el producto homogenizado a 300 MPa los recuentos de esporas estuvieron por debajo del límite de detección ($< 0,5 \log \text{ ufc/mL}$) para cualquiera de las T_i ensayadas, en el producto homogenizado a 200 MPa esta reducción solo se observó para $T_i = 75 \text{ °C}$. Aún así, después de la incubación de los licuados a 30 °C durante 20 días, tan solo los licuados de almendra tratados a 300 MPa y $T_i = 65$ y 75 °C no mostraron crecimiento microbiano.

Durante el almacenamiento de la horchata en frío, probablemente estos microorganismos pasarán a su forma vegetativa, siendo corresponsables de la degradación del producto con el tiempo. Suárez-Jacobo *et al.* (2012), en zumo de manzana tratado a 300 MPa y $T_i = 4 \text{ °C}$, después de la incubación del producto a 37 °C y durante 9 días, observaron que parte de los microorganismos existentes en el producto correspondían a bacterias esporuladas en su forma no germinada.

En todas las horchatas higienizadas (pasteurizadas convencionalmente y UHPH), los recuentos de lactobacilos, enterobacterias, y hongos y levaduras estuvieron por debajo del límite de detección ($< 0,5 \log \text{ ufc/mL}$). Tampoco se detectaron coliformes ni *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas.

Estos grupos de microorganismos son muy sensibles a la temperatura, por lo que no se suelen encontrar en productos pasteurizados. En las horchatas UHPH, el calentamiento del producto a la salida de la válvula de UHPH probablemente también pudo ser el mayor causante de la muerte de estos microorganismos. De hecho, diferentes estudios evidencian la sensibilidad de estas poblaciones a los tratamientos de UHPH (Pereda *et al.*, 2007; Suárez-Jacobo *et al.*, 2010; Poliseli-Scopel, 2012; Valencia-Flores, *et al.*, 2013).

7.2.4. Características físico-químicas de los licuados

7.2.4.1. pH

En la Tabla 7.2 se observa el valor de pH de las horchatas después de su elaboración y procesado. Los licuados presentaron unos valores de pH comprendidos dentro de lo establecido en la reglamentación para este tipo de productos (BOE, 1988). No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los valores de pH de las horchatas, a excepción del producto pasteurizado con aditivos, cuyo pH fue ligeramente superior al resto, probablemente debido al efecto de las sales estabilizantes (o reguladoras de pH) fosfato disódico (E-339ii) y citrato trisódico (E-331iii) que se le añadieron. Las características físico-químicas del agua que se utilizó en la elaboración de las horchatas también influyeron en el valor de pH del producto final. En este estudio se trabajó con agua blanda, de dureza correspondiente a $36,78 \pm 0,97$ mg CaCO_3/L , para evitar problemas de desestabilización coloidal en la bebida.

El pH es un buen indicador de la calidad de los productos alimenticios. En la horchata, valores de pH inferiores a 6,3 se consideran inaceptables, ya que se relacionan intrínsecamente con una baja calidad microbiológica del licuado (BOE, 1988). Cabe tener en cuenta que la horchata es un producto altamente nutritivo, de pH muy próximo a la neutralidad, por lo que a temperaturas de conservación ambientales la microbiota del producto crecerá fácilmente, fermentando los azúcares de la horchata con la consiguiente producción de ácido y gas (Morcardó *et al.*, 2001; Morell *et al.*, 1983). Cortés *et al.* (2004) realizaron un estudio de composición de diferentes horchatas comercializadas en España en ese momento, observando que todas ellas presentaban unos valores de pH comprendidos entre 6,37 y 7,56, satisfaciendo los requisitos preestablecidos en la Reglamentación Técnico-Sanitaria para este tipo de producto (BOE, 1988)

7.2.4.2. *Actividad de la enzima peroxidasa*

La actividad de la enzima peroxidasa se evaluó mediante la determinación de la actividad residual de la enzima después de la aplicación de los tratamientos de pasteurización y UHPH, en comparación con el producto crudo.

Como se puede observar en la Tabla 7.4, en todos los casos, la actividad peroxidasa disminuyó con la aplicación de los tratamientos de higienización. La reducción más elevada se observó en la horchata homogenizada a 300 MPa, en la que no se detectó actividad residual de esta enzima. Con los tratamientos de pasteurización convencional y homogenización a 200 MPa también se redujo la actividad residual de esta enzima, no observándose diferencias entre estas muestras (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Actividad de la enzima peroxidasa en la horchata antes y después de la aplicación de los tratamientos de higienización (pasteurización convencional y UHPH)¹.

Licuada ²	(Δ AU/min) ³	Actividad residual (%)
Cruda	0,0387 ^a \pm 0,0018	100,0
P1	0,0085 ^b \pm 0,0004	~ 21,9
P2	0,0089 ^b \pm 0,0006	~ 22,9
200	0,0092 ^b \pm 0,0016	~ 23,7
300	nd ^c	-

¹ Media \pm error estándar. nd = no determinado.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

³ Incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

^{a-c} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

La peroxidasa es una enzima relativamente sensible al calor, por lo que se considera un posible indicador de la aplicación de tratamientos térmicos de pasteurización o esterilización en productos alimentarios. La inactivación de esta enzima depende de la combinación tiempo-temperatura a la que se someta el producto, observándose cierta sensibilidad de la enzima a partir de temperaturas ≥ 80 °C. Esto explicaría la reducción de su actividad en las muestras pasteurizadas P1 y P2. En los tratamientos de UHPH, la inactivación enzimática también se relaciona con la combinación de los parámetros temperatura-tiempo a los que el producto se somete durante el tratamiento de

homogenización relacionados con los efectos de cizalla, impacto y presión. Por ello, la temperatura de entrada del producto al equipo (T_i), la presión de homogenización y el tiempo de mantenimiento del producto a la máxima temperatura serán determinantes para la disminución de su actividad. Pereda *et al.* (2007), en leche homogenizada a 200 MPa, observaron que la actividad residual de la lactoperoxidasa disminuía del 35 a < 1% al incrementar la temperatura de entrada del producto al equipo (de $T_i = 30$ a 40 °C), lo que atribuyeron al consiguiente incremento de temperatura del producto después de su paso por la válvula de homogenización (de ~ 78 y 84 °C, para las $T_i = 30$ y 40 °C, respectivamente).

Corrales *et al.* (2012) estudiaron la reducción de la actividad de esta enzima con la aplicación de tratamientos de luz ultravioleta (UV-C) en horchata de chufa, observando que la actividad peroxidasa disminuía de manera proporcional al incrementar la dosis aplicada de UV-C. A la máxima dosis de trabajo ($4,23 \text{ J/cm}^2$), estos autores consiguieron una actividad residual de la enzima del ~ 14%. Mediante la aplicación de pulsos eléctricos (35 kV/cm durante 100 μs), Cortés *et al.* (2005) consiguieron una reducción de la actividad peroxidasa en la horchata de chufa tratada por pulsos eléctricos (25 kV/cm, durante 300 μs) similar a la obtenida en este estudio en las horchatas P1, P2 y 200. Estos autores evaluaron la estabilidad de la enzima durante cinco días de conservación del licuado ($2-4$ °C), observando que en algunos casos su actividad tendía a incrementar, nunca superando los niveles del licuado crudo, lo que apuntaría a su regeneración. Esta enzima podría tener efecto sobre la oxidación de diferentes compuestos del producto, provocando defectos de calidad sobre el producto final.

7.2.4.3. *Tamaño de partícula y microscopía (Confocal y TEM)*

El estudio de la distribución del tamaño de partícula de las horchatas se realizó mediante el análisis de las curvas de distribución de tamaño de partícula y la evaluación de los parámetros D50, D90, $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$. Los dos primeros parámetros (D50 y D90) hacen referencia al diámetro bajo el que se encuentran el 50% y 90% del total de partículas del producto, respectivamente. Los parámetros $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ se relacionan con el diámetro medio de las partículas, en base al área de su superficie y a su volumen,

respectivamente. El parámetro $d_{4,3}$ es especialmente sensible a la presencia de agregados de partículas en el producto. La horchata de chufa es un licuado complejo, en el que coexisten diferentes componentes en suspensión, entre los que destacan gotas de grasa, gránulos de almidón, cuerpos proteicos, partículas sólidas procedentes de la molturación de los tubérculos y agregados de partículas que se forman entre estos componentes.

La Figura 7.2 muestra el gráfico correspondiente a las curvas de distribución de tamaño de partícula de las horchatas después de su elaboración y tratamiento (día 1). En todas las muestras se observó una distribución polidispersa del tamaño de partícula, caracterizada por un pico principal y un grupo secundario compuesto de diferentes picos. El pico principal correspondió al grupo de partículas de menor diámetro medio. Por el contrario, el grupo secundario se caracterizó por diferentes picos de media superior, debido a la presencia de partículas y agregados de partículas con mayor variabilidad de tamaños. En la bibliografía encontramos resultados similares descritos en licuados vegetales de soja y almendra crudos, homogenizados convencionalmente y tratados mediante la tecnología de UHPH (Cruz *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012; Valencia-Flores *et al.*, 2013).

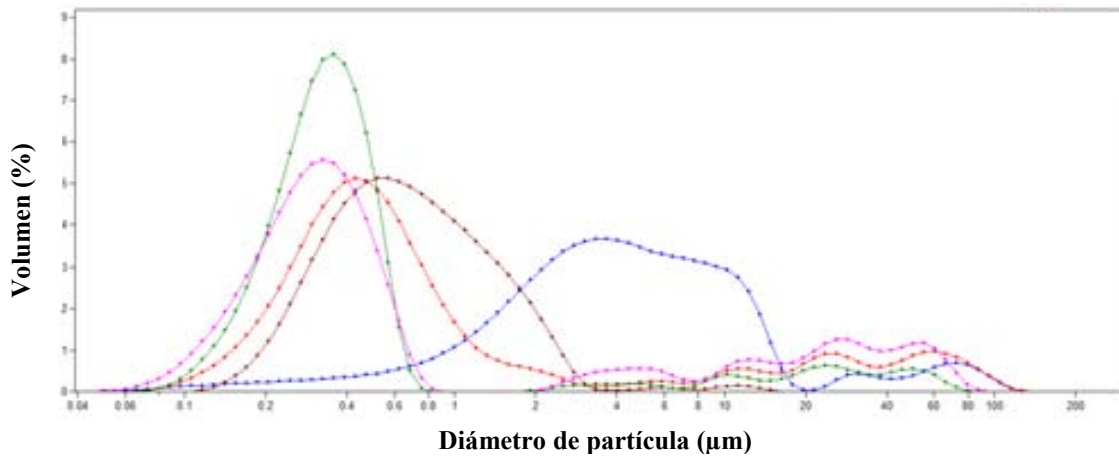


Figura 7.2. Distribución del tamaño de partícula de las horchatas elaboradas. Cruda (■): cruda; P1 (■): homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2 (■): homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa (■): homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300 MPa (■): homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C)].

La distribución de tamaño de partícula de la horchata cruda se caracterizó por una curva principal comprendida entre las 0-20 μm , bajo la cual se encontraron el 92,7% del volumen total de las partículas del producto. El tamaño medio de estas partículas fue de $\sim 3,6 \mu\text{m}$ y los valores de D50 y D90 obtenidos en este licuado fueron de $\sim 3,7$ y $\sim 10,7 \mu\text{m}$, respectivamente. El porcentaje restante de partículas de la horchata cruda ($\sim 7\%$) estuvo representado por dos grupos minoritarios de partículas, de diámetros medios superiores (31 y 68,6 μm , respectivamente).

En comparación con el producto crudo, la aplicación de ambos tratamientos de homogenización (homogenización convencional y UHPH) redujo significativamente ($P < 0,05$) el tamaño de las partículas en el producto. El valor del parámetro $d_{3,2}$ evidenció esta reducción de tamaño, ya que como se puede observar en la Tabla 7.5, su valor disminuyó según la relación cruda $< P1 \leq P2 \leq 200 = 300$.

Tabla 7.5. Parámetros correspondientes al análisis de tamaño de partícula de las horchatas cruda, pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión.

Licuado ³	Parámetros evaluados (μm) ^{1,2}			
	D50	D90	$d_{3,2}$	$d_{4,3}$
Cruda	3,67 ^a \pm 0,10	10,69 ^{de} \pm 0,40	1,43 ^a \pm 0,12	5,13 ^{cd} \pm 0,37
P1	0,63 ^{bc} \pm 0,03	2,77 ^f \pm 0,23	0,55 ^b \pm 0,01	4,01 ^d \pm 0,47
P2	0,53 ^{bcd} \pm 0,01	29,10 ^{bc} \pm 1,41	0,48 ^{bc} \pm 0,01	7,54 ^b \pm 0,41
200	0,36 ^d \pm 0,01	11,98 ^d \pm 1,94	0,35 ^c \pm 0,01	3,87 ^d \pm 0,29
300	0,37 ^d \pm 0,02	31,43 ^b \pm 1,20	0,36 ^c \pm 0,01	8,34 ^b \pm 0,21

¹ Media \pm error estándar.

² D50 = diámetro bajo el cual se encuentra el 50% del volumen de las partículas; D90 = diámetro bajo el cual se encuentran el 90% de las partículas; $d_{3,2}$ = diámetro medio en relación al área de la superficie de las partículas; $d_{4,3}$ = diámetro medio en relación al volumen de las partículas.

³ Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

^{a-d} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

El tratamiento de homogenización - pasteurización convencional redujo el tamaño de partícula medio un 82-85%, en comparación con el producto crudo, no observándose grandes diferencias entre las horchatas P1 y P2. Sus perfiles se caracterizaron por

presentar una curva mayoritaria comprendida entre 0 y 3,7 μm , la cual representó $\sim 95\%$ y $\sim 80\%$ del volumen total de partículas de P1 y P2, respectivamente. En la horchata P1, el 5% restante de partículas estuvieron comprendidas entre 3,7 y 15 μm , mientras que en P2, este grupo minoritario ($\sim 20\%$ del total) se caracterizó por la existencia de partículas con mayor heterogeneidad de tamaños (3,7-194 μm).

La adición de emulgentes modificó ligeramente el perfil de la distribución de partículas en la horchata pasteurizada P2, en comparación con su homóloga P1. Aunque la mayor parte de las partículas en las dos horchatas estuvieron comprendidas bajo una curva de intervalo muy similar (0-3,7 μm), la Figura 7.2 mostró que en el licuado P1, el diámetro medio de las partículas bajo esta curva principal fue ligeramente superior que en el licuado P2 (0,52 y 0,43 μm , respectivamente). De hecho, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el valor de D50 y $d_{3,2}$, en ambas horchatas (Tabla 7.5), pero sí se observó una tendencia en P2 a presentar unos valores más pequeños en estos dos parámetros. Probablemente, este hecho se deba a que en P1, a diferencia de P2, después de la homogenización-pasteurización de la horchata, un mayor número de las gotas de grasa se reagrupara formando nuevas gotas de mayor tamaño (fenómeno de coalescencia).

La aplicación de la UHPH redujo considerablemente el tamaño de las partículas del producto, en comparación con el tratamiento de pasteurización-homogenización convencional (ver parámetros D50 y $D_{3,2}$). La distribución del tamaño de partícula en las horchatas tratadas por UHPH se caracterizó por la presencia de una curva mayoritaria (comprendida entre las 0 y 1 μm en ambos casos) de media inferior a las demás horchatas (cruda, P1 y P2), siendo este valor no estadísticamente diferente entre los dos productos tratados por UHPH (0,36 y 0,37 para los licuados homogenizados a 200 y 300 MPa, respectivamente). Esta curva principal representó ~ 88 y 74% del volumen total de partículas de las horchatas tratadas a 200 MPa y 300 MPa, respectivamente. En el producto tratado a 200 MPa, el segundo grupo de picos representó el 12% de las partículas restantes, comprendidas entre las 2 y 80 μm . El increment

o de presión de trabajo a 300 MPa causó un incremento del número de partículas (o agregados de partículas) de mayor tamaño (las cuales representaron el 27% restante), comprendidas entre las 2 y 100 μm .

Cabe destacar que la relación proteína y grasa en este producto es muy baja (0,27), por lo que se estima que la proteína pueda no ser suficiente para cubrir las nuevas gotas de grasa formadas con los tratamientos de homogenización, y así evitar su agregación y posterior fusión. Poliseli-Scopel *et al.* (2012), en licuado de soja, observaron que la relación proteína:grasa del producto (de ~ 2) favorecía la estabilidad de la emulsión después de los tratamientos de homogenización aplicados, a diferencia de Valencia-Flores *et al.* (2013), quienes en licuado de almendra puntualizaron la inestabilidad de las nuevas gotas de grasa formadas con el tratamiento de UHPH, también relacionándolo con la baja cantidad de proteína con respecto a la grasa del licuado ($\sim 0,58$).

En la horchata pasteurizada-homogenizada P2, la protección de las gotas frente al fenómeno de coalescencia se vio favorecida con la adición del emulgente, creándose nuevas interacciones entre gotas. Estas interacciones intermoleculares favorecieron la formación de agregados de partículas en el producto final; por ello, y como se puede observar en la Tabla 7.5, el valor de $d_{4,3}$ en P2 fue superior al de P1. En el caso de los productos UHPH, en trabajos previos, diferentes autores han observado el efecto del tratamiento de UHPH a presiones de trabajo > 200 MPa sobre la conformación macromolecular de las proteínas del producto. El incremento de la presión de trabajo puede causar su desnaturalización, lo que implica una disminución de su solubilidad. En consecuencia, se establecen nuevas interacciones entre ellas y las demás partículas en suspensión del producto, con la consiguiente formación de agregados de partículas y minimizando la coalescencia entre gotas (Cruz *et al.*, 2007; Pereda *et al.*, 2007; Poliseli-Scopel *et al.*, 2012). Por todo ello, en este estudio, las horchatas P2 y las tratadas a 300 MPa presentaron los valores de $d_{4,3}$ más elevados (siendo estos no significativamente diferentes entre ellos), debido a la presencia de estos pequeños agregados de partículas originados por la aglomeración de partículas de diferente origen, bien a causa del efecto del emulgente (en P2) o de la aplicación de presiones de homogenización de 300 MPa.

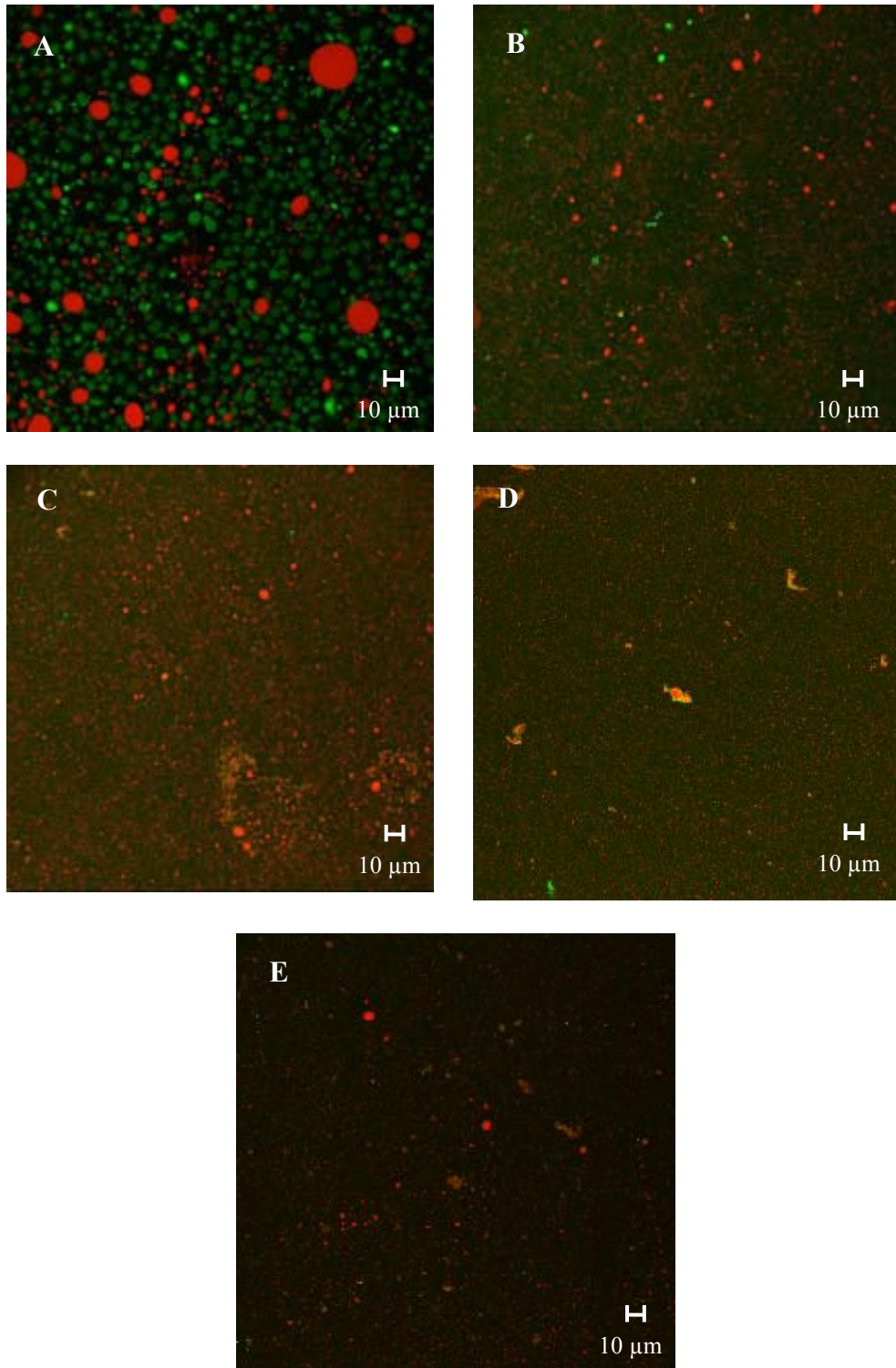


Figura 7.3. Micrografías confocales de las horchatas de chufa. (A) Cruda, (B) Homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), (C) Homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), (D) Homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_1 = 40$ °C) y (E) Homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_1 = 40$ °C).

Los análisis de microscopía confocal y electrónica permitieron complementar la información obtenida en el análisis de la distribución del tamaño de partícula del producto. Como se puede observar en la Figura 7.3, los principales componentes del producto se pudieron diferenciar mediante las dos tinciones que se utilizaron en microscopía confocal. Con la tinción roja destacaron las gotas de grasa, mientras que con el color verde se estima haber teñido a otros componentes del producto.

En la Figura 7.3 - imagen A, correspondiente a la horchata de chufa cruda, destacaron dos tipos de partículas principales, distribuidas heterogéneamente en la fase continua del licuado. Estas se podrían atribuir a las gotas de grasa (*rojo*) y a los gránulos de almidón (*verde*) existentes en el producto. Como se puede observar, el tamaño de las diferentes gotas de grasa fue muy variable, probablemente debido a fenómenos de coalescencia entre gotas. La baja viscosidad de la horchata de chufa favoreció el encuentro y colisión entre gotas, por lo que con el tiempo, y por sus características físico-químicas, la tendencia de las gotas será de migrar unas hacia las otras, fusionándose en una gota única de mayor tamaño. La cantidad de gránulos de almidón observados en la muestra evidenciaron la gran prevalencia de este componente en el producto crudo. Las imágenes B, C, D y E (Figura 7.3) muestran la reducción considerable del tamaño de las gotas de aceite con la aplicación de los tratamientos de homogenización convencional y UHPH, así como también, su mayor dispersión en la fase continua. No se observó la presencia de gránulos de almidón en ninguna de las horchatas pasteurizadas convencionalmente y UHPH, debido al proceso de hidrólisis enzimática del almidón bajo el cual los licuados fueron sometidos antes de ambos tratamientos de higienización. El fondo verde que aparece en todas las imágenes (B a E, Figura 7.4) se atribuiría a la proteína y/o otros componentes del producto dispersos de manera homogénea en la fase continua de los licuados, mientras que las partículas teñidas de rojo corresponderían a las gotas de grasa. Comparando las imágenes correspondientes a las horchatas P1 y P2 entre sí (Figura 7.3), se observó que en el producto P1, el tamaño de las gotas de grasa fue ligeramente superior, probablemente debido a los mismos fenómenos de floculación y coalescencia entre gotas citados anteriormente. De hecho, en el perfil de la distribución del tamaño de partícula de estos dos licuados (Figura 7.2) ya se observó la tendencia en los valores de los parámetros D_{50} y $d_{3,2}$ del licuado P1 a ser ligeramente superiores que en el licuado P2 (Tabla 7.5). En las imágenes correspondientes a las

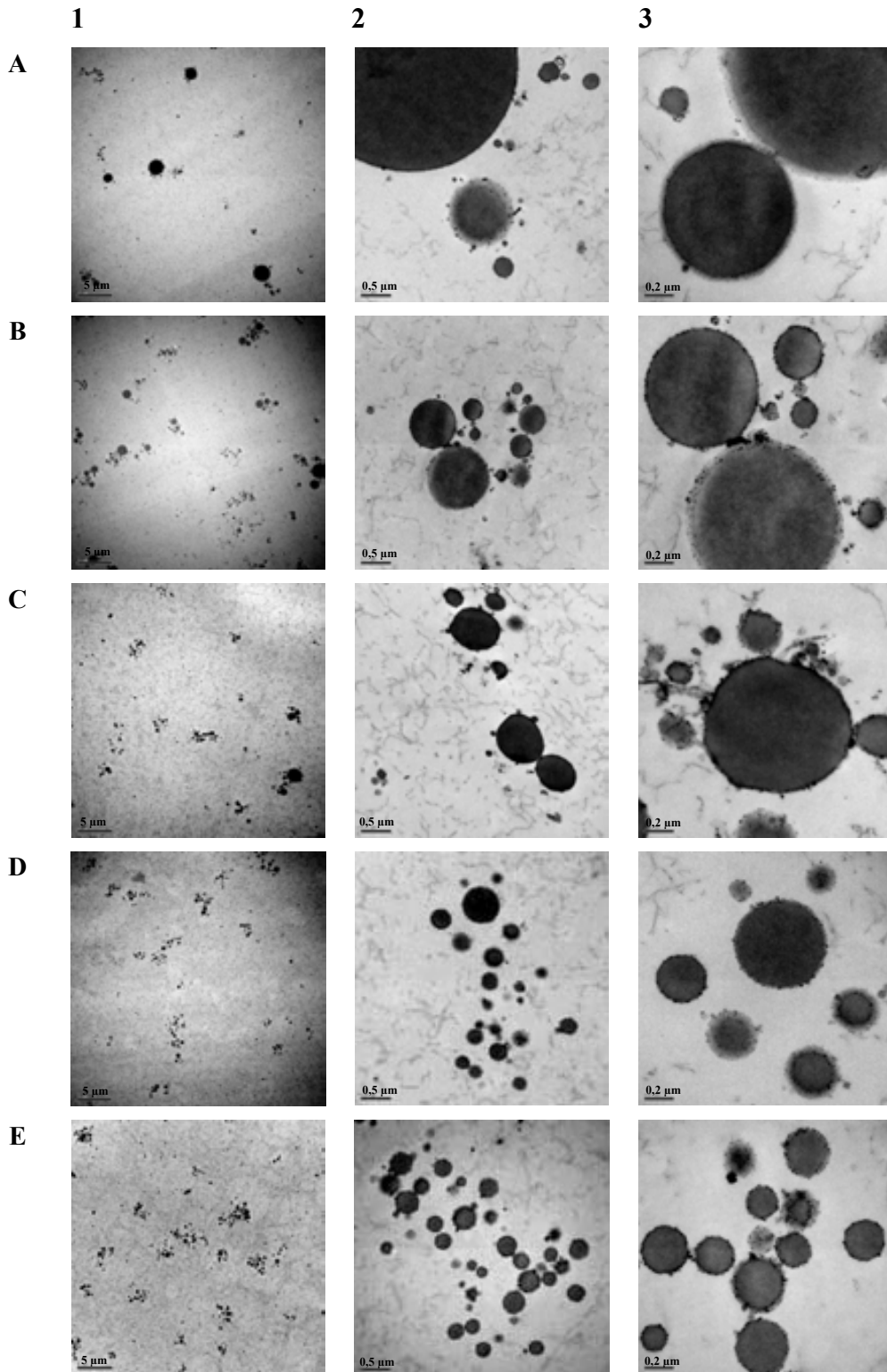


Figura 7.4. Micrografías de transmisión electrónica correspondientes a las horchatas de chufa. (A) Cruda, (B) Homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), (C) Homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), (D) UHPH (200 MPa, T_i = 40 °C) y (E) UHPH (300 MPa, T_i = 40 °C). Imágenes a (1) 3000, (2) 25000 y (3) 60000 aumentos.

horchatas UHPH (Figura 7.3, imágenes D y E), y en comparación con las demás imágenes, se observó la disminución del tamaño de las gotas de grasa, confirmando los valores obtenidos por difracción láser (Tabla 7.5). Destacar que en todas las muestras homogenizadas (pasteurizadas y UHPH), también se apreciaron algunas gotas de grasa aisladas de mayor tamaño, probablemente debido a los fenómenos de floculación y coalescencia entre gotas. La Figura 7.4 muestra las micrografías de las horchatas obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica.

En todas las horchatas destacó la baja concentración de las gotas de grasa y/o otros componentes en el producto, así como también la tendencia de las gotas a migrar unas hacia las otras, debido, entre otros, a su tamaño, la baja viscosidad del producto y la diferencia de densidad entre la grasa y la fase continua de la emulsión (Durand, 2003). Estas imágenes también muestran que el licuado crudo, a diferencia de los demás, fue el que presentó mayor variabilidad entre los tamaños de las gotas, las cuales se dispersaron en la fase continua de manera no homogénea.

Las imágenes A2 y A3 (Figura 7.4) evidenciaron la tendencia de las gotas más pequeñas a aproximarse a las gotas de mayor tamaño, con las que probablemente acabarán colisionando y coalesciendo. En estas imágenes se apreció que algunas de las gotas estaban recubiertas por una capa difusa, probablemente formada por proteínas, grasa y otros componentes del licuado. La Figura 7.5 muestra una de las imágenes obtenidas en la horchata cruda por microscopía confocal, en perspectiva tridimensional. Como se puede observar, se aprecia nuevamente que las gotas de grasa aparecen parcialmente recubiertas por otros componentes del producto, lo que justificaría lo observado en las imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica. Aún así, las características físico-químicas de esta capa envolvente no fueron suficientes para garantizar la estabilidad coloidal en el tiempo de la gota en dispersión (ver *Capítulo 8, apartado 8.2.2*).

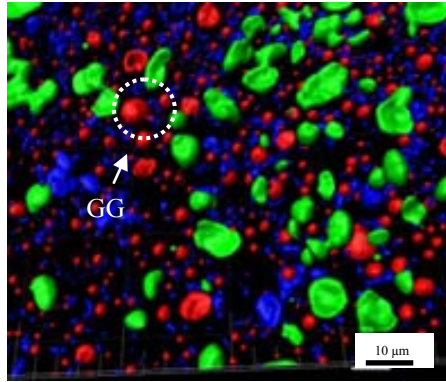


Figura 7.5. Micrografía confocal en perspectiva tridimensional de una sección en la horchata de chufa cruda. GG: gotas de grasa.

Las imágenes B1-3 y C1-3 (Figura 7.4) corresponden a las horchatas P1 y P2. En ambas horchatas, y en comparación con el producto crudo, se evidenció la reducción del tamaño de las gotas de grasa con el proceso de homogenización, así como su mayor dispersión en el producto. El incremento en el número de gotas dispersas en la emulsión aumentará la probabilidad de que las gotas

entren en contacto, colisionando y formando nuevas estructuras (Figura 7.5, imágenes B2 y C2). De hecho, en las imágenes B1 y C1 ya se observan algunas gotas aisladas de mayor tamaño, probablemente resultado de la fusión de dos o más gotas en el producto, así como también se observa la formación de algunos clústeres de gotas.

En la Figura 7.6 (imágenes A y B), las gotas de grasa de los licuados P1 y P2 se pueden apreciar con más detalle. Como se ha comentado, se observa que las gotas de grasa están recubiertas por una capa que, probablemente corresponda a agregados de proteína (AP) y de proteína y grasa (APG), y agregados de proteína, grasa y emulgente (APGE) en el licuado P2, los cuales en algunos casos, hacen de conexión entre gotas. Probablemente, el tratamiento del tratamiento térmico afectó la estabilidad de las proteínas del licuado, debido a su parcial desnaturalización.

Otros autores han descrito previamente que con su desnaturalización, las proteínas se despliegan y suelen migran hacia la interfase aceite-agua, adsorbiéndose en la superficie de las gotas de grasa del producto mediante las zonas hidrofóbicas de la misma proteína (Krog, 2004; Lee *et al.*, 2007; Stapelfeldt *et al.*, 1999). Poliseli-Scopel (2012) observaron que con el tratamiento de pasteurización convencional del licuado de soja (95 °C, 30s) la hidrofobicidad de las proteínas aumentaba, en comparación con el

producto sin tratar. Se conoce que en la interfase aceite-agua las proteínas forman películas altamente viscosas, confiriendo resistencia a las gotas de grasa frente a los fenómenos de coalescencia, por lo que acaban actuando como potenciales agentes emulsionantes (Badui, 2006; Roesch et al., 2003).

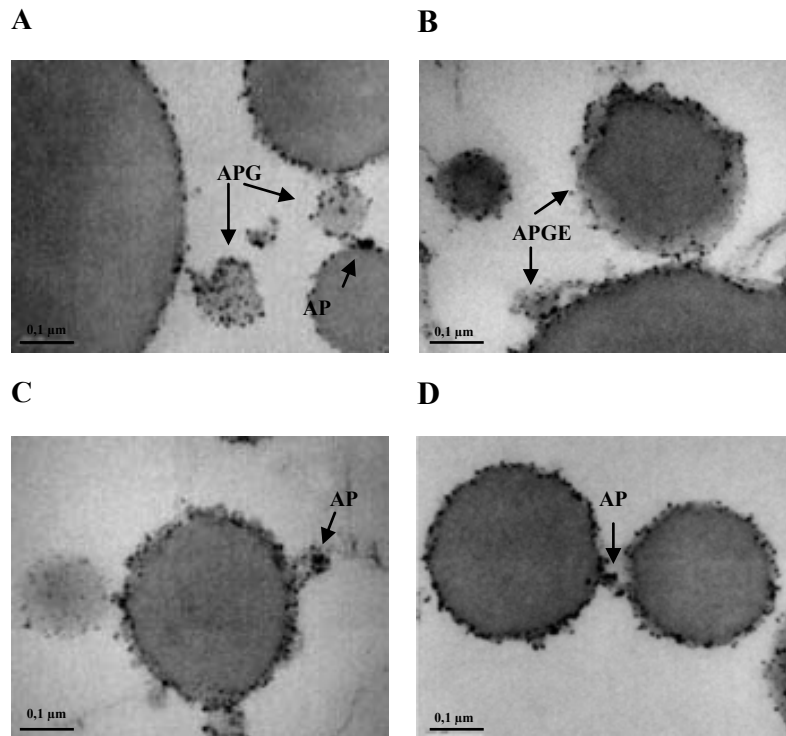


Figura 7.6. Micrografías de transmisión electrónica correspondientes a las horchatas (A) Homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), (B) Homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), (C) UHPH (200 MPa, $T_i = 40$ °C) y (D) UHPH (300 MPa, $T_i = 40$ °C). Imágenes a 150000 aumentos. AP: agregados de proteína; APG: agregados de proteína y grasa; APGE: agregados de proteína, grasa y emulgente.

A diferencia de la horchata P1, cuyas gotas son mayoritariamente esféricas (Figura 7.4 imagen B2), en el producto P2 se observa que las gotas de grasa poseen una forma distorsionada, probablemente debido a que las interacciones entre los compuestos que las recubren y el medio son más fuertes que las fuerzas de tensión superficial de la propia gota. Esto se explicaría por el efecto del emulgente en la horchata P2, cuyo papel fundamental es reducir la tensión superficial de las gotas permitiendo su estabilidad con la fase continua. En comparación con el efecto emulsionante de las proteínas, este

emulgente de bajo peso molecular, migraría rápidamente hacia la interfase aceite-agua adsorbiéndose en preferencia en la superficie de la gota de grasa.

Las imágenes D y E (Figura 7.4) corresponden a las micrografías de las horchatas homogenizadas a 200 y 300 MPa. En estas imágenes, y en comparación con las imágenes A1, B1 y C1 (Figura 7.4), se observa el aumento en la reducción del tamaño de las gotas de grasa con los tratamientos de UHPH, así como el consiguiente aumento del número de gotas en la dispersión. Por lo descrito en la bibliografía, se estima que esta nueva capa esté formada mayoritariamente de agregados de proteína y grasa (Poliseli-Scopel *et al.*, 2012). Se conoce que con el tratamiento de UHPH, las proteínas del producto quedan parcialmente desnaturalizadas y su hidrofobicidad aumenta, por lo que actúan como agentes emulsionantes. Estas proteínas son fácilmente adsorbidas en la interfase aceite/agua, otorgando una nueva cobertura a las gotas de grasa dispersas en la emulsión (Hebishy, 2013). La nueva membrana que se forma alrededor de estas gotas también creará nuevas interacciones entre las otras partículas del producto, mejorando de este modo, la estabilidad coloidal del producto. Destacar la formación de agregados de partículas en la horchata homogenizada a 300 MPa (Figura 7.4, imagen E2), lo que se relacionaría con los resultados descritos sobre la caracterización del tamaño de partícula de los licuados (Tabla 7.5).

7.2.4.4. Viscosidad

El parámetro de viscosidad en las horchatas de chufa dependerá, entre otros, de su composición (proporción chufa:agua, porcentaje de azúcar añadido, etc.), y de las características y relaciones que se establezcan entre sus componentes (gotas de grasa, proteína, etc.). Flourey *et al.* (2000) y McClements (2005) destacaron la relación entre el valor de viscosidad de los fluidos y las características de sus partículas en suspensión (número, tamaño e interacciones que se establezcan entre ellas). Con el proceso de homogenización, la viscosidad de los fluidos suele aumentar, debido al incremento del número de partículas en suspensión; en estos productos, la relación entre la superficie y el volumen de la fase dispersa aumenta, aumentando la fricción interna entre partículas y el valor de viscosidad del producto homogenizado. La anisometría de las partículas en suspensión también comportará un incremento en el valor de viscosidad del producto,

así como la aplicación de tratamientos que persigan el establecimiento de relaciones intermoleculares entre la fase dispersa.

En este estudio, según el análisis de las curvas de flujo de las horchatas, se observó que todas ellas presentaron un comportamiento reológico newtoniano ($n \sim 1$). La viscosidad de la horchata cruda fue de $1,69 \pm 0,68$ mPa/s, valores similares a los descritos previamente por otros autores para este tipo de producto (Morell *et al.*, 1983; Schwart *et al.*, 1984). En este licuado, los gránulos de almidón tuvieron un efecto determinante sobre su valor de viscosidad, efecto que no concurrió en los licuados pasteurizados y tratados por UHPH debido a la hidrólisis enzimática del almidón. De no ser así, probablemente, los licuados procesados habrían mostrado un comportamiento reológico muy diferente. Schwart *et al.* (1984) describieron el cambio de comportamiento reológico (de fluido newtoniano a pseudoplástico) en la horchata cruda al incrementar su temperatura a ≥ 75 °C, lo que atribuyeron a la gelatinización del almidón.

Las horchatas P1 y 200 MPa presentaron unos valores de viscosidad no estadísticamente diferentes entre ellas y tampoco en comparación con el producto sin tratar (de $1,54 \pm 0,77$, $1,72 \pm 0,65$ y $1,69 \pm 0,68$ mPa/s, respectivamente). El aumento del número de partículas en las horchatas homogenizadas probablemente contrarrestó la posible disminución de viscosidad en estos productos por la hidrólisis del almidón, en comparación con el producto crudo. Las horchatas que presentaron el valor de viscosidad más elevado fueron las P2 y 300 MPa ($2,33 \pm 0,59$ y $2,34 \pm 0,07$ mPa/s, respectivamente), no observándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellas. El incremento de viscosidad en estos dos licuados se explicaría por el estado de agregación de estas partículas en ambas bebidas, ya que la viscosidad también depende del diámetro/forma de las partículas existentes en la fase continua del licuado y de las relaciones que se establezcan entre ellas (ver Tabla 7.6).

Las diferencias existentes entre las horchatas P1 y P2 se atribuyeron a la adición de aditivos estabilizante en el licuado P2. En la horchata P2, la adición de emulgentes favoreció el establecimiento de interacciones entre las diferentes partículas del producto, por lo que probablemente, se generara más fricción interna en el producto. Por el contrario, las diferencias observadas entre el valor de viscosidad de las horchatas

homogenizadas a 200 y 300 MPa se debieron, probablemente, al efecto de la presión de trabajo. Según la bibliografía, los productos homogenizados a 300 MPa suelen presentar valores de viscosidad superiores a los homogenizados a menor presión, lo que se atribuye a la cantidad de agregados de partículas que se forman en el producto fruto de las nuevas interacciones intermoleculares que se crean con el tratamiento a 300 MPa (Pereda *et al.*, 2007; Poliselí-Scopel *et al.*, 2012).

7.2.4.5. Color

La Tabla 7.6 muestra los valores de las coordenadas triestímulo (L^* , a^* y b^*) y los parámetros ΔE^* y WI obtenidos en el análisis del color de las diferentes horchatas. A día 1, la horchata cruda presentó un valor de luminosidad (L^*) inferior a las horchatas tratadas (*menos blanco*), mientras que los parámetros a^* y b^* presentaron valores ligeramente superiores, lo que significa *más rojo* y *más amarillo*, respectivamente. El incremento de luminosidad (L^*) de las muestras pasteurizadas y UHPH se podría explicar por el efecto de la homogenización de la grasa del producto con ambos tratamientos. Este parámetro, en gran parte, se relaciona con la concentración y el tamaño de partículas de la emulsión (Chantraponchai *et al.*, 1998). El aumento del número de glóbulos grasos, a razón de la reducción de su tamaño en el proceso de homogenización, comporta una mayor difracción de la luz al incidir en el producto, por lo que el valor de luminosidad de la muestra aumenta. Al contrario de lo descrito por otros autores en leche o licuado de soja (Pereda *et al.*, 2007; Poliselí-Scopel *et al.*, 2012), en este estudio no se observó un incremento de la luminosidad significativo ($P > 0,05$) en los productos tratados por UHPH, en comparación con sus homólogos homogenizados convencionalmente. Por el contrario, Cruz *et al.* (2007), en licuado de soja, observaron que el valor del parámetro L^* disminuyó con la aplicación de la UHPH, en comparación con los licuados crudo y UHT, los cuales no presentaron diferencias significativas en el valor de L^* . Esto se podría explicar por el efecto del *tipo* de matriz alimentaria, puesto que la composición del producto es determinante en la expresión final de su color. Cuando la luz interacciona en la superficie de una emulsión, una parte de la luz incidente es refractada por las gotas de grasa y/o partículas en

suspensión, mientras que el resto se transmite en la misma emulsión, siendo absorbida por los cromóforos del producto (Chantraponchai et al., 1998).

Tabla 7.6. Parámetros de color obtenidos del análisis de las diferentes horchatas.

Licuado ²	Coordenadas triestímulo ¹			ΔE^* ¹	WI ¹
	L*	a*	b*		
Cruda	80,76 ^b ± 0,45	-0,48 ^a ± 0,04	14,92 ^a ± 0,17	-	75,62 ^c ± 0,27
P1	81,85 ^a ± 0,27	-0,18 ^c ± 0,03	13,80 ^b ± 0,14	1,64 ^c ± 0,12	77,19 ^b ± 0,22
P2	82,18 ^a ± 0,20	-0,04 ^b ± 0,02	12,96 ^c ± 0,11	2,28 ^b ± 0,08	77,96 ^b ± 0,11
200	82,87 ^a ± 0,18	-0,13 ^c ± 0,01	12,19 ^d ± 0,06	3,15 ^a ± 0,01	78,97 ^a ± 0,11
300	82,49 ^a ± 0,11	-0,13 ^c ± 0,02	12,04 ^d ± 0,09	3,18 ^a ± 0,08	78,74 ^a ± 0,07

¹ Media ± error estándar. El parámetro ΔE^* se calculó considerando la horchata cruda como referencia.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Por el contrario, sí que se apreciaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las coordenadas a* y b* de las horchatas pasteurizadas y tratadas por UHPH. Los parámetros a* y b* disminuyeron en las muestras según el orden P2 > P1 = 200 = 300 y P1 > P2 > 200 = 300, respectivamente (Tabla 7.6), probablemente debido a las reacciones entre los componentes del licuado desencadenadas por la aplicación de estos tratamientos de conservación.

Todos estos resultados se tradujeron en que la horchata cruda fue la más oscura (según indican los valores del parámetro WI, en la Tabla 7.6), el color de la cual fue significativamente ($P < 0,05$) diferente al resto. Las horchatas homogenizadas a ultra alta presión fueron las más blancas, ya que sus correspondientes valores del índice de blancura fueron los más elevados. A estas horchatas les siguieron las pasteurizadas convencionalmente, según la relación 300 = 200 > P2 > P1. Nuevamente, el cálculo del parámetro ΔE^* evidenció estas diferencias de color entre muestras (Tabla 7.4). Con este parámetro también se obtuvo una idea de cómo el tratamiento aplicado contribuyó al color global del producto. En comparación con el producto crudo, las muestras homogenizadas a ultra alta presión fueron las más diferentes, siendo estas diferencias en

el orden de cruda $< P1 < P2 < 200 = 300$. Las diferencias de color entre las horchatas pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión podrían ser debidas al mayor efecto térmico en los productos P1 y P2, el cual desencadenaría reacciones de oscurecimiento en el licuado. De hecho, en general, con la aplicación de los tratamientos de higienización convencionales (pasteurización y esterilización) el color de las horchatas tiende a oscurecer de manera directamente proporcional a la severidad del tratamiento térmico aplicado; de este modo, las horchatas condensadas o esterilizadas en autoclave del mercado suelen ser las más oscuras, debido principalmente a las reacciones de caramelización de los azúcares libres en el producto.

El color de los alimentos es uno de los atributos que el consumidor suele juzgar para evaluar su calidad y aceptabilidad. La industria horchatera busca alterar al mínimo las características sensoriales de la horchata de chufa cruda, por ser un producto muy tradicional y cuya apariencia se relaciona con su calidad. Por ello, entre otros, las tecnologías que permitan incrementar la vida útil de la horchata manteniendo su color serán de gran interés para la industria horchatera actual. Recientemente, Corrales *et al.* (2012) han aplicado exitosos tratamientos de UV para la higienización del licuado de chufa, observando tan solo mínimas diferencias de color ($\Delta E^* \sim 2$) entre las horchatas tratadas (hasta dosis de 4 J/cm^2) y el producto crudo. En este estudio, el valor del parámetro ΔE^* fue de ~ 3 unidades en ambos licuados UHPH (Tabla 7.6), diferencias que según estudios realizados ya serían apreciables por el ojo humano. De hecho, en los análisis sensoriales realizados en el presente trabajo (ver apartado 7.3.2), el panel catador detectó a simple vista las diferencias de color existentes entre las horchatas homogenizadas a ultra alta presión y el producto control (horchata cruda), catalogando a estos licuados UHPH como más blancos (o menos amarillos).

7.2.4.6. Oxidación de la grasa: índice de peróxidos y compuestos volátiles relacionados

El perfil de la grasa de la horchata de chufa se caracteriza por el perfil lipídico de las chufas que se utilicen para la elaboración del licuado. Por lo general, la grasa de chufa se caracteriza por una fracción mayoritaria saponificable ($\sim 98-99\%$), compuesta

principalmente por triglicéridos y algunos diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (Kim *et al.*, 2007; Linssen *et al.*, 1988; López-Cortés *et al.*, 2013). Los ácidos grasos monoinsaturados constituyen los triglicéridos mayoritarios en el aceite de chufa ($\geq 60\%$), representados por el ácido graso oleico ($C_{18:1}$) (51,81-75,43%), a los que les siguen los ácidos grasos saturados (19,01-25,20%), de entre los que destaca el ácido graso palmítico ($C_{16:0}$) con el 15,15-20,38%, y finalmente, el grupo de ácidos grasos poliinsaturados (8,39 - 11,02%), caracterizados por el ácido graso linoleico ($C_{18:2}$) con el 8,22-10,91% (López-Cortés *et al.*, 2013; Sánchez-Zapata *et al.*, 2012). López-Cortés *et al.* (2013) evidenciaron la relación que existe entre las características de esta grasa y el origen del tubérculo, por lo que el tipo de chufa que se utilice para la elaboración del licuado también será determinante en el perfil lipídico del producto final. A parte, cabe tener presente que durante la fabricación del licuado, $\sim 30\%$ en peso de las chufas se pierde como subproducto, el cual contiene $\sim 23\%$ de la grasa del tubérculo (Morell *et al.*, 1983). Aún así, el licuado resultante suele contener un porcentaje destacado en grasa, generalmente comprendido entre el 1,5 y 2,5% (Consumer, 2014).

En este estudio no se detectó la presencia de hidroperóxidos en ninguna de las muestras que se analizaron, como compuestos resultantes de las primeras reacciones de oxidación de los ácidos grasos insaturados del producto. Cortés *et al.* (2005) tampoco detectaron estos compuestos en las horchatas analizadas en sus estudios después de su elaboración (horchata cruda) y tratamiento por pulsos eléctricos (20-35 kV/cm, 100-300 μ s). El índice de peróxidos del producto suele ser una de las técnicas más utilizadas para la evaluación de las primeras etapas de oxidación de las grasas, aunque debe considerarse que este índice no necesariamente refleja el grado de oxidación de la grasa, ya que depende del momento en que se determine. El método está limitado a las primeras fases del proceso de oxidación, en las que se detecta la máxima concentración de hidroperóxidos. Estos compuestos son productos altamente reactivos, por lo que en presencia de oxígeno, luz, enzimas o temperatura se descomponen rápidamente interaccionando con otras moléculas del producto, formando nuevos compuestos (Badui, 2006).

Conjuntamente con el método del ácido tiobarbitúrico (o TBA), uno de los métodos más utilizados para la evaluación de las reacciones secundarias de oxidación de la grasa es la

determinación de las sustancias volátiles tipo aldehídico resultantes mediante técnicas de extracción y cromatográficas (Badui, 2006; Mizutani *et al.*, 2004). El aldehído hexanal se suele utilizar como indicador de estas reacciones en los productos alimenticios, tanto por su bajo umbral de detección (~ 3 ppm) como por la relación lineal que existe entre la oxidación de la grasa y su concentración (Badui, 2006). En ciertos productos de origen vegetal en los que el hexanal se puede originar a través de dos vías de oxidación (auto-oxidación y oxidación enzimática), algunos autores proponen utilizar el aldehído nonanal como compuesto indicador de la auto-oxidación de la grasa del producto (Vichy *et al.*, 2003; Plutowska *et al.*, 2007). En este estudio, ambos aldehídos se tuvieron en consideración para estimar la oxidación de la grasa de las horchatas, junto con el contenido total en aldehídos del licuado.

En la Figura 7.7 se representan los valores correspondientes a la cantidad de aldehídos detectados en las diferentes horchatas después de su elaboración y procesado, como compuestos indicadores de las reacciones secundarias de oxidación de la grasa de los licuados. Estos resultados también se recogen en el capítulo relacionado con el perfil volátil de los licuados (Tabla 9.6 del *Capítulo 9* de esta memoria). Como se puede observar, los tratamientos que se aplicaron fueron determinantes en el nivel de oxidación lipídica en todas las horchatas evaluadas. Las horchatas homogenizadas-pasteurizadas P1 y P2 fueron las que presentaron un contenido en aldehídos totales más elevado, según la relación $P2 > P1$. En las dos horchatas, destacó en importancia el compuesto nonanal, probablemente como producto resultante de la oxidación del ácido graso oleico. Las horchatas cruda y UHPH les siguieron en importancia, según la relación $cruda = 300 > 200$ MPa. En las horchatas cruda y homogenizada a 200 MPa también destacó el aldehído nonanal, pero por el contrario, el hexanal fue el compuesto mayoritario en el licuado homogenizado a mayor presión, cuya procedencia se podría relacionar con la oxidación del ácido linoleico.

El proceso de homogenización en los licuados suele tener una repercusión directa en el incremento del grado de oxidación de la grasa del producto. Con la homogenización, el tamaño de las gotas de grasa reduce, por lo que incrementa el número total de gotas en suspensión y, en consecuencia, la superficie total de grasa expuesta a los fenómenos de oxidación. A parte, la temperatura suele actuar como catalizador de estas reacciones de

oxidación, motivo por el cual probablemente, en este estudio las horchatas P1 y P2 fueran las que presentaran unos niveles de oxidación más elevados. Las diferencias observadas entre estas dos horchatas podrían explicarse en base al emulgente que prevaleció en la interfase aceite-agua en cada caso. En el licuado P2, el aditivo que se utilizó como agente emulsionante de bajo peso molecular (*mono y diglicéridos de ésteres cítricos de ácidos grasos monoinsaturados*), aunque posee unas buenas propiedades emulsionantes, no suele ser tan efectivo en la protección de la grasa frente a los fenómenos de oxidación como lo son los emulgentes de tipo macromolecular (como por ejemplo las proteínas) (McClements, 2005; Osborn *et al.*, 2004). El recubrimiento que las proteínas otorgan a las gotas de grasa forma una interfase más fina y viscoelástica, otorgando mayor estabilidad oxidativa a la emulsión, en comparación con los emulgentes de bajo peso molecular (Fomuso *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en las horchatas cruda y UHPH evidenciaron la influencia de otros factores en la protección de la grasa frente a su oxidación. En el producto crudo, probablemente se obtuvieron unos valores de oxidación inferiores de los determinados en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas debido a la cobertura que se observó que tenían algunas de estas gotas (cobertura probablemente formada por proteínas, almidón, etc.) (Figura 7.5). La cantidad de aldehídos totales que se detectó en las horchatas homogenizadas a ultra alta presión (200 y 300 MPa) evidenció el efecto de la UHPH en la mejora de la estabilidad oxidativa del producto, en comparación con el tratamiento de homogenización-pasteurización convencional. Como se puede observar en la Figura 7.7, la horchata homogenizada a 200 MPa fue la que presentó los niveles de oxidación más bajos. Considerando el aumento del número de partículas en suspensión en los productos UHPH y por lo tanto, el aumento de la superficie grasa expuesta a los fenómenos de oxidación, estas muestras presentaron menor oxidación que las homogenizadas de manera convencional probablemente debido a la características de la capa de protección de las nuevas gotas de grasa que se formaron. Diferentes autores han observado que con la aplicación del tratamiento de UHPH, parte de las proteínas del producto cambian su conformación molecular (debido a su desnaturalización parcial) y son adsorbidas fácilmente en la interfase aceite-agua, confiriendo cierta protección a las gotas de grasa en suspensión (Fomuso *et al.*, 2002; McClements *et al.*, 2000). Como se observa en la Figura 7.6, el recubrimiento de las gotas de grasa de las emulsiones

obtenidas por UHPH es ligeramente más denso y complejo que el correspondiente a las horchatas P1 y P2, lo que podría explicar la mayor estabilidad oxidativa de las horchatas UHPH frente a las homogenizadas-pasteurizadas. El hecho de que la horchata homogenizada a 200 MPa fuera la que presentara mejor estabilidad oxidativa, en comparación con su homóloga homogenizada a 300 MPa, apuntó la falta de recubrimiento proteico en el licuado disponible para la protección de las nuevas gotas de grasa formadas con el tratamiento de homogenización a 300 MPa (Hebishy, 2013).

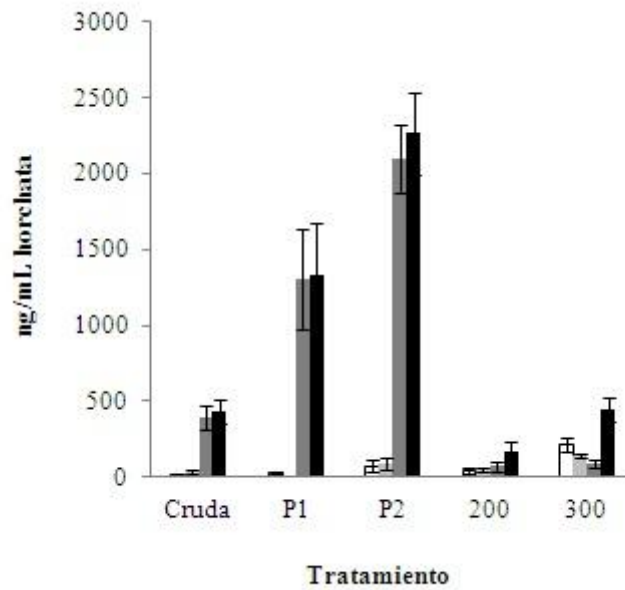


Figura 7.7. Contenido en hexanal (□), octanal (■), nonanal (■) y aldehídos totales (■) en las horchatas de chufa. Cruda: cruda, P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, Ti = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, Ti = 40 °C).

Otro factor que podría ser determinante en los niveles de oxidación en el licuado homogenizado a 300 MPa, en comparación con su homólogo homogenizado a menor presión, es el posible efecto de la máxima temperatura alcanzada durante el proceso de homogenización a 300 MPa sobre el nivel de desnaturalización de la proteína del producto. Con la aplicación del tratamiento de 300 MPa, a la salida de la válvula de

UHPH se alcanzaron temperaturas de hasta 116 °C (a diferencia de los 92 °C descritos en el tratamiento a 200 MPa), lo que habría podido causar la pérdida de gran parte de la funcionalidad de estas proteínas como agentes emulsionantes. En la Figura 7.6 se observan que la cantidad de agregados de proteína (AP) en el licuado 300 MPa es mayor que en el homogenizado a 200 MPa, agregados que probablemente corresponderían a estos agregados de proteína desnaturalizada.

Finalmente, destacar que la presencia de estos aldehídos en los licuados (junto con otros compuestos derivados de estas reacciones de degradación) se relaciona con notas a oxidado y grasiento (Plutowska *et al.*, 2007) y son los principales responsables de la aparición de sabores indeseables en muchos licuados vegetales con una cantidad de grasa importante. Los bajos niveles en que estos compuestos se detectaron en las horchatas probablemente influyó en que el panel catador no detectara diferencias entre el perfil aromático de estos licuados (ver apartado 7.2.5).

7.2.5. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las horchatas se realizó el tercer día de su elaboración y procesado. En general, las catas de los licuados no suelen realizarse el mismo día de su elaboración, ya que se recomienda dejarlos reposar un mínimo de tiempo para que su estructura y perfil sensorial se aposenten. A parte, previamente a la realización de estas evaluaciones, se comprobó que los productos cumplieran con los requisitos microbiológicos establecidos para su consumo. Debido a que los recuentos microbiológicos del producto crudo a día 3 eran elevados, se elaboró de nuevo horchata de chufa cruda el día antes de la realización de la cata, la cual substituyó al producto crudo elaborado al mismo día que las demás horchatas.

En este estudio se realizaron tres pruebas sensoriales: la primera fue un test descriptivo, para constituir una descripción organoléptica del producto, la segunda fue un test hedónico de ordenación, mediante el cual los catadores ordenaron las muestras según su preferencia, y por último, se realizó un test hedónico de puntuación, mediante el cual los catadores otorgaron una puntuación a los productos que evaluaron de manera independiente. En el Anexo I se presenta la hoja de cata que se utilizó.

El análisis descriptivo englobó los atributos que tienen un mayor impacto en la aceptabilidad de los licuados por parte del consumidor, entre los que destacan el color, la viscosidad, el sabor o el aroma del producto. La Figura 7.8 muestra los resultados más relevantes que se obtuvieron. En todos los licuados, las diferencias que los panelistas detectaron en los diferentes atributos tuvieron una puntuación media ≤ 1 , lo que correspondería a una *desviación mínima* del atributo en cuestión, en comparación con la muestra control. Esto se traduciría en que las diferencias entre licuados fueron muy pequeñas, y casi no apreciables por el panel catador.

Como se observa en la Figura 7.8, el color de las horchatas fue uno de los parámetros que más diferenció a los licuados. Los catadores caracterizaron a las horchatas homogenizadas como *menos amarillas* que el producto crudo o control, según la relación $200 = 300 < P1 = P2 < \text{cruda}$. Esto se traduciría en que los licuados homogenizados a ultra alta presión fueron los más blancos y de color más diferente al control, resultados que se correlacionan con lo descrito en el análisis instrumental de color de las horchatas (ver parámetros WI y ΔE^* , en Tabla 7.6).

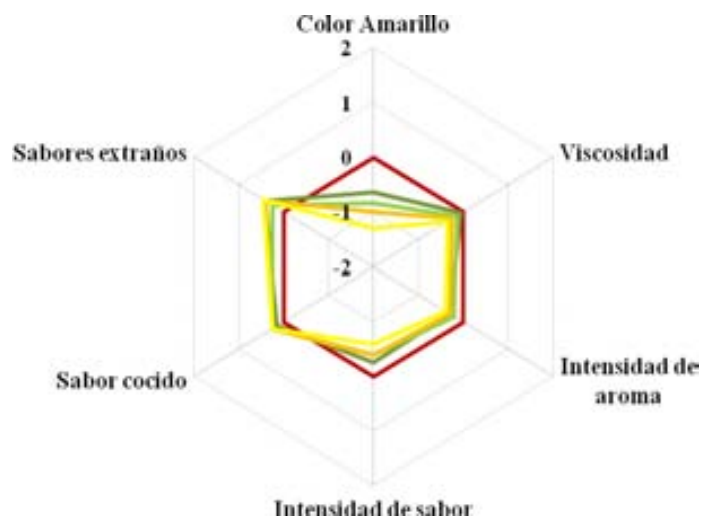


Figura 7.8. Atributos sensoriales evaluados en las horchatas. (■) cruda, (■) P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), (■) P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), (■) 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C) y (■) 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C), a día 3 de su envejecimiento en frío (4°C).

Por lo que refiere a los parámetros relacionados con el cuerpo del producto (viscosidad, sensación acuosa o presencia de partículas), en el análisis instrumental se evidenciaron ciertas diferencias entre licuados, las cuales dependieron del tipo de producto y del tratamiento aplicado. En la evaluación organoléptica de las horchatas, el panel catador detectó mínimas diferencias en dichos parámetros entre licuados (< 1), las cuales no dependieron del tratamiento que se aplicó en ninguno de los casos ($P > 0,05$). En esta evaluación tampoco se observaron grandes diferencias entre en los atributos relacionados con el sabor y aroma de las horchatas, las cuales tampoco dependieron del tratamiento que se aplicó ($P > 0,05$). Probablemente, la baja temperatura de realización de la cata (4-8 °C) enmascaró las diferencias existentes entre los atributos previamente mencionados en los diferentes licuados. De haberse realizado la cata a una temperatura más elevada (de p.e. ~ 20 °C), probablemente se hubieran detectado diferencias entre horchatas sobre todo en su sabor y aroma (p.e. a *cocido* y *extraños*), lo que se explicaría por la presencia de compuestos derivados de las reacciones de pardeamiento no enzimático, caramelización y oxidación lipídica debidas a la aplicación de los tratamientos de conservación. Aún así, debido a que este tipo de licuado se suele tomar en época estival y el consumidor está habituado a consumirlo muy frío (~ 5-8 °C), se consideró realizar la cata bajo unas condiciones lo más similares posible a las reales de consumo.

La Tabla 7.7 muestra los resultados obtenidos en el test hedónico de ordenación. Estos resultados evidenciaron la preferencia de los catadores por el producto crudo, ya que la horchata cruda fue la que con más frecuencia se clasificó en primer lugar. A esta le siguieron las horchatas P2, 200, P1 y 300, las cuales aunque obtuvieron la misma media en cuanto a su valor de clasificación, el valor correspondiente a su moda indicó que los catadores las ordenaron según el orden $200 = P2 > P1 > 300$. Los catadores argumentaron su evaluación en base al color del producto, lo que manifestó su preferencia por un color amarillento en este licuado de connotación tan tradicional.

Tabla 7.7. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba de ordenación^{1,2}.

Liculado ³	Media	Moda	Frecuencia relativa
Cruda	4,03 ^a ± 0,27	5	0,60
P1	2,73 ^b ± 0,24	2	0,30
P2	2,90 ^b ± 0,22	3	0,33
200 MPa	2,80 ^b ± 0,22	3	0,33
300 MPa	2,53 ^b ± 0,28	1	0,40

¹ Los valores 5, 4, 3, 2 y 1 corresponden al orden de preferencia de las muestras, siendo 5 = máxima preferencia.

² Media ± error estándar.

³Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Finalmente, el último test que se realizó fue una prueba hedónica, en la que los catadores puntuaron de 1 al 5 todas las horchatas, evaluadas independientemente y en orden aleatorio (ver Anexo I). Los resultados obtenidos en esta prueba se exponen en la Tabla 7.8.

Tabla 7.8. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba hedónica^{1,2}.

Liculado ³	Media ²	Moda	Frecuencia relativa
Cruda	5,38 ^c ± 0,71	7	0,50
P1	6,75 ^b ± 0,31	6	0,40
P2	7,63 ^a ± 0,18	8	0,63
200 MPa	7,00 ^b ± 0,33	6	0,53
300 MPa	6,13 ^c ± 0,55	7	0,50

¹ La puntuación de las muestras es de 1 a 9, según menor a mayor aceptación.

² Media ± error estándar.

³ Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Como se puede observar, mientras que en el test de ordenación los catadores decantaban su preferencia por la horchata cruda, cuando los licuados se probaron de forma

independiente, todas las bebidas recibieron una puntuación muy similar. Las medias obtenidas en la puntuación de las horchatas cruda y homogenizada a 300 MPa fueron las más bajas, mientras que la puntuación media obtenida en la horchata pasteurizada P2 fue la más elevada. La Tabla 7.8 también muestra la puntuación que con más frecuencia se obtuvo en las diferentes horchatas, correspondiendo esta a los valores 7, 6, 8, 6 y 7 en las horchatas cruda (50% de los casos), P1 (40% de los casos), P2 (63% de los casos), 200 (53% de los casos) y 300 MPa (50% de los casos), respectivamente. Estos resultados apuntarían que, de ser consumidas independientemente, el consumidor las juzgaría de manera similar, aceptándolas por igual.

7.3. Conclusiones

Este estudio demostró la efectividad de los tratamientos de higienización aplicados sobre la reducción de los recuentos microbianos de la horchata de chufa cruda. Con el tratamiento de homogenización a 200 MPa se consiguieron unos resultados parecidos a los obtenidos en ambas horchatas homogenizadas-pasteurizadas convencionalmente, con y sin aditivos (18+4 MPa, 80 °C, 15s) (reducción de ~ 2 log ufc/mL), siendo el tratamiento de homogenización a 300 MPa el más efectivo (reducción de ~ 3 log ufc/mL).

Los tratamientos de conservación que se aplicaron no modificaron la composición general de los licuados, pero sí comportaron algunos cambios sobre sus características físico-químicas y sensoriales. El color de las horchatas se vio alterado por la aplicación de ambos procesos de conservación, siendo las horchatas homogenizadas más blancas que el producto crudo (según la relación $P1 = P2 > 200 = 300$). Con el tratamiento de homogenización a 300 MPa se consiguió inactivar totalmente la actividad de la enzima peroxidasa, no observándose diferencias entre las bebidas pasteurizadas y la homogenizada a 200 MPa (cuya reducción fue del $\sim 80\%$ en comparación con el producto crudo). El tratamiento de homogenización-pasteurización convencional causó unos mayores niveles de oxidación en el producto recién tratado, siendo la horchata homogenizada a 200 MPa la que menor contenido en aldehídos totales presentó, mientras que los niveles de oxidación de las horchatas cruda y 300 MPa fueron similares. En los licuados homogenizados y en comparación con el producto crudo, las

emulsiones se caracterizaron por la reducción del tamaño de las partículas en suspensión, lo que comportó un aumento en su número. En estas horchatas se crearon nuevas interacciones entre partículas, debido al efecto del tratamiento aplicado sobre los componentes del licuado. Los resultados que se observaron en la estructura coloidal de los licuados apuntaron que las horchatas UHPH y P2 probablemente serían las que tuvieran una vida útil más estable físicamente. Sensorialmente, los tratamientos aplicados tan sólo afectaron al color de las horchatas. La baja temperatura a la cual se realizó la cata probablemente enmascarara posibles de diferencias entre licuados. Aún así los catadores no mostraron una clara tendencia en la preferencia entre unos licuados u otros, lo que apuntaría la aceptación del mercado por todos los productos.

Capítulo 8

La homogenización a ultra alta presión como tecnología alternativa al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional para la obtención de una horchata de chufa de vida útil mejorada

8

La homogenización a ultra alta presión como tecnología alternativa al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional para la obtención de una horchata de chufa de vida útil mejorada

8.1. Introducción

La industria alimentaria actual persigue la búsqueda de tecnologías que permitan obtener productos de calidad higiénica y fisico-química mejorada, respecto a los obtenidos mediante tecnologías convencionales, y que a la vez, estabilicen al máximo estas características durante su vida comercial. Son múltiples las reacciones en las que los componentes del producto se verán involucrados durante su almacenamiento, reacciones que en la mayoría de los casos afectarán a su calidad, determinando la aceptabilidad del producto por parte del consumidor. Entre otras, destacan las reacciones de oxidación de la grasa, las reacciones de pardeamiento no enzimático, la pérdida de la estabilidad coloidal de la emulsión, así como todos los cambios fisico-químicos determinados por el crecimiento microbiano en el producto.

De entre las características que determinarán la aceptación y preferencia del consumidor por un producto en el mercado destacan su color, sabor, aspecto y aroma, atributos que quedarán altamente afectados por las reacciones de degradación previamente mencionadas. Los tratamientos de higienización térmicos convencionales, como es el tratamiento de pasteurización en continuo, mejoran notablemente la vida útil de los productos procesados, aunque debido al efecto de la temperatura, aparecen en el producto ciertas reacciones de degradación (pardeamiento, oxidación lipídica, desestabilización coloidal, etc.), por lo que los productos procesados suelen presentar diferencias respecto a sus homólogos crudos. Actualmente, se ha visto que algunas tecnologías emergentes, como es la UHPH, mejoran la estabilización de las características de los productos fluidos alimentarios durante su vida útil, a diferencia de las tecnologías térmicas convencionales, y en muchos casos evitan la necesidad de suplementar al producto con aditivos estabilizantes.

Por todo ello, el principal objetivo de este estudio fue evaluar y comparar las características microbiológicas, físico-químicas y organolépticas (ver *Capítulo 3, apartado 3.5*) de las horchatas de chufa analizadas en el capítulo anterior (cruda, homogenizadas-pasteurizadas con y sin aditivos y homogenizadas a ultra alta presión) durante su almacenamiento en refrigeración (4°C), para determinar el efecto de la aplicación de los diferentes procesos tecnológicos sobre la vida útil del licuado.

8.2. Resultados y discusión

8.2.1. Microbiología y pH

La calidad microbiológica de los productos durante su conservación es un aspecto fundamental para el establecimiento de su vida útil. Por ello, la evolución de la microbiota en el producto constituyó uno de los análisis más importantes a realizar.

La Tabla 8.1 muestra los recuentos de los diferentes grupos de microorganismos que se obtuvieron en las horchatas cruda, homogenizadas-pasteurizadas y UHPH almacenadas en refrigeración. Como se puede observar, desde el momento de su elaboración en adelante, los recuentos microbiológicos de todos los licuados incrementaron a razón del tiempo de almacenamiento de los productos en frío. Destacar que en ningún momento se detectaron enterobacterias, lactobacilos ni mohos y levaduras en ninguno de los productos. La horchata cruda fue el licuado en el cual los recuentos microbiológicos incrementaron más rápidamente después de su elaboración. Al tercer día de almacenamiento, las poblaciones de microorganismos mesófilos y psicrótrofos ya presentaban unos recuentos muy próximos al límite máximo permitido en la antigua legislación, de ~ 6 log ufc/mL (España, 1988), resultados que coincidieron con lo descrito en la bibliografía sobre la reducida vida útil de este licuado crudo, normalmente no superior a 4 días (Moneris *et al.*, 1999; Moreno-Seguí *et al.*, 2000). Por el contrario, en la horchata cruda, los recuentos de esporas ($2,73 \pm 0,19$ log ufc/mL), enterobacterias ($3,05 \pm 0,12$ log ufc/mL), coliformes ($2,68 \pm 0,40$ log ufc/mL), lactobacilos ($3,05 \pm 1,56$ log ufc/mL) y mohos y levaduras ($3,56 \pm 0,23$ log ufc/mL) se mantuvieron bastante estables. La estabilidad en estos recuentos se podría explicar por el reemplazo con el transcurso del tiempo de estos grupos microbianos por la flora psicrótrófica del producto, así como también por la pérdida de viabilidad de algunos de estos microorganismos

consecuencia de la refrigeración. Moreno-Seguí *et al.* (2000) también observaron una ligera disminución de las enterobacterias en diferentes horchatas crudas almacenadas durante 48 h a 2 °C, lo que atribuyeron al efecto del frío sobre la microbiota del producto.

Durante este período, el pH de la horchata cruda disminuyó bruscamente, aproximadamente 0,5 unidades respecto al momento inicial, lo que se podría atribuir tanto a la actividad microbiana como enzimática en el producto. El valor de pH de la horchata cruda a día 3 fue de $6,49 \pm 0,62$.

Considerando que todas las horchatas de este estudio se conservaron en condiciones de refrigeración (4 °C), los microorganismos psicrótrofos se presentaron como una de las poblaciones más interesantes de estudio en los licuados homogenizados-pasteurizados y tratados por UHPH. Estos microorganismos, en gran parte, son los que se van a desarrollar durante la vida útil de las horchatas, causando las principales alteraciones en el producto almacenado. La Figura 8.1 muestra las curvas correspondientes a la tendencia de crecimiento de los microorganismos psicrótrofos en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión, los cuales se obtuvieron a partir de los resultados expuestos en la Tabla 8.1 y mediante el programa de modelización DMFit (ver *Capítulo 3, apartado 3.5.12*).

Como se puede observar en la Figura 8.1, los tratamientos de pasteurización y UHPH tuvieron un efecto importante sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos psicrótrofos en las horchatas, por lo que determinaron, en gran parte, su vida útil. Si bien la reducción bacteriana después de la aplicación del tratamiento de pasteurización y de UHPH a 200 MPa fue la misma, el efecto de ambos tratamientos sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos en el licuado de chufa difirió.

Tabla 8.1. Recuentos microbiológicos (log ufc/mL) de las horchatas cruda, pasteurizadas (P1 y P2) y homogenizadas a ultra alta presión (200 y 300 MPa) durante su almacenamiento a 4 °C.

Grupo Microbiano	Día	Tratamiento					
		Cruda	P1	P2	200	300	
Psicrótrofos	1	5,37 ^{a,x} ± 0,33	3,01 ^{b,z} ± 0,10	2,80 ^{bc,z} ± 0,10	3,00 ^{b,y} ± 0,11	2,37 ^{c,z} ± 0,13	
	3	6,01 ^w ± 0,28	-	-	-	-	
	7	-	3,26 ^{a,yz} ± 0,06	3,40 ^{a,xy} ± 0,23	3,62 ^{a,xy} ± 0,20	2,34 ^{b,z} ± 0,10	
	14	-	3,52 ^{ab,xy} ± 0,15	4,05 ^{a,yz} ± 0,40	3,62 ^{ab,xy} ± 0,20	2,89 ^{b,xz} ± 0,09	
	18	-	3,66 ^{b,x} ± 0,17	4,62 ^{a,x} ± 0,02	3,01 ^{c,y} ± 0,17	2,61 ^{c,z} ± 0,13	
	21	-	4,10 ^{a,x} ± 0,06	4,03 ^{ab,xz} ± 0,07	3,60 ^{b,xy} ± 0,23	2,82 ^{c,xz} ± 0,10	
	25	-	5,83 ^{a,w} ± 0,18	6,04 ^{a,w} ± 0,29	2,70 ^{b,y} ± 0,03	3,10 ^{b,xz} ± 0,35	
	28	-	-	-	4,44 ^{a,x} ± 0,06	3,40 ^{b,x} ± 0,15	
	30	-	-	-	5,76 ^{a,w} ± 0,24	3,13 ^{b,xz} ± 0,29	
	35	-	-	-	-	3,16 ^{xz} ± 0,43	
	42	-	-	-	-	3,52 ^x ± 0,61	
	49	-	-	-	-	3,63 ^{wx} ± 0,18	
	54	-	-	-	-	4,98 ^w ± 0,19	
	58	-	-	-	-	6,29 ^w ± 0,04	
	Mesófilos	1	5,51 ^{a,x} ± 0,23	2,78 ^{b,y} ± 0,25	2,93 ^{b,y} ± 0,06	3,03 ^{b,y} ± 0,07	2,29 ^{c,y} ± 0,17
3		6,37 ^w ± 0,11	-	-	-	-	
7		-	3,27 ^{a,y} ± 0,08	3,34 ^{a,xy} ± 0,13	3,53 ^{a,xy} ± 0,17	2,52 ^{b,yz} ± 0,17	
14		-	3,32 ^{ab,y} ± 0,08	3,79 ^{a,x} ± 0,13	3,35 ^{ab,xy} ± 0,24	2,89 ^{b,yz} ± 0,19	
18		-	3,99 ^{a,x} ± 0,06	3,74 ^{a,x} ± 0,19	3,12 ^{b,y} ± 0,09	2,53 ^{c,yz} ± 0,14	
21		-	4,20 ^{a,x} ± 0,09	3,58 ^{b,x} ± 0,17	3,45 ^{b,xy} ± 0,21	2,14 ^{c,z} ± 0,07	
25		-	5,66 ^{a,w} ± 0,19	6,02 ^{a,w} ± 0,03	3,27 ^{b,xy} ± 0,26	2,57 ^{c,yz} ± 0,25	
28		-	-	-	4,19 ^{a,x} ± 0,05	2,53 ^{b,yz} ± 0,20	
30		-	-	-	6,04 ^{a,w} ± 0,04	2,85 ^{b,y} ± 0,41	
42		-	-	-	-	3,55 ^y ± 0,63	
49		-	-	-	-	3,90 ^y ± 0,03	
54		-	-	-	-	5,08 ^x ± 0,23	
58		-	-	-	-	6,03 ^w ± 0,05	
Esporas		1	2,53 ^{a,w} ± 0,23	2,22 ^{a,x} ± 0,34	2,18 ^{a,xy} ± 0,33	2,17 ^{a,xz} ± 0,45	2,23 ^{a,xy} ± 0,38
		3	2,73 ^w ± 0,19	-	-	-	-
	7	-	2,93 ^{a,wx} ± 0,11	2,27 ^{ab,x} ± 0,40	2,40 ^{ab,x} ± 0,20	1,72 ^{b,z} ± 0,33	
	14	-	2,62 ^{a,wx} ± 0,10	1,65 ^{b,y} ± 0,41	2,34 ^{a,x} ± 0,32	2,54 ^{a,xy} ± 0,15	
	18	-	2,86 ^{a,wx} ± 0,07	2,94 ^{a,wx} ± 0,05	2,62 ^{b,x} ± 0,20	2,28 ^{b,y} ± 0,11	
	21	-	2,88 ^{b,wx} ± 0,11	2,39 ^{b,wx} ± 0,09	3,31 ^{a,wx} ± 0,20	2,54 ^{b,xy} ± 0,07	
	25	-	3,06 ^{b,w} ± 0,14	3,75 ^{a,w} ± 0,21	2,83 ^{b,wx} ± 0,03	2,30 ^{c,y} ± 0,15	
	28	-	-	-	3,38 ^{a,w} ± 0,34	2,48 ^{b,y} ± 0,15	
	30	-	-	-	3,33 ^{a,w} ± 0,16	2,66 ^{b,xy} ± 0,13	
	35	-	-	-	-	2,74 ^{xy} ± 0,27	
	42	-	-	-	-	3,29 ^w ± 0,01	
	49	-	-	-	-	3,34 ^w ± 0,15	
	54	-	-	-	-	2,99 ^{wx} ± 0,50	
	58	-	-	-	-	3,18 ^{wx} ± 0,10	

¹ Media ± error estándar. ND: no detectado.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

^{w-z} Para cada grupo microbiano, valores en la misma columna con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

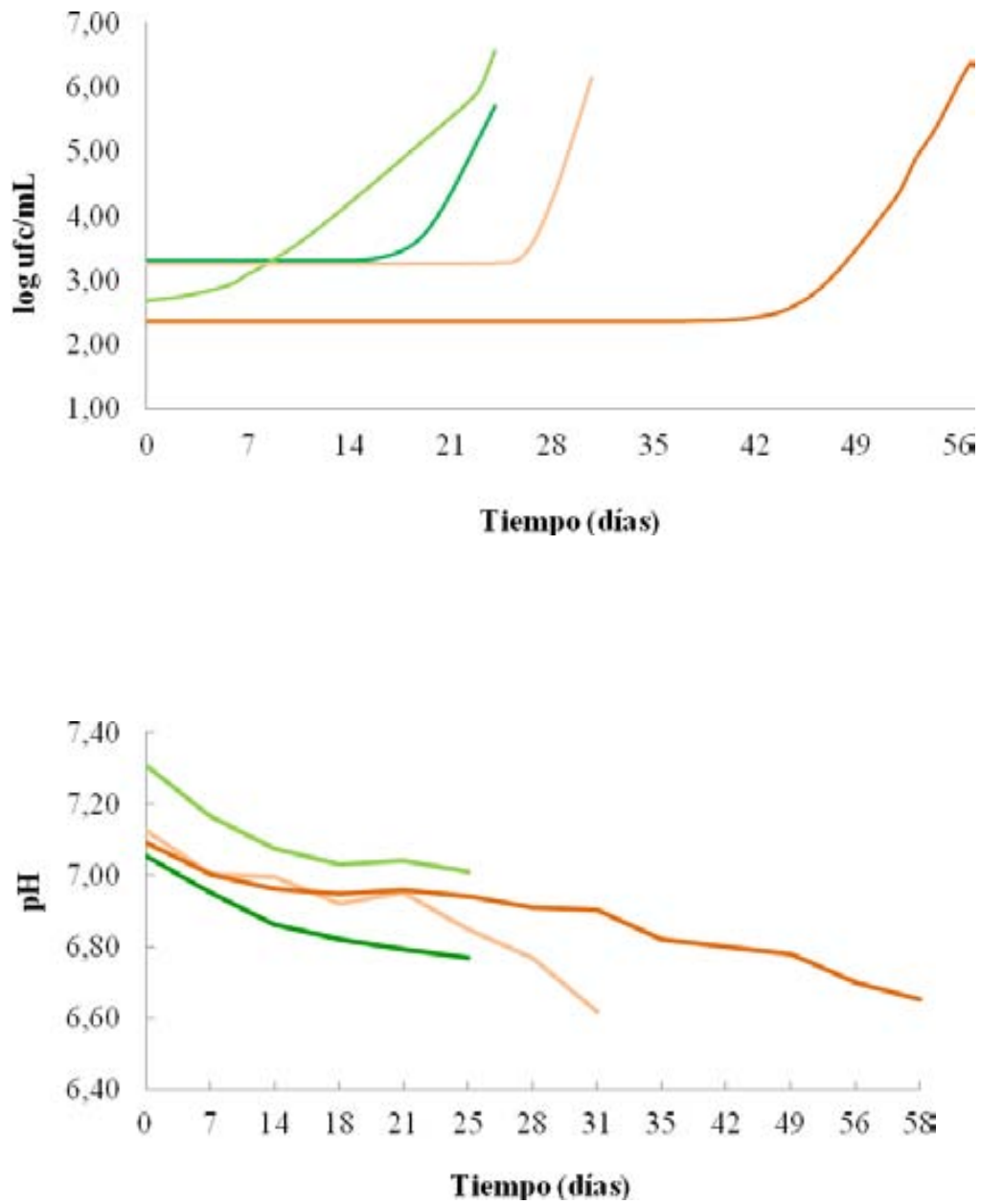


Figura 8.1. Evolución de los recuentos de microorganismos psicrótrofos y del valor de pH de las horchatas P1 (■), P2 (■), 200 MPa (■) y 300 MPa (■) durante el tiempo de almacenamiento de los productos en frío (4 °C). P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa, 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la duración de fase de latencia de los microorganismos psicrótrofos entre las horchatas P1, P2, 200 y 300, siendo esta fase < 19 días en las bebidas homogenizadas-pasteurizadas (P1 y P2) y de ~ 27 y 43 días en los licuados homogenizados a 200 y 300 MPa, respectivamente (Tabla 8.2).

Tabla 8.2. Valores de la fase de latencia (fase lag) y velocidad máxima (μ máx) de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos psicrótrofos en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión.

Tratamiento	Fase lag (días)	μ máx (log ufc/mL /día)	Vida útil estimada (días)
P1	18,56 ^c \pm 0,92	0,46 ^b \pm 0,06	23,59 - 25,73
P2	6,23 ^d \pm 1,56	0,17 ^d \pm 0,02	22,03 - 27,61
200	26,96 ^b \pm 0,68	0,60 ^a \pm 0,07	28,93 - 31,11
300	43,18 ^a \pm 2,06	0,26 ^c \pm 0,05	55,40 - 58,65

¹ Media \pm error estándar.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

^{a-c} Valores en la misma columna con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Entre otros, la duración de la fase de latencia está determinada por el estado fisiológico de las células microbianas, lo que repercute en su crecimiento y multiplicación. Las diferencias que se observaron en la fase de latencia de los microorganismos entre las horchatas P1 y P2 (Tabla 8.2) podrían explicarse por las diferencias existentes en las propiedades físico-químicas y de composición de la matriz alimentaria de las dos bebidas. La adición de aditivos estabilizantes en el licuado P2 podría haber causado un efecto protector sobre las células microbianas del producto, disminuyendo los daños causados sobre estas células por el tratamiento de homogenización-pasteurización, a diferencia del licuado P1 en el que habrían quedado más expuestas a la aplicación del tratamiento de higienización. Con la aplicación de ambos tratamientos de UHPH, la duración de la fase de latencia de los microorganismos psicrótrofos aumentó, en comparación con la de las horchatas P1 y P2 (Tabla 8.2). Thiebaud et al. (2006) describieron que los fenómenos físicos a los que se somete el producto durante los tratamientos de UHPH (fenómenos de cavitación, esfuerzo cortante, turbulencia, etc.) causan un cierto grado de lesión sobre las células bacterianas, hecho que probablemente

explique los resultados que se obtuvieron en este estudio. El incremento de la presión de homogenización, de 200 a 300 MPa, también comportó un incremento en días en la fase de latencia de los microorganismos en la horchata homogenizada a mayor presión (Tabla 8.2), lo que evidenció el efecto de la presión de homogenización sobre el estado fisiológico de la célula bacteriana.

Pasada esta fase, los microorganismos crecieron exponencialmente en los cuatro tipos de horchatas. Este crecimiento se podría relacionar con la recuperación de las células microbianas a los daños producidos por los tratamientos de higienización que se aplicaron. Entre otros, la velocidad de crecimiento de las bacterias está relacionada con la disponibilidad de nutrientes en el medio. En este estudio se observó una tendencia a menores velocidades de crecimiento microbiano en los productos en los que la grasa y la proteína estaban más intrínsecamente relacionadas en el producto, y quizá menos biodisponibles para las bacterias. La horchata P2 fue la que presentó la menor velocidad de crecimiento (valor de μ máx inferior) en la fase de crecimiento exponencial, seguida por la horchata homogenizada a 300 MPa, mientras que el valor de μ máx en las bebidas P1 y 200 MPa fue de casi el doble (Tabla 8.2). Poliselí-Scopel (2012) también destacaron que la aplicación de la homogenización a ultra alta presión provocaba ciertos cambios sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos mesófilos en licuado de soja conservado a 4 °C durante 28 días, en comparación con el efecto producido por un tratamiento de pasteurización convencional.

Como se puede observar en la Tabla 8.1, los microorganismos esporulados también presentaron cierto incremento al final de la vida útil de las horchatas pasteurizadas y UHPH (de ~ 1 log ufc/mL en todas las horchatas). Entre los microorganismos esporulados descritos en la horchata de chufa, destacan los del género *Bacillus*, capaces de crecer en condiciones de refrigeración y corresponsables de los ligeros cambios de viscosidad que pueden aparecer en las horchatas al final de su vida útil (Lafuente *et al.*, 1985).

Por todo ello, en este estudio se observó que los tratamientos de UHPH mejoraron significativamente la vida útil de las horchatas, en comparación con el tratamiento de pasteurización convencional. La vida útil estimada de los licuados P1 y P2 fue muy similar, de 23,59 - 25,73 y 22,03 - 27,61 días, respectivamente, ya que el incremento de

la velocidad de crecimiento (μ máx) de los microorganismos en el producto P1 compensó la mayor duración del período de latencia de estos microorganismos en el producto pasteurizado sin aditivos (Tabla 8.2). En los productos tratados por UHPH, el incremento de presión a 300 MPa mejoró la vida útil estimada de la horchata, de 55,40-58,65 días, en comparación con la horchata homogenizada a 200 MPa, la cual presentó una vida útil estimada de 28,93 - 31,11 días. Destacar que los resultados obtenidos en la estimación de la vida útil de las horchatas mediante el programa DmFIT correspondieron a los que se obtuvieron a través de los recuentos microbianos de los productos envejecidos a 4 °C (Tabla 8.1). Según estos resultados, y considerando la antigua norma microbiológica para el consumo de horchata de chufa (España, 1988), la vida útil microbiológica de las horchatas homogenizadas-pasteurizadas (P1 y P2) y homogenizadas a 200 y 300 MPa fue de 25, 30 y ~ 58 días, respectivamente.

La Figura 8.1 muestra la evolución del pH de las horchatas durante su almacenamiento en refrigeración (4 °C). Como se puede observar en los diferentes licuados, los valores de pH disminuyeron paralelamente con el crecimiento microbiológico. El pH de las horchatas pasteurizadas P1 y P2 disminuyó un total de ~ 0,26 unidades al final de su vida útil, siendo el valor de pH de las horcahtas P1 y P2 a los 25 días de almacenamiento de 6,77 y 7,01, respectivamente. El pH de la horchata P2, el más elevado desde un inicio, se mantuvo en todo momento con un valor superior al resto. En las bebidas homogenizadas a 200 y 300 MPa, el pH llegó a valores de hasta 6,62 y 6,65, respectivamente. Como se observa en la Figura 8.1, el pH del producto homogenizado a 200 MPa disminuyó más rápidamente que en la horchata homogenizada a 300 MPa, probablemente debido a la mayor actividad de la microbiota (y de las enzimas) del producto durante su almacenamiento en frío.

8.2.2. Estabilidad físico-química

8.2.2.1. Oxidación de la grasa: compuestos volátiles relacionados

La oxidación lipídica en los productos almacenados constituye una de las principales causas de su pérdida de calidad. Este proceso de degradación está intrínsecamente relacionado con la aparición de sabores y aromas indeseados en el producto, lo cual limita su aceptabilidad, así como también la pérdida de su calidad nutricional (Badui,

2006). En licuados con un elevado contenido en ácidos grasos insaturados, como es la horchata de chufa, estas reacciones constituyen una de las principales causas de la aparición de sabores indeseables y/o extraños en el producto durante su almacenamiento y venta. Por ello, la evaluación de la evolución de estas reacciones será de vital importancia en este tipo de licuados, como marcador de la calidad del producto almacenado.

En este estudio, en las horchatas de chufa almacenadas tampoco se detectaron productos resultantes de las reacciones primarias de oxidación de la grasa (evaluados en este estudio como *hidroperóxidos*) durante su vida útil. Estos resultados evidenciaron nuevamente la alta reactividad de estos compuestos y su rápida transformación en otros compuestos en resultado de las reacciones secundarias de oxidación de la grasa del licuado. Como en el caso anterior, para estimar el proceso de oxidación de la grasa de las horchatas durante su vida útil, se tomó como indicador la cantidad de aldehídos totales de las horchatas almacenadas. Los resultados correspondientes a la horchata de chufa cruda no se presentan en este estudio, ya que en los tres días de vida útil del licuado, no se observaron diferencias significativas en su contenido en aldehídos totales. La Figura 8.2 muestra la evolución de los aldehídos en las horchatas de chufa P1, P2, 200 MPa y 300 MPa, durante su conservación en refrigeración.

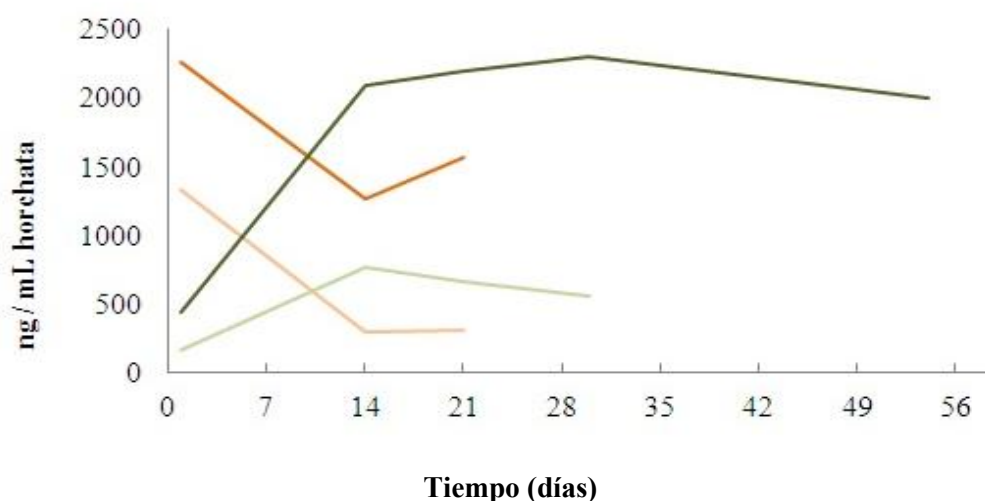


Figura 8.2. Contenido de aldehídos totales (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol por mL de horchata) en las horchatas P1 (■, homogenizada-pasteurizada a 18+4 MPa, 80 °C, 15 s), P2 (■, homogenizada-pasteurizada a 18+4 MPa, 80 °C, 15 s con aditivos estabilizantes), 200 (■, homogenizada a 200 MPa y $T_i = 40^\circ\text{C}$) y 300 MPa (■, homogenizada a 300 MPa y $T_i = 40^\circ\text{C}$).

En las dos muestras pasteurizadas P1 y P2, el contenido en aldehídos totales disminuyó desde el momento de su producción y tratamiento en adelante, hasta los 14 días de conservación del producto en frío, a partir del cual se estabilizó. Esta disminución se debió, principalmente, a la disminución del contenido en nonanal de las horchatas, ya que el contenido en hexanal de estos productos se mantuvo estable a lo largo de la vida útil de los licuados (ver *Capítulo 9*, Tabla 9.15). Coincidiendo con los resultados obtenidos en el momento inicial (día 1), al final de la vida útil de ambas horchatas el contenido total en aldehídos fue superior en el producto P2.

Por el contrario, en las dos horchatas UHPH, el contenido en aldehídos totales aumentó a razón del tiempo de almacenamiento de los productos en frío, hasta los 14 días de su conservación en refrigeración. En el caso de la horchata homogenizada a 200 MPa, este aumento fue debido al incremento del aldehído nonanal, mientras que en el caso del licuado homogenizado a mayor presión, ambos aldehídos nonanal y hexanal aumentaron su presencia. A partir de ese momento, el contenido total en aldehídos en ambas horchatas UHPH se estabilizó, no presentando diferencias significativas ($P > 0,05$) respecto al contenido de aldehídos totales observado al final de sus respectivas vidas útiles microbiológicas. Como se puede observar en la Figura 8.2, en todo momento, el contenido en aldehídos totales en la horchata homogenizada a 300 MPa fue superior que el de la horchata homogenizada a menor presión (200 MPa).

Comparando la cantidad de aldehídos totales de las diferentes horchatas al final de su vida útil, se observa que la horchata P1 fue la que presentó el contenido más bajo, seguida por la horchata 200 MPa y finalmente por las P2 y 300 MPa, cuyos contenidos no fueron significativamente ($P > 0,05$) diferentes entre ellas (ver *Capítulo 9*, Tabla 9.15). Si observamos la evolución de otras familias de compuestos cuyo origen también se podría relacionar con la oxidación de la grasa en el producto (como son algunos alcoholes, ácidos, cetonas o ésteres), se observa que el contenido de algunos de estos compuestos en las horchatas P1 y P2 fue superior al detectado en las horchatas UHPH. Estos resultados podrían explicar la disminución de la familia de compuestos aldehídos en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas, disminución argumentada por su transformación (mediante reacciones de oxidación y/o reducción) en otros compuestos.

Los resultados obtenidos apuntaron que, en todas las horchatas, la evolución de los compuestos volátiles resultantes de las reacciones de la oxidación no perjudicó el perfil

sensorial de los licuados en el tiempo, lo que se corroboró con los resultados obtenidos en los análisis sensoriales (ver *apartado 8.2.3*).

8.2.2.2. *Color*

La Tabla 8.3 muestra los resultados obtenidos en el análisis de color de las horchatas durante su vida útil. La evolución de este parámetro durante la vida útil de los licuados es muy importante, ya que los cambios de color durante el almacenamiento de los alimentos suelen relacionarse con la aparición de reacciones de degradación en el producto. A parte, este atributo es uno de los que el consumidor juzgará para la aceptación del licuado, exigiendo que se mantenga, en mayor medida, durante su vida comercial.

Como se puede observar, el color de todos los licuados cambió ligeramente con el transcurso de la vida útil de los productos. De hecho, las diferencias de color (ΔE^*) detectadas instrumentalmente en todos los licuados a día 1 y al final de su vida útil fueron significativas ($P < 0,05$). El color de la horchata cruda varió ligeramente durante los tres días de su vida útil microbiológica. En este licuado, se observó una disminución en el valor de luminosidad, por lo que la horchata tendió a oscurecer. El color de las horchatas P1 y P2 varió durante la primera semana de almacenamiento de los licuados en frío, a partir de la cual se mantuvo bastante estable (ver evolución ΔE^*). Al final de su vida útil, estas horchatas presentaron un color más oscuro (o menos blanco), de pureza similar a la del licuado recién elaborado y procesado. Por el contrario, en las horchatas 200 y 300 MPa, el valor correspondiente a ΔE^* entre el producto a día 1 y el almacenado en frío aumentó hasta los 21 días de almacenamiento. Pasado este tiempo, los valores de ΔE^* tendieron a estabilizarse, presentando una tendencia a disminuir en algunos casos (lo que significa que el color volvió a asemejarse al del producto en el momento inicial). Al final de su vida útil, los licuados UHPH presentaron una mayor saturación de color, lo que se traduciría en que el color de ambos licuados fue más limpio y llamativo. En estas horchatas (200 y 300 MPa), el parámetro WI también disminuyó a razón del período de conservación de los licuados en frío, por lo que ambas horchatas presentaron un color menos blanco, probablemente debido a la formación de los nuevos agregados de partículas en el producto (ver Tabla 8.4).

Tabla 8.3. Evolución del color de las horchatas durante su almacenamiento en frío.

Licuado ²	Día	Parámetros evaluados ¹				ΔE^*	WI ¹	C* ¹
		L*	a*	b*				
Cruda	1	80,76 ^a ± 0,45	0,48 ^a ± 0,04	14,92 ^a ± 0,17	-	75,62 ^a ± 0,27	14,93 ^a ± 0,32	
	3	79,17 ^b ± 0,47	0,53 ^a ± 0,05	15,42 ^a ± 0,29	2,98 ^a ± 0,44,	74,03 ^b ± 0,22	15,43 ^a ± 0,17	
P1	1	81,85 ^a ± 0,27	-0,18 ^b ± 0,03	13,80 ^a ± 0,14	1,64 ^b ± 0,12	77,19 ^{ab} ± 0,22	13,80 ^a ± 0,22	
	7	81,76 ^a ± 0,34	-0,04 ^b ± 0,02	13,55 ^{ab} ± 0,14	2,30 ^{ab} ± 0,13	77,55 ^a ± 0,30	13,55 ^a ± 0,43	
	14	81,87 ^a ± 0,55	0,06 ^b ± 0,03	13,08 ^b ± 0,11	2,24 ^{ab} ± 0,19	77,33 ^a ± 0,38	13,08 ^b ± 0,16	
	21	81,55 ^b ± 0,83	0,54 ^a ± 0,09	13,50 ^{ab} ± 0,18	2,85 ^a ± 0,53	76,39 ^b ± 0,18	13,51 ^a ± 0,21	
P2	1	82,18 ^{ab} ± 0,20	0,04 ^c ± 0,02	12,96 ^a ± 0,11	2,28 ^b ± 0,08	77,96 ^{ab} ± 0,11	12,96 ^a ± 0,12	
	7	81,78 ^{ab} ± 0,27	0,35 ^{ab} ± 0,01	12,55 ^{ab} ± 0,15	2,57 ^a ± 0,18	77,87 ^b ± 0,28	12,55 ^b ± 0,13	
	14	82,34 ^b ± 0,47	0,26 ^b ± 0,04	12,81 ^{ab} ± 0,17	2,59 ^a ± 0,24	78,63 ^a ± 0,54	12,81 ^a ± 0,43	
	21	82,64 ^a ± 0,61	0,40 ^a ± 0,04	12,42 ^b ± 0,19	2,90 ^a ± 0,14	77,35 ^b ± 0,25	12,43 ^b ± 0,20	
200	1	82,87 ^a ± 0,18	-0,13 ^d ± 0,01	12,19 ^{ab} ± 0,06	3,15 ^{abc} ± 0,01	78,97 ^{ab} ± 0,11	12,19 ^{ab} ± 0,11	
	7	82,73 ^a ± 0,27	0,01 ^c ± 0,03	11,66 ^b ± 0,16	3,63 ^{abc} ± 0,19	79,16 ^{ab} ± 0,26	11,66 ^c ± 0,38	
	14	83,31 ^a ± 0,53	0,12 ^b ± 0,04	11,91 ^b ± 0,07	3,75 ^{ab} ± 0,16	79,47 ^a ± 0,40	11,91 ^b ± 0,15	
	21	83,31 ^a ± 0,14	0,18 ^b ± 0,01	11,72 ^b ± 0,16	3,89 ^a ± 0,27	79,58 ^a ± 0,43	11,72 ^{bc} ± 0,01	
	30	81,26 ^b ± 0,02	0,37 ^a ± 0,04	12,52 ^a ± 0,17	2,95 ^{bc} ± 0,13	78,43 ^b ± 0,16	12,52 ^a ± 0,13	
300	1	82,49 ^{ab} ± 0,11	-0,13 ^c ± 0,02	12,04 ^{ab} ± 0,09	3,18 ^{abc} ± 0,08	78,74 ^b ± 0,07	12,04 ^b ± 0,20	
	7	82,59 ^{ab} ± 0,21	0,04 ^d ± 0,01	11,30 ^b ± 0,19	3,92 ^{ab} ± 0,20	79,24 ^a ± 0,24	11,30 ^d ± 0,05	
	14	83,25 ^a ± 0,56	0,04 ^d ± 0,01	11,49 ^{ab} ± 0,11	4,12 ^a ± 0,25	79,67 ^a ± 0,47	11,49 ^{cd} ± 0,09	
	21	82,93 ^{ab} ± 0,55	0,18 ^{bc} ± 0,02	11,36 ^b ± 0,23	4,14 ^a ± 0,30	79,48 ^a ± 0,52	11,36 ^d ± 0,10	
	30	81,68 ^{bc} ± 0,31	0,09 ^{cd} ± 0,04	11,39 ^b ± 0,19	3,85 ^{ab} ± 0,20	78,42 ^a ± 0,31	11,39 ^d ± 0,11	
	42	81,75 ^{bc} ± 0,16	0,24 ^{ab} ± 0,03	11,71 ^{ab} ± 0,33	3,47 ^{ab} ± 0,30	78,31 ^b ± 0,31	11,71 ^c ± 0,13	
	54	81,80 ^{bc} ± 0,17	0,28 ^{ab} ± 0,03	11,76 ^{ab} ± 0,32	3,14 ^{ab} ± 0,25	78,33 ^b ± 0,31	11,76 ^c ± 0,02	
59	81,03 ^c ± 0,03	0,31 ^a ± 0,04	12,43 ^a ± 0,15	2,91 ^b ± 0,19	77,62 ^c ± 0,06	12,43 ^a ± 0,03		

¹ Media ± error estándar. El parámetro ΔE^* (diferencia de color) se calculó considerando la horchata cruda como referencia. WI: índice de blancura. C*: croma.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} Para el mismo tipo de licuado, valores en la misma columna con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Según Francis (1983), el ojo humano difícilmente aprecia diferencias entre productos cuyo ΔE^* sea inferior a 3 unidades, por lo que en este caso y considerando que la variación de color de las horchatas entre el día 1 y al final de su vida útil fue < 3 unidades en todos los casos, se estima que, a excepción del producto crudo, el consumidor difícilmente detectaría las diferencias de color existentes entre las horchatas recién procesadas y al final de su vida comercial, hecho que realmente sería relevante para la aceptación de estos productos en el mercado actual.

8.2.2.3. Estabilidad coloidal

Los licuados vegetales son bebidas en las que coexisten un gran número de partículas diferentes. La estabilidad de la emulsión a lo largo de la vida útil del licuado estará sujeta a las interacciones entre estas partículas, determinadas en gran parte por el tratamiento de estabilización y conservación que se le aplique (tratamientos de homogenización, térmicos, adición de aditivos estabilizantes, etc.). La baja relación entre el contenido en grasa y proteína y la baja densidad del producto favorecerán la migración de estas partículas hacia la superficie o base del envase, por lo que es frecuente observar en estos licuados la aparición de dos fenómenos de desestabilización coloidal principales: la sedimentación y el cremado de las partículas en suspensión. Por todo ello, el principal reto de la industria alimentaria será optimizar la estabilidad coloidal de estos productos después de su elaboración y durante su vida comercial, para satisfacer la demanda de un consumidor que espera encontrar en ellos una estabilidad coloidal similar a la que presenta la leche homogenizada.

La Figura 8.3 muestra los resultados obtenidos mediante el equipo TurbiscanTM sobre la evolución de la estabilidad coloidal en las horchatas durante su almacenamiento en frío. En todos los casos, se tomaron como referencia las medidas de estabilidad realizadas a día 1, después de depositar la muestra de producto en el vial de análisis (ver *Capítulo 3, apartado 3.5.9*). En las mediciones realizadas por el equipo, y en comparación con la medida de referencia, la señal de Backscattering (BS) aumenta de manera directamente proporcional a la concentración de partículas en cada zona del vial de análisis. Una disminución de esta señal indicará una clarificación de la zona en cuestión, principalmente debido a la migración de las partículas en suspensión hacia otra parte del vial.

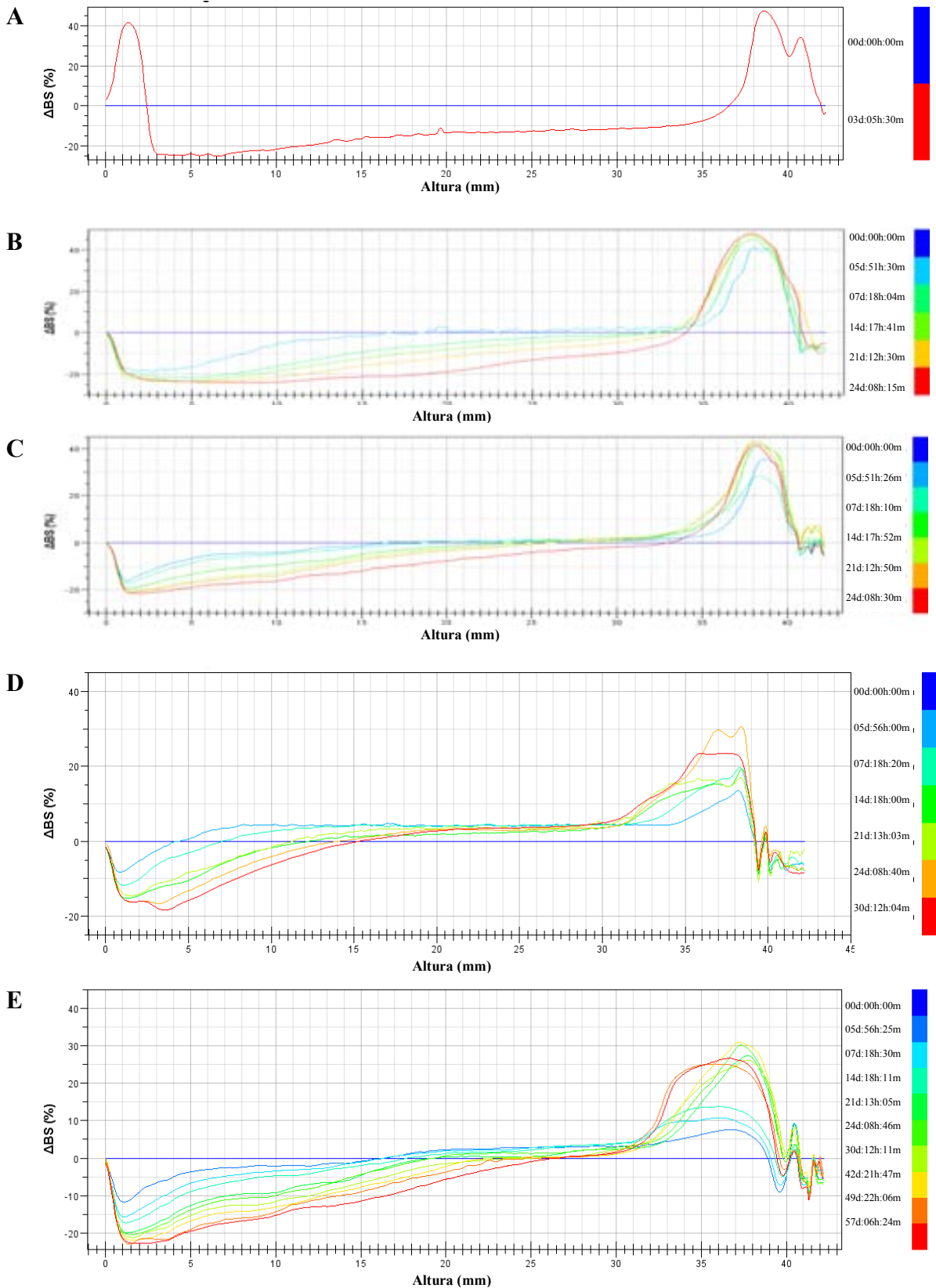


Figura 8.3. Variación del porcentaje de luz difractada (o Backscattering) en las horchatas pasteurizadas y UHPH durante su almacenamiento en frío. (A) Cruda, (B) P1- homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), (C) P2 – homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), (D) 200 - homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C) y (E) 300 - homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

Como se puede observar en estos resultados, la horchata de chufa cruda, en su corta vida útil, fue la que presentó la mayor y más rápida desestabilización coloidal, principalmente debido a la inestabilidad física de las diferentes partículas en suspensión y a la elevada actividad microbiana del producto. Como se puede apreciar en la Figura 8.3, en este licuado aparecieron dos picos considerables en los dos extremos de la gráfica; el primero (del $\sim 40\% \Delta BS$) correspondió a la sedimentación de las partículas más densas al fondo del recipiente, mientras que el segundo (del $40\text{-}50\% \Delta BS$) correspondió a la capa que formaron las partículas menos densas que al migrar hacia la superficie. En la gráfica también se observó cierta clarificación del producto (valores de BS negativos) a lo largo del vial, la cual presentó el valor máximo ($\sim -20\% \Delta BS$) en la zona de la base del recipiente. Esta clarificación se explica por la migración de las partículas en suspensión hacia ambos extremos del vial de análisis (Figura 8.4). Gran parte de estos fenómenos de desestabilización se estima que tuvieron lugar durante las ~ 48 h posteriores a la elaboración y envasado de la horchata. Durante este período de tiempo, se observó la máxima velocidad de migración de las partículas en ambos fenómenos de desestabilización (Figura 9.4).

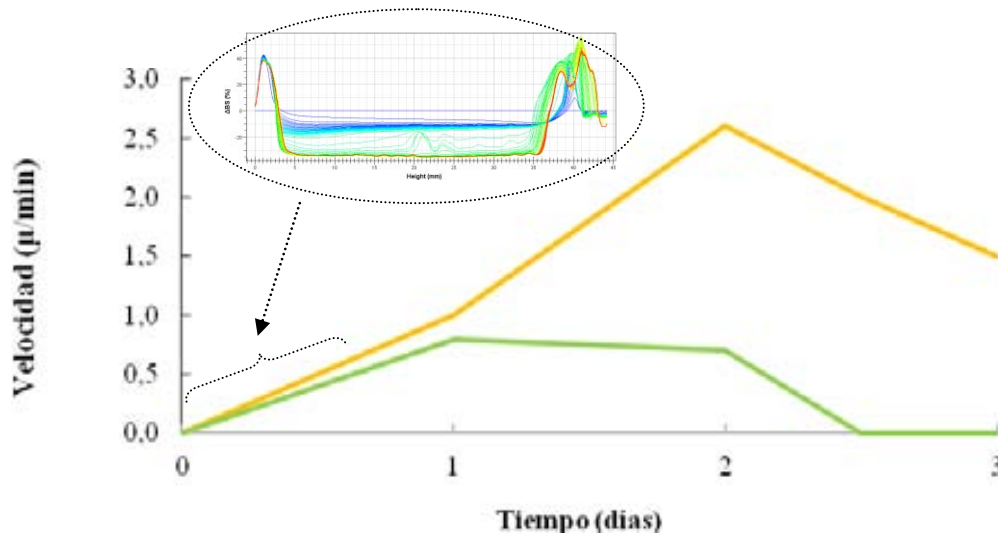


Figura 8.4. Cinética de sedimentación (■) y cremado (■) de las partículas en la horchata de chufa cruda durante su vida útil. En detalle, resultados obtenidos por el equipo TurbiscanTM sobre la evolución de la estabilidad coloidal en la horchata durante las primeras 17 h de su conservación en frío.

Según la ley de Stocks, la velocidad de migración de las partículas en una disolución será directamente proporcional a su tamaño y la diferencia de densidades entre estas partículas y la fase continua. En el producto crudo, la formación de nuevas gotas de mayor tamaño (debido a su floculación y posterior coalescencia) aumentó la velocidad de migración de estas gotas hacia la superficie del envase. La diferencia de densidades entre las partículas y/o agregados de partículas en suspensión con la fase continua del licuado también propició su rápida movilidad en el producto. Como se puede observar en la Figura 8.4, a los dos días de almacenamiento del licuado, la velocidad de sedimentación de las partículas disminuyó bruscamente, lo que apuntó que la mayor parte de las partículas en suspensión (y las de diámetro más grande) ya habían sedimentado. A las ~ 60 h, el fenómeno de sedimentación finalizó. La aparición de la capa de sedimento se relacionó con los carbohidratos almidón y fibra insoluble. Por el contrario, pasado este tiempo, el grosor de la capa de cremado continuó aumentando, aunque a partir de las 48 h se observó una disminución en la velocidad de migración de estas gotas y/o agregados. A día 3, los grosores de las capas de cremado y sedimentación fueron de $3,6 \pm 0,1$ y $1,6 \pm 0,3$ mm, respectivamente. El filtrado previo de la horchata redujo considerablemente la cantidad de sólidos insolubles del producto, principalmente procedentes de la molturación de las chufas, lo que en consecuencia minimizó el grosor de esta capa de sedimentación. En la Figura 8.5 se puede apreciar una imagen del vial de horchata cruda al final de su vida útil microbiológica. En la parte superior e inferior del vial destaca la capa de cremado y sedimentación de las partículas del producto, ambas representadas por un color naranja intenso. Como se observa, ambas capas aparecieron antes de las 10 h de almacenamiento del licuado. Sobre la capa de sedimentación, se observa cierta clarificación en el producto (representada por la aparición de una coloración blanca muy difusa), la cual se debe a la migración de las partículas hacia la superficie o base del recipiente (Figura 8.5).

A partir del tercer día de almacenamiento de la horchata, y debido en gran parte a la alta actividad microbiana, se parecieron otros fenómenos de desestabilización físico-química en el licuado. Se observó una clarificación muy destacada en la parte inferior del envase junto con un cambio de color del producto (más oscuro) y un aumento muy notable de su viscosidad.

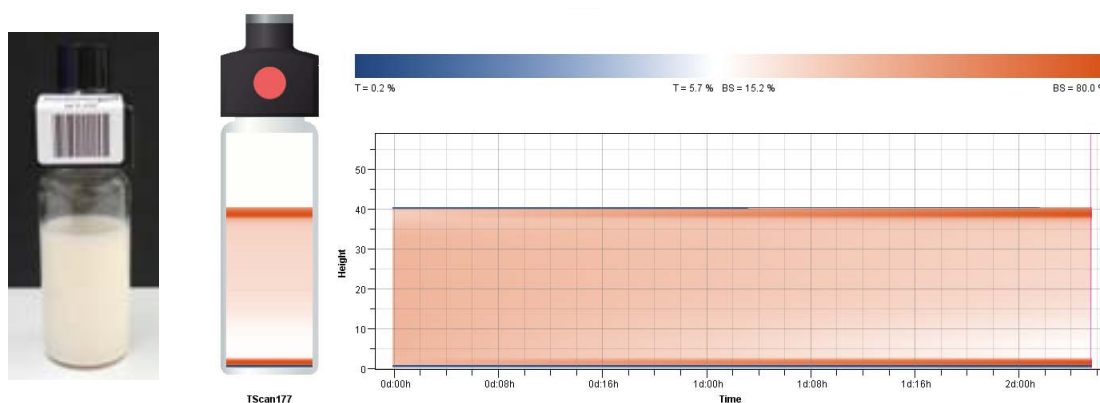


Figura 8.5. Evolución de las medidas de BS (Backscattering) y T (Transmisión) en el tiempo de almacenamiento de la horchata cruda.

Con los tratamientos de homogenización-pasteurización y UHPH, la estabilidad coloidal del licuado crudo mejoró. Como se observa en la Figura 8.3, el principal fenómeno de desestabilización que se detectó en estos licuados correspondió al cremado de las gotas de grasa. Al final de la vida útil microbiológica de las horchatas, el incremento BS correspondientes a la capa de cremado fue del ~ 45 y ~ 40 % para las horchatas P1 y P2, respectivamente, y del $\sim 30\%$ para las homogenizadas a ultra alta presión. En todas las curvas de medida, en su parte izquierda, se observaron valores negativos de BS, lo que correspondería a una clarificación del producto debido a la migración de las gotas de grasa hacia la superficie del envase.

En estas horchatas homogenizadas, y en comparación con el producto crudo, la velocidad de migración de las gotas de grasa disminuyó, ya que según la ley de Stocks, esta velocidad es directamente proporcional al diámetro de las partículas en suspensión. La Figura 8.6 muestra la evolución de la cinética de cremado de las gotas de grasa en las horchatas P1, P2, 200 y 300 MPa en el tiempo. Como se observa, los tratamientos aplicados determinaron la evolución de este fenómeno de desestabilización (Figura 8.7). Después de su envasado, en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas las gotas de grasa empezaron a migrar lentamente hacia la superficie del producto. La velocidad de migración aumentó a partir del tercer día de almacenamiento de los licuados, siendo, en todo momento la velocidad de cremado de las gotas de grasa en el licuado P2 inferior a la que presentó su homólogo P1. Las diferencias observadas entre estos dos licuados evidenciaron el papel del emulgente, el cual favoreció la estabilidad de la emulsión, principalmente debido a la creación de relaciones intermoleculares complejas y estables

entre las gotas de grasa y la fase continua del licuado. De hecho, como ya se ha comentado previamente, la forma de las gotas de grasa que se observó en las micrografías correspondientes a estos licuados apuntaron que el emulgente que se utilizó en la horchata P2 se adsorbió en preferencia a la proteína dispersa en el medio en la interfase aceite-agua, por lo que las interacciones entre el emulgente y la fase continua probablemente fueron más fuertes que las causadas por la proteína situada en la interfase en la horchata P1. A parte, si observamos los valores de la evolución del tamaño de partícula entre ambas horchatas (Tabla 8.4), se aprecia que este parámetro permanece estable en el licuado P2, mientras que en el P1 existe una tendencia al incremento del tamaño de las partículas a razón del tiempo de almacenamiento del licuado, probablemente debido a la coalescencia entre gotas y no a su floculación (ver evolución de los parámetros $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$). Algunos autores han observado que en emulsiones estabilizadas por proteínas vegetales, los agregados de proteína que se forman alrededor de las gotas de grasa propician la floculación de las gotas en suspensión (Tornberg *et al.*, 1997), lo que justificaría los resultados observados en este estudio. Por ello, en productos de baja viscosidad como sería la horchata de chufa (en los que las gotas de grasa disponen de una gran movilidad en la dispersión), la utilización de estos agentes como surfactantes no evitaría la floculación de las gotas de grasa como lo harían otros emulgentes, como es el caso del E-472c. Siendo así, al final de su vida útil de las horchatas P1 y P2, el grosor de la capa de cremado en la horchata P1 fue de $\sim 4 \pm 0,2$ mm y el grosor de la horchata P2 de casi la mitad de este valor ($\sim 2,5 \pm 0,3$ mm).

En las horchatas homogenizadas a 200 y 300 MPa, y en comparación con los licuados crudo, P1 y P2, la velocidad de migración de las gotas de grasa durante los primeros días de almacenamiento de los licuados fue menor. Probablemente, estas diferencias se relacionaron con la reducción del tamaño de las gotas de grasa (según lo descrito en la ley de Stocks) y a su mejor estabilidad en la dispersión. El grosor de la capa de cremado también aumentó paulatinamente a razón del tiempo de almacenamiento de los productos UHPH. Al final de su vida útil microbiológica, el grosor de la capa de cremado de las horchatas homogenizadas a 200 MPa y 300 MPa fue de $\sim 2,1 \pm 0,3$ y $\sim 2,7 \pm 0,3$ mm, respectivamente, esta última de valores similares a los descritos en la horchata homogenizada-pasteurizada P2. La insuficiente cantidad de proteína para recubrir la superficie de todas las gotas de grasa que se formaron con el proceso de homogenización a 300 MPa, la posible mayor desnaturalización de las proteínas (debido

al efecto del tratamiento de UHPH a 300MPa) o el mayor tiempo de vida útil del producto podrían argumentar las diferencias observadas entre ambas horchatas UHPH.

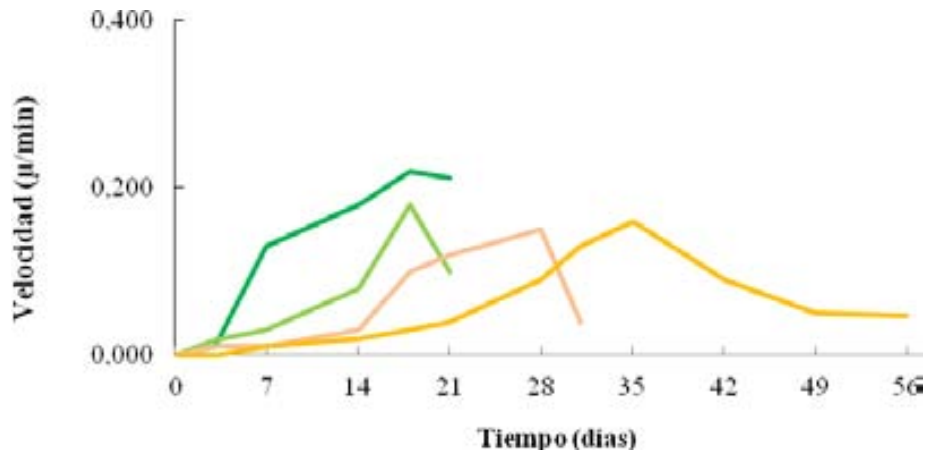


Figura 8.6. Cinética de cremado de las partículas en las horchatas P1 (■), P2 (■), 200 MPa (■) y 300 MPa (■) durante el tiempo de almacenamiento de los productos en frío (4 °C). P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa, 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

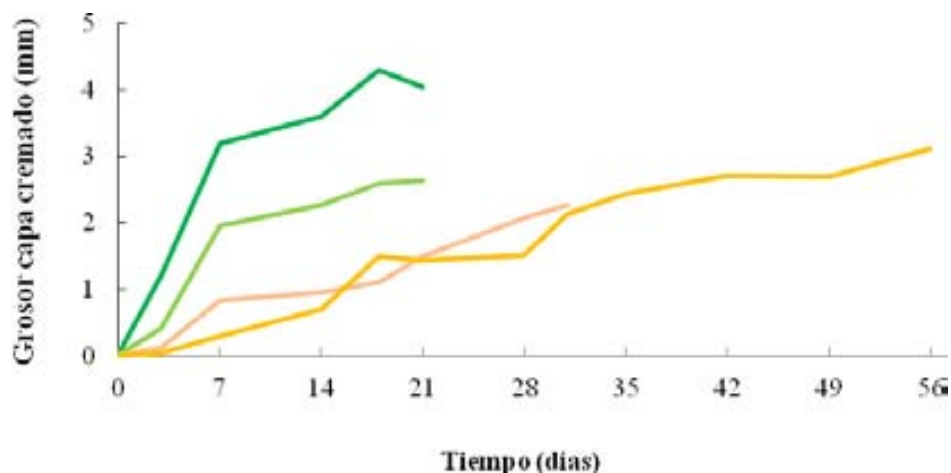


Figura 8.7. Grosor de la capa de cremado en las horchatas P1 (■), P2 (■), 200 MPa (■) y 300 MPa (■) durante el tiempo de almacenamiento de los productos en frío (4 °C). P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa, 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii, E-331iii, E-472c, E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

Estos resultados se pueden observar más gráficamente en las imágenes de la Figura 8.8. Con el tiempo de almacenamiento de los licuados, se aprecia la aparición de una capa de mayor intensidad de color (más naranja) en la parte superior de los viales, así como una ligera clarificación del producto en la parte inferior (aparición de un color más blanco). En la parte central de los viales de las horchatas UHPH, y en correspondencia a lo observado en las gráficas que muestra la Figura 8.3 (imágenes D y E), se observó cierto incremento de la señal de BS con el tiempo de almacenamiento, lo que correspondería a un incremento del tamaño de las partículas en el producto. Por el contrario, este fenómeno no se observó en las horchatas P1 y P2. Estos resultados se corresponden con los observados en la determinación de la distribución del tamaño de partícula en las horchatas durante su almacenamiento en frío (Tabla 8.4, ver evolución del parámetro $d_{4,3}$).

Tabla 8.4. Parámetros correspondientes a la distribución del tamaño de partícula de las horchatas durante su vida útil.

Tratamiento	Día	Parámetros evaluados (μm) ²			
		D50	D90	$d_{3,2}$	$d_{4,3}$
P1	1	0,63 ^{ab} ± 0,03	2,77 ^f ± 0,23	0,55 ^{ab} ± 0,01	4,01 ^d ± 0,47
	21	0,66 ^a ± 0,02	4,58 ^{ef} ± 0,39	0,57 ^a ± 0,03	3,85 ^d ± 0,15
P2	1	0,53 ^{ab} ± 0,01	29,10 ^{bc} ± 1,41	0,48 ^b ± 0,01	7,54 ^c ± 0,41
	21	0,52 ^{ab} ± 0,03	24,90 ^c ± 0,06	0,43 ^b ± 0,03	6,77 ^c ± 0,08
200	1	0,36 ^c ± 0,01	11,98 ^d ± 1,94	0,35 ^c ± 0,01	3,87 ^d ± 0,29
	21	0,36 ^c ± 0,01	12,95 ^d ± 0,71	0,31 ^c ± 0,02	7,90 ^c ± 0,16
	30	0,36 ^c ± 0,01	53,23 ^a ± 0,28	0,32 ^c ± 0,03	10,54 ^a ± 1,18
300	1	0,37 ^c ± 0,02	31,43 ^b ± 1,20	0,36 ^c ± 0,01	8,34 ^b ± 0,21
	21	0,36 ^c ± 0,02	22,68 ^c ± 2,40	0,34 ^c ± 0,03	9,16 ^b ± 0,26
	30	0,41 ^{ab} ± 0,02	47,61 ^a ± 1,11	0,35 ^c ± 0,01	12,59 ^a ± 0,25
	54	0,52 ^{ab} ± 0,03	46,16 ^a ± 2,57	0,36 ^c ± 0,01	12,76 ^a ± 0,90

¹ Media ± error estándar.

² D50 = diámetro bajo el cual se encuentra el 50% del volumen de las partículas; D90 = diámetro bajo el cual se encuentran el 90% de las partículas; $d_{3,2}$ = diámetro medio en relación al área de la superficie de las partículas; $d_{4,3}$ = diámetro medio en relación al volumen de las partículas.

³ P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

^{a-c} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

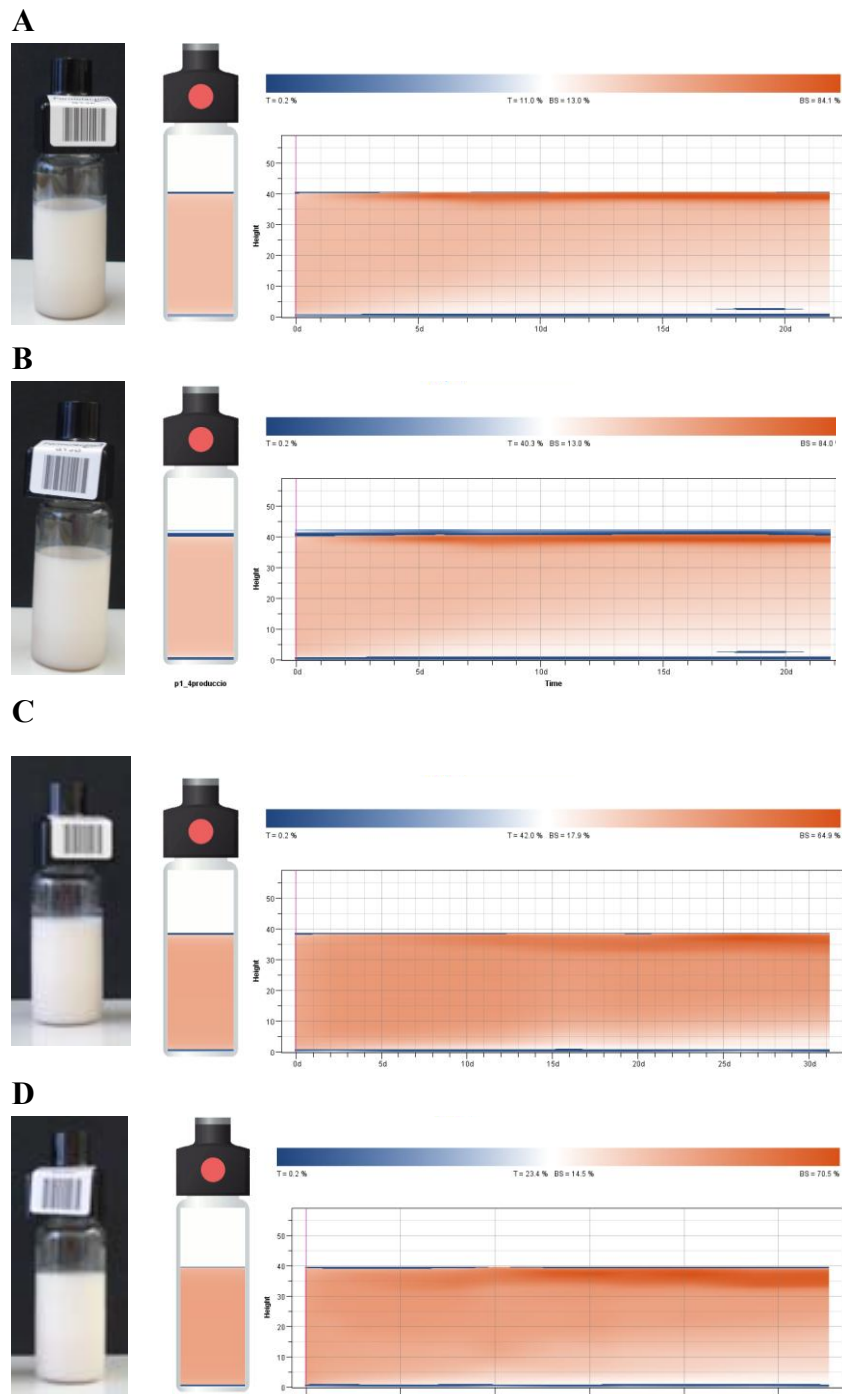


Figura 8.8. Evolución de la medida de BS en el tiempo de conservación de las horchatas. P1 (A): homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), P2 (B): homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), 200 MPa (C): homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C) y 300 MPa (D): homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

En general, el valor de viscosidad de todos los licuados se mantuvo constante en el tiempo (Tabla 8.5). Se observó un ligero incremento de la viscosidad del licuado homogenizado a 200 MPa al final de su vida útil microbiológica, probablemente debido a la misma formación de agregados de partículas en el licuado.

Tabla 8.5. Evolución de la viscosidad (mPa/s) de las horchatas durante su vida útil.

Día	Tratamiento ^{1,2}				
	Cruda	P1	P2	200	300
1	1,69 ^{b,x} ± 0,68	1,54 ^{b,x} ± 0,77	2,33 ^{a,x} ± 0,59	1,72 ^{b,y} ± 0,65	2,34 ^{a,x} ± 0,07
3	1,70 ^x ± 0,69	-	-	-	-
7		1,59 ^{b,x} ± 0,53	2,13 ^{a,x} ± 0,87	1,73 ^{b,y} ± 0,56	2,23 ^{a,x} ± 0,74
14		1,51 ^{c,x} ± 0,50	2,40 ^{a,x} ± 0,85	1,79 ^{bc,xy} ± 0,73	2,07 ^{b,x} ± 0,85
21		1,53 ^{c,x} ± 0,62	2,39 ^{a,x} ± 0,80	1,71 ^{bc,y} ± 0,76	2,23 ^{a,x} ± 0,89
30		-	-	1,87 ^{a,x} ± 0,77	2,10 ^{a,x} ± 0,86
42		-	-	-	2,03 ^x ± 0,83
54		-	-	-	2,02 ^x ± 0,77
59		-	-	-	2,53 ^x ± 0,78

¹ Media ± error estándar.

² P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} En la misma fila, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas (P < 0,05).

^{x-z} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas (P < 0,05).

El hecho de que en la horchata homogenizada a 300 MPa no se observara este incremento del valor de viscosidad, considerando que el número de agregados de partículas en este licuado también incrementó con el tiempo de conservación del producto, podría explicarse por la diferencia entre el número de agregados formados en ambos licuados. De hecho, la diferencia entre el valor inicial y final del parámetro $d_{4,3}$ en el licuado homogenizado a 200 MPa fue superior a la que presentó el licuado homogenizado a 300 MPa, lo que podría haber repercutido en una mayor diferencia entre el valor de la viscosidad inicial y final de esta horchata.

Finalmente, apuntar que, como se aprecia en los resultados obtenidos mediante el equipo TurbiscanTM (Figura 8.3), el fenómeno de sedimentación tan sólo se detectó en

la horchata cruda, aunque visualmente también se observara que en las bebidas homogenizadas había cierta sedimentación de partículas en el fondo de los envases (Figura 8.8). Este sedimento probablemente correspondió a los restos de fibras insolubles que quedaron en los licuados después de su filtrado, procedentes de la misma chufa ya que en los productos homogenizados el almidón se hidrolizó previamente a la aplicación de los tratamientos. Se estima que esta capa no se detectó con el equipo Turbiscan™ debido a que el fenómeno de clarificación del producto (Δ BS negativo) predominó sobre el de precipitación de las partículas (Δ BS positivo), siendo por lo tanto el balance total de BS en esta parte de la gráfica totalmente negativo.

En comparación con el producto crudo, los tratamientos de homogenización-pasteurización y UHPH mejoraron la estabilidad coloidal de las horchatas en el tiempo. La Figura 8.9 muestra el índice de estabilidad TSI de los licuados durante su vida útil, parámetro que permite comparar la estabilidad de diferentes emulsiones en base a la diferencia de luz transmitida a lo largo del vial en las medidas realizadas durante su almacenamiento.

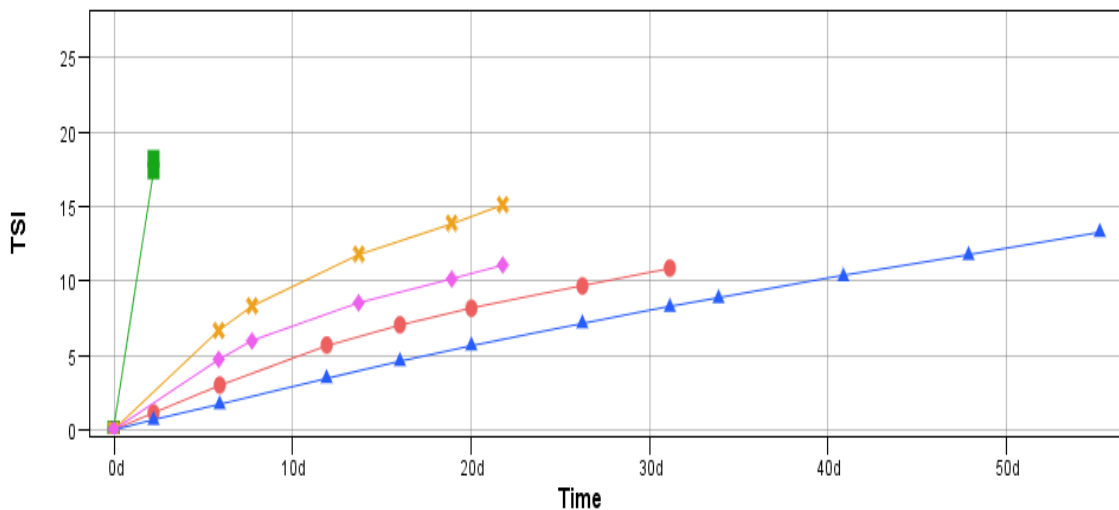


Figura 8.9. Índice de estabilidad (TSI) de las horchatas. Cruda (■), P1 (■): homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s), P2 (■): homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473), 200 MPa (■): homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, $T_i = 40$ °C) y 300 MPa (■): homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, $T_i = 40$ °C).

Como se puede observar en la Figura 8.9, en todas las horchatas el parámetro de TSI aumentó a razón del tiempo de almacenamiento de los licuados, lo que indicó que la estabilidad de las horchatas disminuyó a razón de su vida útil. En esta imagen se observa que la horchata cruda fue la menos estable en todo momento, seguida por las horchatas homogenizadas-pasteurizadas y las homogenizadas a ultra alta presión. Comparando las horchatas P1 y P2 entre sí, destacó el efecto de los aditivos estabilizantes en el licuado P2, ya que esta horchata presentó un menor valor del índice TSI, indicando una mejor estabilidad coloidal global. Las horchatas UHPH fueron las que presentaron los valores del parámetro TSI más bajos. Como se observa en la Figura 8.9, en todo momento, la estabilidad del licuado homogenizado a 300 MPa fue superior a la que presentó el licuado homogenizado a 200 MPa. Estos resultados apuntarían que, aunque la horchata homogenizada a 200 MPa presentara una menor capa de cremado al final de su vida útil, y sobre todo en comparación con su homóloga homogenizada a 300 MPa, este hecho no fue debido a una mejor estabilidad coloidal del producto, sino probablemente, a la vida útil más reducida de este licuado en comparación con el homogenizado a mayor presión.

8.2.3. Evaluación sensorial de los licuados durante su almacenamiento en frío

El análisis sensorial de los productos durante su almacenamiento constituye una de las determinaciones más importantes en el estudio de vida útil de los alimentos, ya que durante este tiempo pueden transcurrir posibles cambios en sus propiedades organolépticas que afecten su aceptabilidad por parte del consumidor. Por ello, en este estudio, se realizó una evaluación sensorial de las horchatas, complementando la evolución de las características de los licuados durante su vida útil. En esta evaluación se realizaron nuevamente los mismos ensayos sensoriales que se realizaron a día 3 (*ver Capítulo 3, apartado xxx*), a día 14 (control, P1, P2, 200 y 300), 20 (control, P1, P2, 200 y 300), 27 (control, 200 y 300) y 56 (control y 300 MPa) de su conservación en frío. Nuevamente, se elaboró horchata de chufa cruda el día antes de la evaluación sensorial de los productos, la cual se consideró como *producto control*.

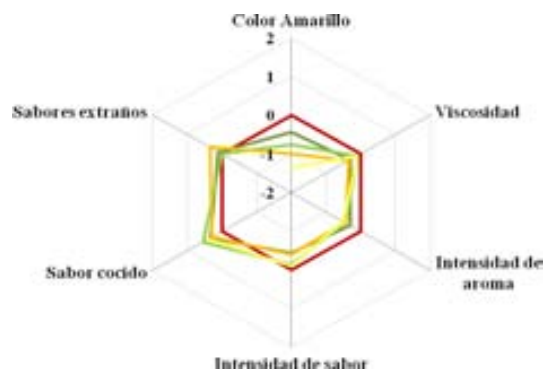
La Figura 8.11 muestra los resultados obtenidos en la prueba descriptiva del perfil de las diferentes horchatas, evaluado durante la vida útil de los licuados. Como se puede observar, en los diferentes días de realización de la cata, y a excepción del parámetro

color, las diferencias observadas por los panelistas entre las horchatas tratadas y la horchata cruda tuvieron una puntuación media inferior a 1, lo que se tradujo a una desviación mínima del atributo respecto al control.

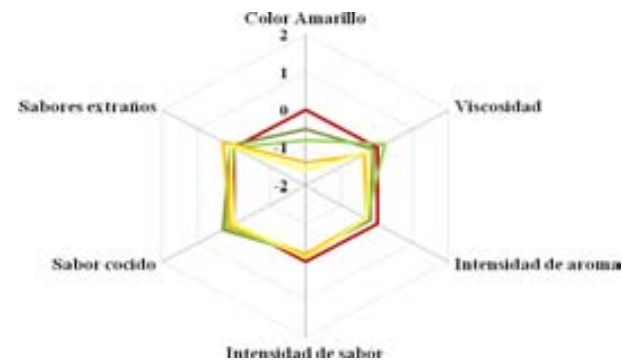
Coincidiendo con los resultados obtenidos en la evaluación sensorial de los licuados a día 3, durante su vida útil la relación de color entre las horchatas pasteurizadas y homogenizadas a ultra alta presión se mantuvo estable, siendo las horchatas homogenizadas *más blancas* en todo momento que el licuado control. Las diferencias de color entre las horchatas P1, P2, 200 y 300 no fueron significativas ($P > 0,05$) (Tabla 8.3).

Las diferencias observadas por los catadores en los atributos relacionados con el cuerpo (viscosidad, presencia de partículas y sensación acuosa) y aroma de los licuados no dependieron ($P > 0,05$) del tratamiento aplicado. Por el contrario, los catadores sí encontraron ciertas diferencias en la intensidad de sabor de las horchatas. En todos los días de realización de la cata, la horchata control siempre fue la que presentó un sabor más intenso, no observándose diferencias entre los licuados tratados. Aún así, los catadores no consideraron que estas diferencias fueran debidas a la presencia de sabores extraños, dulces ni metálicos. En un primer momento, se contempló la posibilidad de que con el transcurso de la vida útil del producto, y debido a las reacciones de deterioro existentes en el producto (principalmente de oxidación lipídica), aparecieran sabores extraños (grasientos, oxidados, etc.) que pudieran ser percibidos por el panel catador.

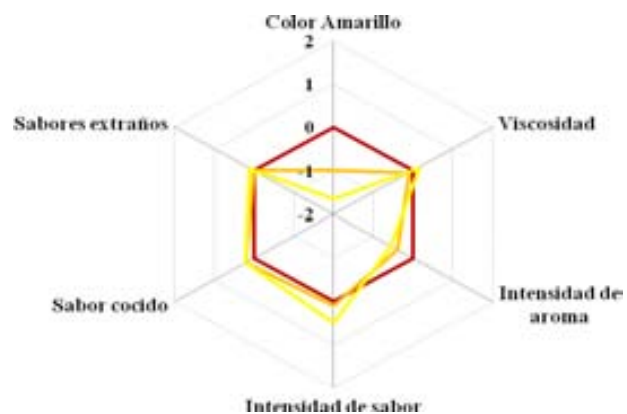
A



B



C



D

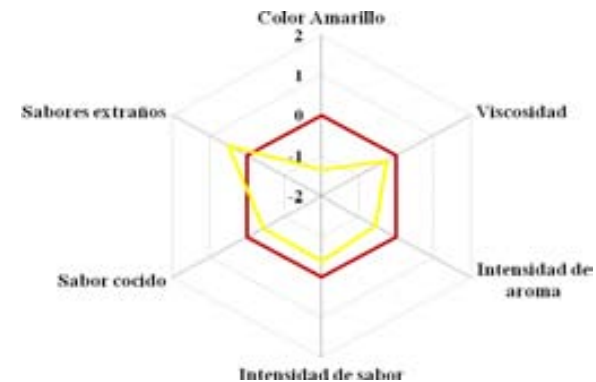


Figura 8.11. Atributos sensoriales evaluados en las horchatas. (■) Cruda, (■) P1 (homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s)), (■) P2 (homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa, 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473)), (■) 200 (homogenizada a 200 MPa, $T_i = 40$ °C) y (■) 300 (homogenizada a 300 MPa, $T_i = 40$ °C) a día (A)14, (B) 20, (C) 27 y (D) 56 de su almacenamiento en frío (4°C).

Probablemente, la baja temperatura de realización de la cata enmascaró las diferencias existentes en el cuerpo, sabor y aroma de las horchatas, las cuales sí fueron detectadas instrumentalmente.

Por todo ello, se considera que, durante la vida útil de las horchatas de chufa homogenizadas-pasteurizadas y UHPH, y bajo unas condiciones de consumo determinadas (temperatura del producto ≤ 10 °C), el principal parámetro que diferenció a las horchatas según el tratamiento que se les aplicó fue su color, seguido por la intensidad de sabor del producto.

Los resultados obtenidos en el test hedónico de ordenación de las horchatas que se evaluaron se exponen en la Tabla xx. Como se puede observar, en los ensayos realizados en los días 14 y 20 de la vida útil de las horchatas, los catadores mostraron una clara preferencia por el producto crudo, el cual obtuvo la máxima puntuación en un 43 y 42% de los casos. Las horchatas pasteurizadas P1 y P2 le siguieron en importancia, situadas con mayor frecuencia entre la primera y segunda posición. Destacar que la puntuación media obtenida en el producto control no fue significativamente ($P < 0,05$) diferente a la obtenida en la horchata P2 en la cata realizada a los 14 días de almacenamiento del producto. Por el contrario, en ambos días las horchatas UHPH fueron colocadas con más frecuencia (~ 40% de los casos) en la última posición.

A los 28 días de su conservación en frío, nuevamente la horchata cruda se situó en primer lugar, con una frecuencia relativa del 46%. La puntuación que con más frecuencia recibió la horchata homogenizada a 200 MPa también fue la máxima en el 43% de los casos, mientras que la horchata homogenizada a 300 MPa fue ordenada en el 53% de las ocasiones en el último eslabón. Nuevamente, a los 56 días de almacenamiento de los licuados en frío, los panelistas volvieron a decantarse por el producto crudo (en un 73 % de los casos lo clasificaron como preferente), en comparación con el homogenizado a 300 MPa.

Entre otros, al argumento que más consideraron los catadores para decantar su preferencia por el producto crudo fue su color. El consumidor relacionó el color amarillento del producto al atributo *natural*, por lo que directamente posicionaron el producto crudo en primera posición, situando los licuados más blancos en los últimos eslabones.

Tabla 8.6. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba de ordenación de las horchatas almacenadas durante 14, 20, 27 y 56 días¹.

Licuados ³	Día 14			Día 20		
	Media ²	Moda	Frecuencia relativa	Media ²	Moda	Frecuencia relativa
Cruda	3,80 ^a ± 1,45	5	0,43	4,14 ^a ± 0,35	5	0,42
P1	2,97 ^b ± 1,25	4	0,36	2,17 ^b ± 1,15	4	0,37
P2	3,80 ^a ± 1,24	5	0,40	2,92 ^b ± 0,17	4	0,38
200 MPa	2,90 ^b ± 1,06	3	0,40	2,33 ^b ± 1,15	3	0,44
300 MPa	2,73 ^b ± 0,94	3	0,43	2,93 ^b ± 0,05	3	0,41

Tabla 8.6. (Continuación)

Licuados ³	Día 27			Día 56		
	Media ²	Moda	Frecuencia relativa	Media ²	Moda	Frecuencia relativa
Cruda	4,30 ^a ± 0,75	5	0,46	4,97 ^a ± 0,55	5	0,73
P1	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-
200 MPa	4,13 ^a ± 0,86	5	0,43	-	-	-
300 MPa	4,23 ^a ± 0,72	4	0,53	4,30 ^b ± 0,47	4	0,73

¹ Las muestras están ordenadas por orden de preferencia descendiente según 5, 4, 3, 2, 1.

² Media ± error estándar.

³ Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Según los resultados obtenidos en el último test que se realizó en esta evaluación sensorial, esta clasificación tan solo tuvo validez cuando los productos se presentaban conjuntamente. Como muestra la Tabla 8.7, cuando la evaluación de las diferentes horchatas se realizó de manera individual, las puntuaciones medias obtenidas en las diferentes horchatas no presentaron diferencias entre ellas ($P > 0,05$), cualesquiera que fuera el día en que se realizara esta evaluación (Tabla 8.7).

Tabla 8.7. Parámetros sensoriales obtenidos en la prueba hedónica de las horchatas almacenadas durante 14, 20, 27 y 56 días¹.

Licuados ³	Día 14			Día 20		
	Media ²	Moda	Frecuencia relativa	Media ²	Moda	Frecuencia relativa
Cruda	7,33 ^a ± 0,24	8	0,53	7,20 ^a ± 0,13	8	0,53
P1	5,98 ^a ± 0,57	7	0,40	6,01 ^a ± 0,17	7	0,51
P2	6,33 ^a ± 0,58	7	0,53	6,53 ^a ± 0,43	7	0,52
200 MPa	6,67 ^a ± 0,40	7	0,60	6,78 ^a ± 0,21	7	0,55
300 MPa	7,22 ^a ± 0,15	7	0,76	7,31 ^a ± 0,30	7	0,66

Tabla 8.7. (Continuación)

Licuados ³	Día 27			Día 56		
	Media ²	Moda	Frecuencia relativa	Media ²	Moda	Frecuencia relativa
Cruda	6,56 ^a ± 0,50	7	0,43	6,92 ^a ± 0,38	7	0,33
P1	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	-	-
200 MPa	6,97 ^a ± 0,47	7	0,43	-	-	-
300 MPa	7,02 ^a ± 0,17	7	0,76	6,83 ^a ± 0,32	7	0,60

¹ La puntuación de las muestras corresponde a los valores del 1 al 9, de menor a mayor aceptación del producto.

² Media ± error estándar.

³ Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (18+4 MPa y 80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200 MPa: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300 MPa: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} En la misma columna, valores con diferente superíndice indica diferencias significativas ($P < 0,05$).

Estos resultados indicaron que de ser consumidas en momentos diferentes y de manera independiente, el consumidor juzgaría de manera similar los diferentes licuados. A parte, el tiempo de conservación (en refrigeración) de todas las horchatas no afectaría a la valoración final realizada por el consumidor, siendo todos los licuados aceptados por igual.

8.3. Conclusiones

Desde un punto de vista microbiológico, la vida útil de las horchatas homogenizadas a 200 y 300 MPa fue de ~ 30 y ~ 60 días, respectivamente, en comparación con los ~ 25 días de las horchatas homogenizadas-pasteurizadas y los ~ 3 días del producto crudo. Durante este período de tiempo, la cantidad de aldehídos totales en las horchatas UHPH (como indicadores de las reacciones de oxidación secundaria de la grasa) fue superior a

la determinada en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas, según la relación $300 > P2 > 200 > P1$, aunque la existencia de otros compuestos procedentes de la degradación de los aldehídos podrían explicar la evolución de los resultados obtenidos. Con el tiempo de almacenamiento en frío, el pH de todos los licuados disminuyó, así como también se observó un oscurecimiento en su color. Todos los tratamientos que se aplicaron mejoraron notablemente las propiedades coloidales de la horchata de chufa cruda. El principal fenómeno de desestabilización coloidal que se observó en los licuados fue el cremado de las gotas de grasa, aunque en todas ellas también se apreció cierta sedimentación de las partículas más densas en suspensión, sobre todo en el producto crudo. Las horchatas homogenizadas a ultra alta presión fueron las más estables (según la relación $300 > 200$), aunque con el transcurso del tiempo, el grosor de la capa de cremado del licuado homogenizado a 300 MPa fue ligeramente superior, y similar al observado en el licuado P2. La adición de aditivos estabilizantes en la horchata homogenizada-pasteurizada también mejoró la estabilidad coloidal del licuado con el tiempo, el cual presentó menor migración de gotas y/o agregados de grasa en su superficie. Sensorialmente, los tratamientos de UHPH y homogenización-pasteurización no provocaron cambios importantes en los atributos de la horchata de chufa cruda, a excepción de su color, que fue en todas ellas más blanco que el control. A lo largo del tiempo de almacenamiento de los productos en frío, todas las horchatas recibieron una buena aceptación por parte del consumidor.

Por todo ello, en este estudio, se podría concluir que el tratamiento de homogenización a ultra alta presión se presentó como un tratamiento alternativo a la homogenización-pasteurización convencional, para la higienización y estabilización de la horchata de chufa cruda en el tiempo. Con la aplicación de esta tecnología se consiguió un licuado de estabilidad física mejorada, sin la adición de aditivos estabilizantes.

Capítulo 9

Efecto de los tratamientos de homogenización-pasteurización convencional y homogenización a ultra alta presión sobre el perfil volátil de la horchata de chufa

Efecto de los tratamientos de homogenización-pasteurización convencional y homogenización a ultra alta presión sobre el perfil volátil de la horchata de chufa

9.1. Introducción

El aroma se define como aquella sensación percibida por vía nasal indirecta cuando se realiza la degustación de un alimento, el cual constituye uno de los atributos más importantes en la valoración organoléptica del producto por parte del consumidor. Este atributo se caracteriza por la mezcla de diferentes compuestos volátiles, los cuales provienen de las materias primas que se utilizan y son resultado de las reacciones existentes entre sus componentes (hidrolíticas, de oxidación, enzimáticas, biosintéticas, etc.) (Badui, 2006). En los productos vegetales, las principales reacciones que determinarán su perfil volátil son las reacciones biosintéticas (transcurridas durante el desarrollo de los tejidos), las enzimáticas (debidas a la acción de enzimas sobre moléculas), las pirolíticas (por acción de los tratamientos térmicos) y/o las microbianas (existentes durante la elaboración y/o degradación del alimento). El número de compuestos que favorecerán estas reacciones es muy amplio, lo que repercute en la existencia de una gran variedad de familias de compuestos volátiles diferentes en el producto final (ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, furanos, terpenos, lactonas, pirazinas, etc). Dependiendo de la percepción recibida por el consumidor, estos compuestos se clasificarán en los que contribuyen al *buen perfil sensorial* del producto y en los que constituyen el denominado *off-flavour* o aroma no deseado. Entre los integrantes del segundo grupo de compuestos, destacan las sustancias volátiles procedentes de las reacciones de deterioro de los alimentos, reacciones que principalmente se deben a la actividad microbiana y físico-química y a los procesos de conservación que se aplican (Badui, 2006). Aunque su evaluación organoléptica proporcione una información estimada sobre la perfil sensorial del alimento, cabe tener en cuenta que será necesaria la determinación instrumental de estos compuestos para su correcta identificación y cuantificación (Plutowska *et al.*, 2007).

Hasta el momento, en la bibliografía, las referencias sobre el perfil volátil de la chufa y sus licuados son muy escasas. En estudios anteriores, Cantalejo (1997) determinó los compuestos volátiles que constituyen el perfil aromático de las chufas (crudas y tostadas), destacando la presencia de más de 140 componentes volátiles diferentes. El perfil del tubérculo recolectado estuvo representado por la familia de los alcoholes, mientras que en el caso de la chufa tostada la mayoría de compuestos procedían de las familias de las pirazinas, furanos y pirroles, resultantes del mismo proceso térmico. Lasekan (2012) también estudió los componentes volátiles del aceite de chufa tostada, identificando un total de 75 componentes entre los que destacaron los aldehídos, los alcoholes, los ésteres, las cetonas y los hidrocarburos. Todo ello apuntó la importancia del tratamiento o procesado de las materias primas sobre el perfil volátil del producto final. En la chufa y su licuado, por su composición (rico en ácidos grasos poliinsaturados y monosacáridos), se estima que con la aplicación de tratamientos térmicos se produzcan reacciones de pardeamiento no enzimático y de degradación de la grasa, entre otras, reacciones que se llevan a cabo de manera muy compleja y traen asociada la producción de múltiples compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, ácidos, furanos, alcoholes, pirazinas y ésteres, entre otros). En comparación con estos procesos térmicos, diferentes autores han estudiado el efecto de la aplicación de tecnologías emergentes como la UHPH sobre el perfil volátil del producto, observando resultados favorables en el perfil organoléptico del producto final (Pereda, 2008; Poliseli-Scopel *et al.*, 2013b; Suárez-Jacobo, 2011).

Por todo ello, el **principal objetivo** de este estudio fue la caracterización del perfil aromático de las horchatas de chufa elaboradas y procesadas en este estudio. Para ello, primeramente, (1) se desarrolló y optimizó el método de extracción e identificación de los compuestos volátiles de la matriz alimentaria (ver *Capítulo 3, apartado 3.5.14*) y posteriormente, (2) se realizó el análisis comparativo de los compuestos volátiles de las horchatas (cruda, homogenizadas-pasteurizadas y UHPH) al inicio de su vida útil y durante su conservación en refrigeración (4°C) (ver *Capítulo 3, apartado 3.5.14*).

9.2. Resultados y Discusión

9.2.1. Puesta a punto del sistema de extracción e identificación

Una de las técnicas más utilizadas para el análisis de sustancias volátiles térmicamente estables en la industria alimentaria es la cromatografía de gases (CG). Generalmente, esta técnica requiere la preparación previa de la muestra para la correcta separación de los solutos volátiles de la matriz (Nielsen, 2008). Una de las técnicas de extracción de compuestos volátiles más populares es la microextracción en fase sólida, en inglés conocida bajo las siglas *SPME*. Esta técnica se basa en la extracción, concentración y posterior adsorción de los componentes volátiles presentes en un sistema en una superficie o fibra adsorbente, recubierta de un polímero selectivo (o *coating*). El proceso de adsorción se basa en el equilibrio de los analitos entre la muestra, la fase sólida (o fibra) y el espacio de cabeza existente sobre la matriz alimentaria. La estandarización y optimización del procedimiento de extracción de estos compuestos será clave para obtener unos resultados lo más reproducibles posible. Entre otros, algunos de los factores que afectarán a la reproducibilidad del sistema de la extracción *SPME* son el tipo de recubrimiento de la fibra, el tiempo y temperatura de extracción, la fuerza iónica del medio y las condiciones de desorción de los compuestos de la fibra (Câmara *et al.*, 2006; Plutowska *et al.*, 2007). Los compuestos adsorbidos por la fibra serán desorbidos térmicamente y transferidos a una columna, y finalmente, analizados por un detector (Camarasu, 2000; Nielsen, 2008).

9.2.2.1. Selección de la fibra

En este estudio se realizó una identificación tentativa de los compuestos volátiles del licuado de chufa mediante su extracción con cuatro tipos de fibra diferentes (PA, DVB/PDMS, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS). La Tabla 9.1 muestra la suma de las áreas de las diferentes familias de compuestos identificadas en este trabajo, así como también el número total de compuestos extraídos por grupo funcional en los diferentes tipos de fibra que se utilizaron. El tipo de fibra (o fase sólida) con el que se trabaje para realizar la extracción de los compuestos volátiles del alimento será fundamental para optimizar su extracción selectiva, así como asegurar una buena repetibilidad del método

(Plutowska et al., 2007). Las diferencias entre las fibras se basan en los materiales que las recubren, los cuales determinaran la afinidad de los compuestos volátiles existentes en el espacio de cabeza por ser adsorbidos.

Tabla 9.1. Suma de áreas¹ correspondiente a los compuestos volátiles detectados por los cuatro tipos de fibra.

Familia de compuestos	Tipo de Fibra			
	DVB/CAR/PDMS	CAR/PDMS	PDMS/DVB	PA
C. Aromáticos	3731,73 ^a (20)	1363,38 ^b (15)	1445,06 ^b (23)	77,90 ^c (5)
Alcoholes	828,13 ^a (8)	705,90 ^a (6)	87,32 ^c (2)	391,56 ^b (5)
Adehídos	5583,39 ^a (10)	3437,11 ^{ab} (8)	2717,09 ^{bc} (5)	151,96 ^c (3)
Cetonas	746,40 ^b (6)	1410,46 ^a (4)	55,11 ^c (4)	nd
Terpenos	7171,63 ^a (9)	2751,38 ^c (7)	4515,82 ^b (11)	170,06 ^d (5)
Furanos	351,08 ^{ab} (2)	193,24 ^{ab} (3)	452,20 ^a (2)	79,26 ^c (3)
Ésteres	727,98 ^a (3)	611,66 ^b (4)	238,77 ^c (2)	49,13 ^d (3)
Alcanos	322,33 ^a (3)	54,18 ^b (2)	258,35 ^{ab} (2)	nd
Alquenos	241,04 ^a (3)	120,40 ^b (2)	91,64 ^b (2)	nd
Otros	690,51 ^b (1)	2029,05 ^a (5)	160,18 ^{bc} (2)	114,15 ^c (5)

¹ Media x 10⁴. Media del valor de las áreas calculado a partir de dos replicados (número de compuestos diferentes identificados en cada grupo).

^{a-d} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

nd = no detectado.

Como se puede observar en la Tabla 9.1, en general, las fibras PA y PDMS/DVB fueron las que presentaron peores resultados, ya que con estas se extrajeron los niveles más bajos de analitos de las horchatas. Los cromatogramas obtenidos a partir de la fibra PA presentaron el menor número de compuestos, así como la suma de las abundancias de las diferentes familias de compuestos también fue la más baja, en comparación con el resto de fibras. La fibra que extrajo un mayor número de compuestos fue la DVB/CAR/PDMS, seguida por la CAR/PDMS y la PDMS/DVB. La respuesta de las fibras DVB/CAR/PDMS y CAR/PDMS en los diferentes grupos que se evaluaron también fue diferente, ya que con la primera de ellas se consiguió una suma más elevada de la abundancia total de las familias de compuestos aldehídos, compuestos aromáticos, ésteres, alcanos, alquenos y terpenos.

La fibra PA, cuyo recubrimiento es de poliacrilato, se utiliza normalmente para la extracción de analitos muy polares, procedentes de muestras polares. Las fibras DVB/PDMS, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS permiten la extracción de compuestos de características varias. El divinilbenzeno (DVB) y el carboxeno (CAR) son materiales porosos que retienen fácilmente compuestos químicos, a diferencia de otros recubrimientos no porosos. Por ello, las fibras que contienen DVB, una fase aromática no polar, permiten la extracción de un elevado número de compuestos aromáticos, entre los que destacan los alcanos, alquenos y terpenos, todos ellos de bajo peso molecular. Estas fibras también se utilizan para la extracción de componentes semi-volátiles. El PDMS es un material que sirve de filtro para moléculas grandes, por lo que las fibras DVB/PDMS y DVB/CAR/PDMS permitirán la absorción de analitos principalmente de tamaño reducido.

Por todo ello, la fibra DVB/CAR/PDMS fue la que presentó los mejores resultados de extracción de componentes volátiles de la horchata. Su polaridad intermedia y los tipos de materiales de los que está formada probablemente expliquen su mayor capacidad de adsorción frente a las otras fibras, así como también su idoneidad para el tipo de compuestos existentes en las horchatas de chufa. Siendo así, este trabajo se continuó con este tipo de fibra.

9.2.2.2. Fuerza iónica, temperatura y volumen de muestra

En este estudio también se evaluaron las variables *fuerza iónica* (NaCl), *temperatura de extracción* y *volumen de muestra de producto* en el proceso de extracción de los compuestos volátiles de la horchata de chufa. Las condiciones óptimas de extracción se establecieron estadísticamente a partir del diseño factorial de los resultados, considerando todos los compuestos volátiles identificados por la fibra DVB/CAR/PDMS en el punto anterior. La Tabla 9.2 muestra los resultados obtenidos en el diseño del análisis factorial que se realizó. Como se observa, el volumen de muestra fue el factor que menos efecto tuvo en la extracción de componentes del licuado, afectando en la extracción en tan solo ~ 22% de los compuestos. En este estudio, la extracción que mejor resultados presentó fue la que se realizó con 2 mL de muestra. Lee *et al.* (2003) puntualizaron la importancia de la relación óptima entre el

volumen de muestra y el espacio de cabeza para maximizar la extracción de analitos de la matriz alimentaria. Algunos autores han destacado el buen ajuste de estos volúmenes de extracción, ya que al utilizar volúmenes elevados de muestra y tiempos de extracción muy prolongados existe la posibilidad de que parte de los compuestos volátiles se desadsorban de la fase sólida (Prosen *et al.*, 1999).

Por lo que a la fuerza iónica de la muestra se refiere, y como se puede observar en la Tabla 9.2, el ~ 80% de los compuestos que se detectaron estuvieron afectados por la adición de sal a la muestra, aunque la mayor parte de ellos (~ 56%) no mostraron un incremento de sensibilidad de detección con la saturación de sal. El incremento de fuerza iónica de la muestra suele optimizar la concentración del aroma de los compuestos en la fase de vapor, pero en algunos casos, ciertos analitos (p.e. de naturaleza polar) pueden interaccionar con las sales en solución y por consiguiente, se reduce su difusión hacia el espacio de cabeza (Câmara *et al.*, 2006; Guichard *et al.*, 2000).

El factor temperatura se evaluó en base a las temperaturas de extracción de 40 y 60 °C. La Tabla 9.2 muestra los compuestos volátiles cuya extracción estuvo estadísticamente afectada por el factor temperatura ($P < 0,05$), los cuales correspondieron al ~ 68% del total. Como se puede observar, la temperatura de 60 °C favoreció la extracción de la mayor parte de los compuestos, probablemente debido a que, a la menor temperatura (40 °C) los compuestos menos volátiles no se desplazaban hacia el espacio de cabeza del vial. El calor facilita la energía necesaria a los compuestos volátiles para romper las barreras que los mantienen unidos a la matriz alimentaria, permitiendo su desplazamiento hacia el exterior. Aún así, incrementos de temperatura excesivos pueden provocar una menor adsorción de compuestos en la fase sólida, debido a la competencia entre el vapor de agua y los compuestos volátiles del producto.

Tabla 9.2. Resultados del diseño de análisis factorial para la optimización de las condiciones de extracción de los componentes volátiles de la horchata de chufa.

Compuestos	Factor ¹			Significancia de la interacción		
	V	NaCl	T	V*NaCl	V*T	NaCl*T
2-propanona		sí				*
Acetato de propilo		sí			*	
α -Pino						
Sabineno		no	60			
Heptanal		no	60	**	*	
Limoneno		no	60			**
Propil benzeno		no	60			
1-hexanol	2	sí		**	*	**
Nonanal		sí	60			**
Benzaldehído	2	sí	60	**	*	
Geranial			60			
Benzeno etanol		sí	60			**
Eugenol		sí	60	*		
3-octanol		no	60	*		
Linalool		no	60	*		**
Myrcemo						
2-3-dihydroindene		no	60		*	**
Octane		sí	40	*		**
Etanol		sí	40			**
Cloroformo		sí	40			
1-decene		no	60			*
Tolueno		no				
Hexanal	2	sí		**	*	
β -pino						
Benzeno-etil		no				
Benzeno-1,4-dimetil		no	60			
p-xileno		no				
2-heptanona		no	60		*	
α -terpino	4	no		*	**	*
Benzeno-1-etil-3-metil		no	60			**
γ -terpino	4	no	60	*		**
Benzeno-1,2,3-trimetil		no				
Benzeno-1-etil-2-metil		no	60			**
Terpinoleno		no				
Benzeno-1,2,4-trimetil		no				
Benzeno-1-metil-3-propil		no	60			
Benzeno-4-etil-1,2-dimetil		no	60			
6-metil-5-hepten-2-ona						

Tabla 9.2. Resultados del diseño de análisis factorial para la optimización de las condiciones de extracción de los componentes volátiles de la horchata de chufa. (Continuación).

Compuestos	Factor			Significancia de la interacción		
	V ^b	NaCl ^c	T ^d	V*NaCl	V*T	NaCl*T
Benzeno-2-etil-1,4-dimetil	2	sí	60	**	**	**
Benzeno-1-metil-4,1-metil		no	60			*
Benzeno-1-etil-1,3-dimetil		no				
2- nonanona		no	60	**	*	**
2-etil-3-metil-pyrazina	2	sí	60	**		**
Benzeno-1,2,3,5-tetrametil			60	*		
Heptanol	2		60	**		
2-butanona						
2-decanona		no	60			**
β-cariofileno	2	sí	60			
Nonanol		no	60			**
2-furanmetanol						
2ciclohexen-1-ol-4,4,6-trimetil	2		60	**		
α-terpineol	2		60	**		*
Ciclododecano		no	60			**
Propionato de geranil			60			
Azuleno		no	60			**
Benzaldehído propilenglicol acetal	2	sí	60	**		
2-metoxifenol	2	sí	60	**		**
Etanona		sí				
Fenol	2					
Fenil-4-etil-2-metoxi	2	sí	60	**		*
Hidroxi-nonanonico ácido lactona	2	sí	60	**	*	**
2-propenal-3-fenil		sí	60			
4-vinyl-2-metoxi-fenol		sí	60			**
Ácido benzoico-2-amino-metil		sí	60	**		*

En esta tabla sólo se muestran los factores significativos ($P < 0,05$).
¹V = volumen (2 o 4 mL); NaCl = presencia (sí) o ausencia (no); T = temperatura (40 o 60 °C).
 (*) Interacción significativa entre factores ($P < 0,05$).
 (**) Interacción significativa entre factores ($P < 0,01$).

Según los resultados obtenidos, se escogió trabajar a partir de un volumen de muestra de 2 mL, sin adición de sal y a la temperatura y tiempo de extracción de 60 °C y 60 min, respectivamente. Destacar que la extracción de compuestos de la muestra se realizó bajo condiciones de agitación (a 700 rpm), ya que la agitación magnética del producto suele

incrementar la cantidad de compuestos volátiles en el espacio de cabeza, acelerando su transferencia desde la matriz alimentaria en el mínimo tiempo posible, y aumentando a la vez, la volatilización de los compuestos aromáticos minoritarios del producto (Wercinski *et al.*, 1999).

9.2.2. Caracterización del perfil volátil de las horchatas elaboradas y procesadas cruda, homogenizadas-pasteurizadas (P1 y P2) y UHPH (200 y 300 MPa).

En primer lugar, se realizó un estudio del efecto de los tratamientos de homogenización-pasteurización convencional y UHPH sobre el perfil de compuestos volátiles del producto base (horchata de chufa cruda). Posteriormente, se estudió la evolución del perfil volátil de las horchatas durante su conservación en frío (4 °C), evaluando de este modo el efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la evolución del perfil volátil de los licuados durante su almacenamiento en frío.

9.2.2.1. Efecto del tratamiento aplicado sobre los compuestos volátiles de la horchata de chufa cruda

Después de su elaboración y procesado (día 1), en los cinco licuados de chufa que se estudiaron se identificaron 39 compuestos volátiles diferentes (24 en el producto crudo, 29 y 28 en los pasteurizados P1 y P2, respectivamente, y 26 y 24 en los homogenizados a ultra alta presión a 200 y 300 MPa, respectivamente. En la Tabla 9.3 se observa la lista de compuestos identificados, los cuales se agrupan según su estructura química en las siguientes familias: compuestos aromáticos (10), alcoholes (10), aldehídos (3), cetonas (5), terpenos (5), furanos (1), ésteres (1), ácidos (3) y diacepinas (1). Si comparamos los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en el estudio previo de optimización del método de extracción (Tabla 9.2), se observa que la horchata comercial evaluada en la primera parte presentó un mayor número de compuestos volátiles. Entre otros aspectos, estas diferencias se deben a la existencia de aditivos aromatizantes y/o aditivos conservantes en la composición de este licuado comercial, los cuales repercuten notablemente en el perfil volátil del producto final.

Entre las familias de compuestos identificadas en el producto crudo, destacaron los compuestos aromáticos (~ 51,6%), los alcoholes (~ 36 %), los aldehídos (~ 6,3%) y los terpenos (~ 3,6%).

Tabla 9.3. Compuestos volátiles identificados en las horchatas de chufa cruda, homogenizadas-pasteurizadas (P1 y P2) y UHPH (200 y 300 MPa).

Compuesto	ID ¹	IK ²	Compuesto	ID	IK
<i>Compuestos Aromáticos</i>			<i>Cetonas</i>		
Tolueno	MS, IR, S	1053,0	3-octanona	MS, RI	1266,1
Etilbenzeno	MS, IR, S	1132,2	6-methyl -5-hepten- 2-ona	MS, RI, S	1351
p-xileno	MS, IR, S	1141,4	2-nonanona	MS, RI, S	1399,3
m-xileno	MS, IR	1146,3	1-feniletanona	MS, RI	1684,7
o-xileno	MS, IR	1191,9	1-etanona	MS	1903,2
Estireno	MS, IR	1256,5	<i>Terpenos</i>		
p-etiltolueno	MS	1275	α - pineno	MS, RI	1028,7
m-cimeno	MS, IR,S	1288,4	β - pineno	MS, RI	1104
1,2,4-trimetilbenzeno	MS	1295,3	Limoneno	MS, RI, S	1195,9
Naftaleno	MS	1795,7	γ -terpieno	MS, RI	1246,1
<i>Aldehídos</i>			1- α -terpineol	MS, RI	1708,8
N-hexanal	MS, RI, S	1089,4	<i>Ácidos</i>		
Octanal	MS, RI, S	1296,9	Hexanoico	MS,RI	1236,3
Nonanal	MS, RI, S	1406,2	Benzoico	MS, RI	1821,1
<i>Alcoholes</i>			Butanoico	MS	1881,6
Etanol	MS, RI	941,4	<i>Furanos</i>		
1-Hexanol	MS, RI, S	1357,6	2-pentil furano	MS, RI, S	1234,2
2-Octanol	MS	1417,8	<i>Ésteres</i>		
1-octen-3-ol	MS, RI, S	1451,9	Etil caprilato	MS, RI	1444,3
1-Heptanol	MS	1454,8	<i>Diacepinas</i>		
1-Octanol	MS, RI, S	1549,2	11H-dibenzodiazepina	MS	1393,3
1-Nonanol	MS, RI	1659,2			
Fenol 2-metoxi	MS, RI	1889,8			
Fenol	MS, RI, S	2024,8			
4-vinil-2-metoxifenol	MS, RI	2227,7			

¹ Identificación: MS = Identificación tentativa con el espectro de masas, RI = Índice de retención en comparación con la base de datos Pherobase, S = Identificación por comparación con estándares.

² Índice de retención de Kovatz calculado.

Cantalejo (1997) observó que los alcoholes constituían la familia de compuestos volátiles mayoritaria en las chufas, representando ~ 68% del total, seguida por los aldehídos (~ 6,4%), las pirazinas (~ 5,6%) y los terpenos (~ 4,2%). En las trufas (*Tuber*

indicum), otros tubérculos ampliamente cultivados en zonas de clima Mediterráneo, los alcoholes (~ 5,6%), aldehídos (4 - 27%) y el grupo de compuestos aromáticos (9 - 30%) también constituyen las familias mayoritarias (Spivallo *et al.*, 2007). Por el contrario, en otro tipo de tubérculo como es la patata dulce (*Ipomoea batatas*) los compuestos volátiles mayoritarios descritos corresponden a los alquenos (41-81%), seguidos por los alcoholes (2,5-47%) y los aldehídos (0,21-27,7%). El perfil volátil de los tubérculos está sujeto a sus condiciones de almacenaje y a las reacciones existentes entre sus componentes, por lo que en muchos casos, este perfil determinará la calidad del producto almacenado (Dresow *et al.*, 2009). Algunos autores han propuesto utilizar a estos compuestos volátiles para la distinción de productos en función de su origen geográfico, así como también para la detección de fraudes alimentarios (Plutowska *et al.*, 2007).

Como se puede observar en la Tabla 9.4, los tratamientos de homogenización-pasteurización convencional y UHPH modificaron significativamente ($P < 0,05$) el perfil volátil del licuado base. En general, todos los tratamientos aumentaron la cantidad de los compuestos volátiles identificados en la horchata cruda, a excepción de la horchata homogenizada a 200 MPa, cuya cantidad total no fue significativamente ($P > 0,05$) diferente a la del producto base. En comparación con el producto crudo, las muestras homogenizadas-pasteurizadas P1 y P2 presentaron un número mayor de compuestos volátiles, siendo nuevamente las familias de compuestos aromáticos (~ 48,1 y 44,2%, respectivamente) y alcoholes (37,7 y 36,6%, respectivamente) las mayoritarias, seguidas por los aldehídos (~ 6 y ~ 12%, respectivamente) y los terpenos (4,53 y 4,2%, respectivamente). Las ligeras diferencias que se observaron entre estas dos horchatas podrían atribuirse a la adición de aditivos estabilizantes en el producto P2, los cuales probablemente influenciaron en la formación de nuevos compuestos volátiles en el licuado y en la evolución de las reacciones de degradación entre los compuestos existentes en el producto (grasas, proteínas, carbohidratos, etc.). En las horchatas homogenizadas a 200 y 300 MPa, destacaron nuevamente los compuestos aromáticos (~ 53,5 y ~ 57%, respectivamente) y los alcoholes (44,5 y 32,2%, respectivamente), pero a diferencia de las horchatas P1 y P2, en las horchatas UHPH los terpenos ocuparon el tercer lugar en importancia, con el 6,23 y 5,64%, respectivamente. En estas horchatas (homogenizadas a 200 y 300 MPa), los aldehídos representaron el

1,27 y 3%, respectivamente. Las diferencias entre estos dos tipos de horchatas se atribuyeron a la intensidad del tratamiento de homogenización.

Tabla 9.4. Compuestos volátiles detectados¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) en las horchatas de chufa después de su elaboración y tratamiento.

Nombre	Tratamiento ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
C. Aromáticos	3592,79 ^c	10731,95 ^a	8228,28 ^{ab}	6865,66 ^{ab}	8308,00 ^{ab}	*
Alcoholes	2512,75 ^c	8397,21 ^a	6821,89 ^a	5716,41 ^{ab}	4705,07 ^b	*
Aldehídos	437,37 ^c	1330,61 ^b	2264,67 ^a	163,24 ^d	443,88 ^c	*
Cetonas	< LOQ	70,58 ^b	51,20 ^b	40,68 ^b	255,42 ^a	*
Terpenos	255,11 ^c	1011,36 ^a	791,69 ^b	800,68 ^{ab}	823,04 ^{ab}	*
Ácidos	32,85 ^c	281,60 ^a	82,30 ^b	47,79 ^c	< LOQ	*
Furanos	28,16 ^b	127,12 ^a	94,80 ^a	< LOQ	< LOQ	*
Ésteres	< LOQ	110,75 ^a	50,35 ^b	< LOQ	< LOQ	*
Diacepinas	94,88 ^b	235,93 ^a	248,00 ^a	< LOQ	50,07 ^c	*
Total	6953,84^b	22297,11^a	18633,18^a	12833,78^{ab}	14585,48^{ab}	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

* P < 0,05

A parte de estos grupos de compuestos mayoritarios (aromáticos, aldehídos, alcoholes y terpenos), en las horchatas también se detectaron compuestos pertenecientes a las familias de las cetonas, ácidos, furanos, ésteres y diacepinas, compuestos relacionados con reacciones de degradación de Maillard, Strecker o oxidación lipídica. Entre otros, estas reacciones son las principales causantes del *flavour* que se desarrolla en los tubérculos sometidos a tratamientos térmicos (Morrays *et al.*, 2010), por lo que no es de extrañar detectar compuestos volátiles derivados de estas reacciones de degradación en ambas horchatas pasteurizadas, P1 y P2. Durante el tratamiento de homogenización a ultra alta presión, el producto también se somete a un ligero y breve incremento de temperatura, consecuencia de su calentamiento adiabático en el mismo equipo (Dumay *et al.*, 2012). En este estudio, los productos tratados a 200 y 300 MPa alcanzaron temperaturas de ~ 92 y ~ 116 °C en su salida a la válvula de homogenización, respectivamente, y aunque se estima que el fluido permaneció bajo esta temperatura

durante un período de tiempo muy breve ($< 0,5$ s), la diferencia de temperatura alcanzada por ambas horchatas UHPH explicaría en gran parte las diferencias existentes entre su perfil volátil.

En los apartados siguientes, y para cada tipo de licuado, se discuten las diferencias observadas entre los compuestos volátiles que integran las diferentes familias de compuestos en las horchatas cruda, homogenizadas-pasteurizadas P1 y P2 y ultra homogenizadas a 200 y 300 MPa.

9.2.2.1.1. *Compuestos aromáticos*

En este estudio, los compuestos aromáticos fueron una de las familias de volátiles con mayor representación en las horchatas (Tabla 9.5). Se identificaron tentativamente un total de nueve compuestos aromáticos diferentes, de entre los cuales destacaron el tolueno, el etilbenceno, el xileno (en forma de diferentes isómeros), el estireno y el naftaleno. La presencia de estos compuestos estuvo influenciada por el tratamiento aplicado, a excepción del compuesto tolueno (Tabla 9.5). El tolueno fue el compuesto que más destacó en las horchatas, cuya presencia también se ha descrito en otros productos vegetales, como el aceite extraído de la naranja amarga o la patata (Mazza *et al.*, 1990). De entre los compuestos aromáticos minoritarios, en algunas horchatas también se identificó 1,2,4-trimetilbenzeno y m-cimeno, detectados indistintamente en los licuados y en cantidades casi despreciables.

El origen de estos compuestos aromáticos no está claro, pero en la literatura, algunos autores sugieren que la presencia de este tipo de compuestos en productos vegetales se debe a restos de productos químicos (herbicidas, pesticidas o inhibidores de la germinación), los cuales probablemente sean absorbidos por la planta durante su ciclo vegetativo (Mazza *et al.*, 1990). Estos productos se siguen utilizando a gran escala para mitigar pérdidas económicas relacionadas con la disminución de la productividad y/o calidad de los cultivos, y aplicados en cantidades elevadas, sus restos suelen permanecer en los alimentos (Nielsen, 2008). En nuestro caso, la materia prima de la cual se partió procede del suelo y, con una alta probabilidad, entró en contacto con los productos previamente mencionados. Cabe tener en cuenta que estos compuestos pueden repercutir en la aparición de sabores desagradables, alterando el perfil sensorial del

producto y suponiendo un riesgo para la salud. Sus niveles de tolerancia están establecidos por debajo los mg/kg de peso húmedo de producto comestible, cantidades similares a las observadas en este estudio.

Tabla 9.5. Compuestos aromáticos¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.

Compuesto	Tratamientos ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
Tolueno	3419,91 ^b	9834,75 ^a	7455,59 ^a	6182,51 ^a	7423,74 ^a	
Etilbenzeno	27,66 ^c	48,40 ^b	65,46 ^b	86,53 ^a	89,00 ^a	*
p-xileno	12,92 ^c	198,69 ^a	39,86 ^b	35,88 ^b	68,47 ^b	*
m-xileno	71,45 ^c	216,07 ^b	174,81 ^b	247,17 ^a	289,30 ^a	*
o-xileno	36,10 ^c	167,36 ^{ab}	118,56 ^b	114,42 ^b	210,64 ^a	*
Estireno	23,68 ^c	61,27 ^b	236,46 ^a	74,55 ^b	30,59 ^c	*
m-cimeno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	95,94 ^a	85,32 ^a	*
1,2,4-trimetilbenzeno	1,08 ^c	183,47 ^a	114,16 ^{ab}	< LOQ	92,46 ^b	*
Naftaleno	< LOQ	21,94 ^b	23,38 ^b	28,66 ^a	18,48 ^{bc}	*
Total	3592,79^c	10731,95^a	8228,28^{ab}	6865,66^{ab}	8308,00^{ab}	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

* P < 0,05

Otra posible explicación de la aparición de algunos de estos compuestos es la absorción de la planta de los hidrocarburos existentes en los restos de materia en descomposición, así como en el caso del tolueno, su origen también se justifica en la rotura de carotenoides, como por ejemplo el β-caroteno (Contarini *et al.*, 1997; Mazza *et al.*, 1990).

9.2.2.1.2. Alcoholes

Los alcoholes constituyeron una de las familias de compuestos volátiles más representativas en los licuados de chufa que se analizaron en este estudio (Tabla 9.7). La Tabla 9.6 muestra los alcoholes que se identificaron, así como la cantidad en que aparecieron en cada tipo de licuado. La presencia de alcoholes en los alimentos suele estar relacionada con diferentes orígenes, como por ejemplo son los procesos de oxidación de los ácidos grasos, la fermentación de los carbohidratos, el catabolismo de los aminoácidos en la degradación de Strecker o bien de la reducción a alcoholes de los aldehídos y cetonas del producto (Badui, 2006). Estos compuestos se caracterizan por sus notas a seta, verde, grasiento, acre, etc., cuyos umbrales de detección dependen, en gran parte, del tipo de alcohol (Achouri *et al.*, 2008, Lozano *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001).

Tabla 9.6. Alcoholes¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.

Compuesto	Tratamientos ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
Etanol	521,50 ^c	1926,53 ^a	2259,38 ^a	823,34 ^b	490,59 ^c	*
1-hexanol	104,98 ^c	191,89 ^b	119,12 ^{bc}	355,38 ^a	295,16 ^a	*
2-octanol	< LOQ	33,95 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	*
1-octen-3-ol	< LOQ	< LOQ	< LOQ	271,69 ^a	< LOQ	*
1-heptanol	94,06 ^c	273,45 ^b	229,22 ^b	< LOQ	1294,72 ^a	*
1-octanol	420,86 ^b	1295,59 ^a	1098,47 ^a	1167,77 ^a	13,07 ^c	*
1-nonanol	1336,97 ^c	4580,12 ^a	3017,34 ^b	3066,98 ^b	2570,65 ^b	*
Fenol-2-metoxi	< LOQ	7,47 ^a	6,43 ^a	< LOQ	< LOQ	*
Fenol	< LOQ	< LOQ	11,14 ^b	17,62 ^b	36,66 ^a	*
4-vinil-2-metoxifenol	34,38 ^b	88,21 ^a	80,79 ^a	13,63 ^{cd}	4,22 ^d	*
Total	2512,75^c	8397,21^a	6821,89^a	5716,41^{ab}	4705,07^b	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

* P < 0,05

La horchata cruda fue la que presentó los niveles más bajos de alcoholes totales, destacando entre ellos los compuestos etanol (~ 21%), 1-hexanol (~ 42%), y 1-nonanol (~ 53%). Estos compuestos coincidieron con los identificados por Cantalejo (1997) en sus estudios con chufas, quien destacó el hexanol como alcohol principal (21,6% de alcoholes totales). Los tratamientos de higienización que se aplicaron tuvieron un efecto significativo ($P < 0,05$) sobre el contenido total en alcoholes de la horchata de chufa cruda, el cual aumentó en las horchatas tratadas. Las horchatas P1 y P2 fueron las que presentaron el mayor contenido en alcoholes totales, siendo este contenido en el licuado homogenizado a 300 MPa inferior. El alcohol que más destacó en todas las horchatas tratadas (pasteurizadas y UHPH) fue el 1-nonanol, el origen del cual se podría relacionar con la reducción de sus correspondientes aldehídos o cetonas. A este compuesto le siguieron en importancia los alcoholes etanol, 1-heptanol y 1-octanol. Estos alcoholes también se han descrito previamente en diferentes productos vegetales (setas, zanahorias, patatas, nueces, etc.), y se relacionan con los procesos de oxidación lipídica de la grasa del producto. La presencia de etanol puede ser debida a la reducción de los aldehídos del producto vía degradación de Strecker, a partir del aminoácido alanina, así como también a la oxidación del ácido graso linolénico (Wilkens *et al.*, 1970). La horchata P1 fue la única en la que se detectó el alcohol secundario 2-octanol, aunque en cantidades muy bajas. En la horchata homogenizada a 200 MPa también destacó la presencia de 1-octen-3-ol, alcohol relacionado con la oxidación del ácido graso linolénico y al que se le asocian aromas acres, a ajo y a seta (Lozano *et al.*, 2007; Wilkens *et al.*, 1970).

Los compuestos fenólicos constituyeron el grupo de alcoholes de menor importancia en todas las horchatas. Se detectaron tres tipos de compuestos fenólicos diferentes (2-metoxi fenol, fenol y 4-vinil-2-metoxifenol). A diferencia de las horchatas cruda y UHPH, en los licuados pasteurizados se detectó el compuesto 2-metoxifenol, cuyo origen suele relacionarse con el efecto térmico y aporta aromas a almendra tostada (Cantalejo, 1997). En general, la presencia de esta familia de compuestos en productos vegetales se asocia con la degradación térmica de los ácidos fenólicos (como por ejemplo los taninos), la existencia de los cuales se ha descrito previamente en las chufas caracterizadas en esta tesis (*Capítulo 4*). Probablemente debido a ello, el contenido en fenoles de las horchatas P1 y P2 fue superior al resto (caracterizado principalmente por

el compuesto 4-vinil-2-metoxifenol), seguido por el de las horchatas UHPH y, finalmente, del producto crudo. Destacar el efecto de la ultra alta presión de homogenización en el aumento del contenido del compuesto fenol en las horchatas (Tabla 9.6).

9.2.2.1.3. Aldehídos

La Tabla 8.7 muestra la relación de aldehídos detectados en las horchatas de chufa de este estudio. Como se puede observar, se identificaron tres tipos de aldehídos diferentes, hexanal, octanal y nonanal, todos ellos relacionados con la β -oxidación de los ácidos poliinsaturados del producto y responsables de las notas aromáticas a verde, graso, cítrico y rancio (Badui, 2006). Entre otros, los aldehídos son productos secundarios de la oxidación lipídica, los cuales aparecen en la mayor parte de los productos alimenticios. La elevada reactividad de los hidroperóxidos, compuestos resultantes de las reacciones primarias de oxidación de la grasa, repercute en su rápida descomposición en diferentes compuestos, entre los que destacan los volátiles aldehídos. El elevado porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados de la horchata cruda repercute en que este producto sea susceptible a la oxidación después de su elaboración y procesado. En este estudio, el producto crudo se caracterizó por la presencia de nonanal (~ 82%), seguido por los aldehídos octanal (~ 8 %) y hexanal (~ 2,6%). En chufas recolectadas, Cantalejo (1997) observó que los aldehídos representaron un 6,4% del total de compuestos volátiles del licuado, siendo esta familia de compuestos volátiles, la segunda en importancia. Este autor observó que el aldehído más representativo de la chufa correspondía al benzaldehído (5%), seguido de los compuestos hexanal (0,6%), nonanal (0,4%) y octanal (0,3%). En nuestro estudio no se identificó benzaldehído en ninguna de las muestras, pero se conoce que este compuesto puede convertirse en ácido benzoico mediante procesos de oxidación, el cual sí fue detectado en las horchatas cruda y pasteurizadas P1 y P2 (Tabla 9.10).

Como se puede apreciar en la Tabla 9., los tratamientos de conservación que se aplicaron en este trabajo influenciaron significativamente el contenido total de aldehídos en las horchatas. Ambas bebidas pasteurizadas presentaron los niveles de aldehídos totales más elevados (P2 > P1), probablemente debido al efecto de la temperatura como

catalizador de las reacciones de oxidación de la grasa del producto. La horchata ultra homogenizada a 300 MPa no presentó un contenido en aldehídos significativamente distinto al producto crudo, siendo este contenido ligeramente superior al observado en la horchata homogenizada a menor presión (200 MPa). Previamente, otros autores también observaron este efecto en sus estudios, atribuyendo la menor abundancia de aldehídos en el producto homogenizado a 200 MPa a la mejor protección de las gotas de grasa frente a los procesos de oxidación, en comparación con sus homólogos homogenizados a 300 MPa (Pereda, 2008; Poliselí-Scopel, 2012).

Tabla 9.7. Aldehídos¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.

Compuesto	Tratamientos ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
Hexanal	11,52 ^d	28,36 ^c	76,17 ^b	45,52 ^{bc}	212,39 ^a	*
Octanal	36,41 ^c	< LOQ	89,54 ^b	47,11 ^{bc}	138,77 ^a	*
Nonanal	389,44 ^c	1302,25 ^b	2098,96 ^a	70,61 ^d	92,72 ^d	*
Total	437,37^c	1330,61^b	2264,67^a	163,24^d	443,88^c	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-d} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

* $P < 0,05$

Entre los aldehídos identificados en las horchatas tratadas, el nonanal y el hexanal fueron los compuestos de mayor relevancia. En las horchatas pasteurizadas (P1 y P2) y homogenizada a 200 MPa, el aldehído más abundante fue el nonanal, cuya cantidad apareció según la relación $P2 > P1 > 200$ y se le asocian aromas grasientos, florales, cítricos y afrutados. Se estima que este aldehído proviene de la autooxidación del ácido oleico del producto, el cual en la chufa se encuentra en un porcentaje importante, comprendido entre el 51,81-75,43% (López-Cortés *et al.*, 2013). El hexanal siguió al nonanal en importancia en estos licuados, siendo el contenido en hexanal de la horchata P2 el más alto, y el de las horchatas P1 y 200 MPa no significativamente ($P > 0,05$) diferente al contenido de hexanal de la horchata cruda. La presencia de este aldehído en

los productos alimenticios se relaciona, principalmente, con los procesos de oxidación lipídica. Este compuesto, fácilmente apreciable a nivel sensorial por su bajo umbral de detección (de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de producto), proviene de la oxidación de los ácidos grasos linoleico y linolénico, y contribuye a la aparición de aromas desagradables en muchos licuados vegetales (a hierba, pasto, grasa, cera, quemado) (Hashim *et al.*, 1995). Cabe destacar que el ácido linoleico es el tercer ácido graso mayoritario en las chufas, representando entre el 8,22 y 10,91% de los ácidos grasos totales (López-Cortés *et al.*, 2013). A diferencia de las otras horchatas, en el licuado homogenizado a 300 MPa, el hexanal fue el aldehído mayoritario (con el $\sim 48\%$ del total de aldehídos). Esta horchata presentó el contenido en octanal más elevado ($\sim 31\%$), aldehído que se asocia a la oxidación de los ácidos grasos oleico, linoleico y linolenico, y al cual se le asocian aromas a afrutados, cítricos y a verde.

En general, los aldehídos tienden a no acumularse en el producto durante mucho tiempo, ya que rápidamente se reducen a alcoholes primarios o bien son oxidados a sus correspondientes ácidos.

9.2.2.1.4. Cetonas

La Tabla 9.8 muestra los resultados obtenidos en la determinación de cetonas en los licuados de chufa que se analizaron en este estudio. Como se puede observar, se identificaron un total de 5 cetonas diferentes (3-octanona, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-nonanona, 1-feniletanona y 1-etanona), en bajas cantidades. Cantalejo (1997) describió contenidos muy bajos de cetonas en la chufa ($\sim 0,68\%$ del total de compuestos volátiles), motivo por el cual, probablemente, esta familia de compuestos no se detectó en el licuado crudo. En otros tubérculos, como por ejemplo la patata dulce, también se han descrito porcentajes muy bajos correspondientes a esta familia de compuestos (0 - 0,32%), cuyos contenidos tienden a incrementar con el proceso de fermentación del tubérculo (Li *et al.*, 2010).

Tabla 9.8. Cetonas¹ (expresados como ng de 4-metil-2-pentanol/mL de horchata) detectadas en la fracción volátil de las horchatas de chufa.

Compuesto	Tratamientos ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
3-octanona	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	5,15 ^a	*
6-metil-5-hepten-2-ona	< LOQ	16,81 ^a	16,26 ^a	21,73 ^a	27,09 ^a	*
2-nonanona	< LOQ	12,52 ^b	6,39 ^c	< LOQ	197,43 ^a	*
1-pentiletanona	< LOQ	25,30 ^a	28,55 ^a	18,95 ^a	25,75 ^a	*
1-etanona	< LOQ	15,95 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	*
Total	< LOQ	70,58^b	51,20^b	40,68^b	255,42^a	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-b} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

* P < 0,05

Como se puede observar en la Tabla 9.8, el contenido en cetonas de las horchatas estuvo determinado por el tipo de tratamiento que se aplicó. Estos compuestos también suelen aparecer al someter a los productos bajo el efecto de la temperatura. Resultan de las reacciones de degradación de Maillard, Strecker y de los procesos de β-oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Wilkens *et al.*, 1970). Cantalejo (1997) observó que el contenido en cetonas en las chufas incrementaba al tostarlas, llegando a contenidos de hasta un 12% del total, así como también Lasekan *et al.* (2013) destacaron la presencia de nueve cetonas diferentes en el aceite de chufa tostada. Esto explicaría que, en este estudio, esta familia de compuestos solo apareciera en las horchatas pasteurizadas y UHPH. La bebida homogenizada a 300 MPa fue la que mayor cantidad de cetonas presentó, probablemente consecuencia del efecto de la UHPH sobre la estructura de las proteínas, causando la liberación de péptidos y posiblemente aumentando las reacciones de degradación en las cuales estos se ven involucrados. En este licuado destacó el contenido en 2-nonanona, así como también se detectó una ligera cantidad de la cetona 3-octanona. A diferencia de las otras horchatas, el licuado P1 presentó una cierta cantidad de 1-etanona.

La presencia de cetonas suele relacionarse con aromas agradables en los productos (florales, afrutados), pero cabe destacar que a algunos de estos compuestos volátiles se

les asocian aromas indeseados (a seta, judía verde, etc.) (Wilkens *et al.*, 1970; Lozano *et al.*, 2007). La aceptación del producto por parte del consumidor podría estar comprometida por los bajos umbrales de detección de algunas de estas cetonas ($\sim 5 - 7 \mu\text{g}/\text{mL}$ de producto) (Lozano *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2007).

9.2.2.1.5. Terpenos

Los terpenos son componentes ubicuarios de los vegetales y frutos, los cuales derivan del isopreno, compuesto de aroma y sabor característico en aceites esenciales procedentes de plantas. Los terpenos tienden a degradarse al someterse a temperaturas elevadas, durante tiempos prolongados (p.e. $\geq 100 \text{ }^\circ\text{C}$) (Yang *et al.*, 2007). En algunos casos, la existencia de estos compuestos en el producto también podría ser debida a la actividad microbiana (Nielsen, 2008). En las horchatas de chufa que se estudiaron en este trabajo, esta familia de compuestos fue una de las más relevantes, representando entre $\sim 3,6$ y $\sim 5,7$ del total de volátiles aislados en el licuado (Tabla 9.4). Como se puede observar en la Tabla 9.9, los tratamientos de pasteurización y UHPH tuvieron un efecto significativo sobre el contenido total de terpenos de la horchata, incrementando su valor. La horchata P1 presentó el mayor contenido en terpenos, el cual no fue significativamente diferente al detectado en las horchatas homogenizadas a 200 y 300 MPa.

Entre los terpenos identificados, el limoneno fue el que tuvo mayor relevancia en todas las horchatas. En chufas, previamente, Cantalejo (1997) destacó el limoneno como terpeno mayoritario del tubérculo, con el $\sim 4\%$ de representación frente al total de los volátiles aislados. Con el tratamiento de homogenización-pasteurización y ambos tratamientos de UHPH, el contenido en limoneno de las horchata cruda aumentó significativamente ($P < 0,05$). Diferentes autores en la literatura apuntan que los tratamientos térmicos pueden afectar a los compuestos que mantienen emulsionado el limoneno, permitiendo su liberación (Badui, 2006), pero según lo observado en este estudio, se estima que el proceso de UHPH también tendría un efecto importante en su liberación. Este compuesto representa una sustancia natural existente en más de 300

plantas diferentes, muy característica del aceite de los cítricos, al se se le asocian aromas característicos de los mismos (Badui, 2006).

Tabla 8.9. Terpenos¹ detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.

Compuesto	Tratamientos ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
α- pineno	29,80 ^b	< LOQ	< LOQ	39,59 ^a	37,73 ^a	*
β- pineno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	9,12 ^a	6,24 ^a	*
Limoneno	165,91 ^c	975,11 ^a	791,69 ^{ab}	722,50 ^a	750,00 ^a	*
γ-terpieno	59,40 ^a	< LOQ	< LOQ	14,21 ^b	17,39 ^b	*
l- α -terpineol	< LOQ	36,25 ^a	< LOQ	15,26 ^b	11,68 ^b	*
Total	255,11^c	1011,36^a	791,69^b	800,68^{ab}	823,04^{ab}	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

* $P < 0,05$

En ambas bebidas UHPH también se detectó una pequeña cantidad de los terpenos α- pineno y β- pineno, compuestos ampliamente encontrados en las plantas y cuya presencia se relaciona con aromas a pino (Badui, 2006). En todas ellas, también se detectó el compuesto γ-terpieno. Estos compuestos se han descrito previamente como característicos del aroma en diferentes cítricos y vegetales, como son el limón o la zanahoria (Badui, 2006). Probablemente, el efecto térmico al que las horchatas P1 y P2 fueron sometidas repercutió en la no detección de estos compuestos en estas dos horchatas (Tabla 9.9). Destacar que en las horchatas P1, 200 y 300 MPa también se detectó una pequeña cantidad del terpeno l-α-terpineol, un compuesto presente en muchas plantas, como el laurel o el jengibre.

9.2.2.1.6. Ácidos, ésteres, diacepinas y furanos

En este estudio, las familias de compuestos volátiles minoritarios correspondieron a los ácidos, los ésteres, las diacepinas y los furanos (Tabla 9.10). Como se puede observar, muchos de ellos aparecieron mayoritariamente en las horchatas pasteurizadas P1 y P2, debido a que su formación se relaciona con el efecto de la temperatura sobre los componentes del producto, resultando de las reacciones de pardeamiento no-enzimático de Maillard y de degradación de Strecker (Badui, 2006). La horchata de chufa es un licuado que contiene una cantidad considerable de carbohidratos, por lo que las reacciones entre azúcares y aminoácidos en el producto fácilmente se ven favorecidas con los procesos térmicos.

Se identificaron tres tipos de ácidos diferentes, correspondientes a los ácidos hexanoico, benzoico y butanoico. Los ácidos más abundantes en la horchata cruda fueron los ácidos benzoico y butanoico (Tabla 9.10). El ácido benzoico es un ácido carboxílico aromático que se encuentra de forma natural en diferentes tipos de productos de origen vegetal (en frutas como la ciruela, en el clavo o en algunas flores), y entre otros, se puede sintetizar mediante la reacción del tolueno con un benzeno. Los ácidos hexanoico y butanoico (o butírico) son ácidos grasos monocarboxílicos saturados, mucho más estables que los insaturados frente la oxidación con los procesos térmicos, pero oxidables a temperaturas elevadas (≥ 180 °C) y en presencia de O₂. Los tratamientos de pasteurización y UHPH influenciaron significativamente ($P < 0,05$) sobre el contenido en ácidos de las horchatas. Como se puede apreciar en la Tabla 9.10, las horchatas pasteurizadas presentaron los contenidos en ácidos totales más elevados, siendo este contenido en la horchata P1 significativamente superior al de la horchata P2. El ácido que acentuó esta diferencia entre horchatas pasteurizadas fue el butanoico, al cual se le asocian aromas a queso y probablemente procediera de la oxidación de los ácidos grasos del licuado (Lozano *et al.*, 2007). Por el contrario, la aplicación de la UHPH no incrementó el contenido en ácidos de la horchata cruda. No se detectó ningún tipo de ácido en el licuado homogenizado a 300 MPa, mientras que en el homogenizado a menor presión, se detectaron cantidades de ácido butanoico similares al licuado P2 (Tabla 9.10).

Tabla 9.10. Compuestos minoritarios¹ detectados en la fracción volátil de las horchatas de chufa.

Compuesto	Tratamientos ²					P valor
	Cruda	P1	P2	200	300	
Ácidos						
Hexanoico	2,76 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	*
Benzoico	16,18 ^b	36,01 ^a	41,19 ^a	< LOQ	< LOQ	*
Butanoico	13,91 ^c	245,59 ^a	41,11 ^b	47,79 ^b	< LOQ	*
Total	32,85^c	281,60^a	82,30^b	47,79^c	< LOQ	*
Furanos						
2-pentilfurano	28,16 ^b	127,12 ^a	94,80 ^a	< LOQ	< LOQ	*
Ésteres						
Etilcaprilato	< LOQ	110,75 ^a	50,35 ^b	< LOQ	< LOQ	*
Diacepinas						
11H-dibenzodiazepina	94,88 ^b	235,93 ^a	248,00 ^a	< LOQ	50,07 ^c	*

¹ Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados.

² Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C).

^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

* P < 0,05

En este estudio tan solo se identificó un éster, el etil caprilato, en las dos horchatas pasteurizadas convencionalmente (P2 > P1). Los ésteres corresponden a una de las familias aromáticas más importantes de las frutas, responsables de los aromas florales y afrutados, los cuales se sintetizan mayoritariamente durante su maduración a partir de los alcoholes o aminoácidos del producto. Estos compuestos también pueden proceder de la esterificación de ácidos grasos de cadena media y corta con alcoholes. Cantalejo (1997) identificó un total de siete ésteres diferentes en la chufa cruda, representando esta familia de compuestos volátiles un porcentaje de ~ 1,45% del total. Este autor observó que el éster etil caprilato constituía ~ 0,1% del total de compuestos volátiles en este tubérculo. En licuado de soja, Poliseli-Scopel *et al.* (2013) también destacaron los ésteres como compuestos minoritarios del producto, observando su disminución con la aplicación del tratamiento de UHPH, efecto que también se observó en este estudio (Tabla 9.10).

Los furanos son compuestos volátiles que contribuyen en el aroma tostado de los productos, la presencia de los cuales se relaciona con matrices ricas en carbohidratos, proteínas y almidón, similares a la que presenta la horchata de chufa. Estos compuestos pueden provenir de la degradación térmica de los carbohidratos, así como también de las reacciones de degradación de Strecker y oxidación de los ácidos poliinsaturados (Badui, 2006). En muchos productos, la presencia de furanos se asocia con cambios de color al producto, principalmente debidos a las reacciones de pardeamiento no enzimático (Badui, 2006). En este estudio, se identificó tan solo un furano, el compuesto 2-pentil furano, en las horchatas cruda y pasteurizadas convencionalmente. Cantalejo (1997) describió la presencia de una ligera cantidad de compuestos de la familia de los furanos en chufas crudas ($< 0,2\%$ del total de compuestos volátiles aislados), cantidad que también aumentó después de someter a los tubérculos al proceso de tostado. El compuesto detectado se forma a partir de la oxidación del ácido linoleico, y se le atribuyen sabores desagradables grasientos y a judía verde (Achouri *et al.*, 2006).

En las horchatas también se detectó la diacepina 11H-dibenzodiazepina, según la relación $P1 = P2 > \text{cruda} > 300$. La cantidad de este compuesto destacó en las horchatas pasteurizadas convencionalmente. Las diacepinas son compuestos que resultan de los procesos térmicos, y otorgan aromas a tostado. Son propias de alimentos en los que existe una cantidad importante de azúcares y han sido sometidos a tratamientos térmicos de conservación. Por ello, no fue de extrañar que su contenido estuviera significativamente ($P < 0,05$) afectado por el tratamiento de conservación aplicado, siendo este significativamente superior ($P < 0,05$) en las horchatas P1 y P2.

9.2.2.2. *Análisis de componentes principales (ACP)*

El análisis de componentes principales (ACP, o en inglés *PCA*) es un tipo de análisis estadístico cuyo objetivo es reducir un banco de datos con muchas variables a un menor número de variables (o componentes principales), mediante la combinación lineal de las variables originales. Mediante esta técnica se persigue estudiar las causas de la variabilidad del conjunto de datos, así como ordenarlas por importancia. La Figura 9.2 presenta la distribución de las muestras según sus componentes volátiles (discutidos en el apartado anterior) en los componentes principales PC1 y PC2, los cuales explican el 39 y 32 % de la variabilidad de los datos.

En la Figura 9.1 se aprecia una clara diferenciación entre las muestras cruda, homogenizadas-pasteurizadas convencionalmente y UHPH, por lo que a grandes rasgos, estos licuados se podrían englobar en tres grupos de productos. Por un lado se encontraría la horchata cruda, situada entre las horchatas tratadas por ambos procesos, por el otro las horchatas homogenizadas-pasteurizadas P1 y P2 (situadas en la parte negativa de la componente PC1), y finalmente, al lado opuesto de las homogenizadas-pasteurizadas se situarían las homogenizadas por ultra alta presión (situadas en la parte positiva de la componente PC1), siendo estas ligeramente diferentes entre sí. La componente PC1 daría evidencia de las diferencias entre horchatas causadas, principalmente, por el efecto del tratamiento. Como se puede observar en la Tabla 9.11, los compuestos volátiles que presentaron mayor valor en esta componente fueron los aldehídos, las cetonas, los furanos, diacepinas y algunos alcoholes y terpenos. De hecho, la presencia de gran parte de estos compuestos se relaciona intrínsecamente con las principales reacciones de degradación térmicas de los productos (degradación de la grasa y reacciones de pardeamiento no enzimático). Los valores obtenidos en la componente PC1 en las cetonas 3-octanona y 6-metil-5-hepten-2-ona, los terpenos α y β -pineno y el aldehído hexanal probablemente se relacionarían con el efecto de los tratamientos de UHPH. Por el contrario, los valores correspondientes a algunos alcoholes, a la cetona 2-nonanona, al ácido butanoico y al 2-pentilfurano se atribuirían al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional del licuado, como productos resultantes de la degradación térmica. El alto valor correspondiente al aldehído 2-nonanal también se podría atribuir a la mayor oxidación existente en la horchata P2.

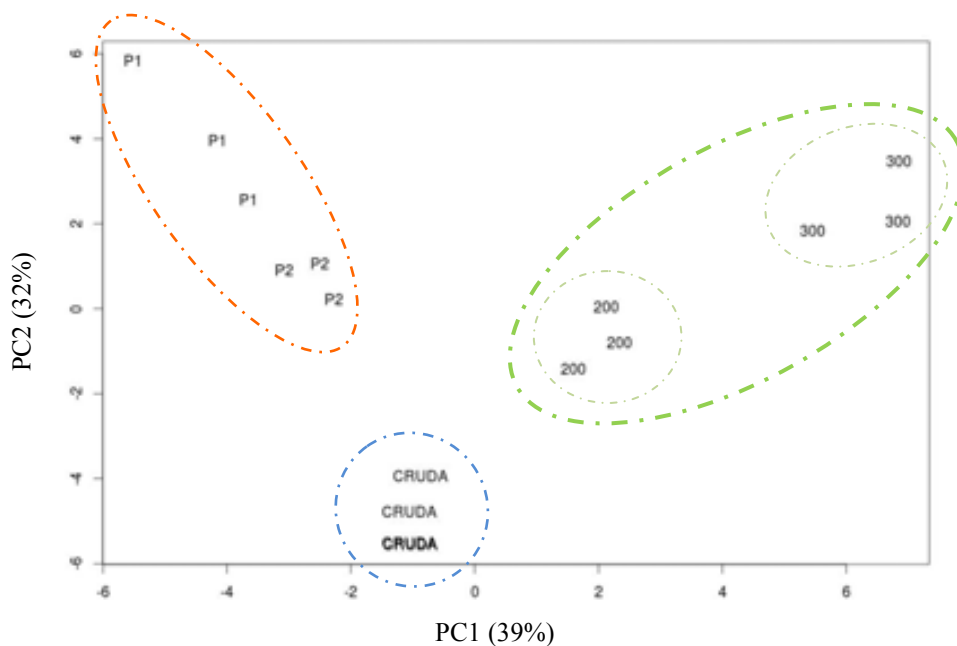


Figura 9.1. Gráfico obtenido en el análisis de los componentes principales de las muestras, definido por los dos primeros componentes principales PC1 y PC2.

Cabe destacar que el elevado valor del terpeno γ -terpieno en la componente PC2 probablemente se asociaría con la horchata cruda, la cantidad del cual disminuyó con la aplicación de los tratamientos de higienización (Tabla 9.9), así como también se le asociaría el destacado valor de la componente PC2 para el ácido hexanoico, la cantidad del cual fue superior en el producto sin tratar (Tabla 9.10).

Por todo ello, y como se observa en la Figura 9.2, este análisis verificó las diferencias existentes entre las horchatas elaboradas y procesadas en este estudio, destacando el principal efecto de la temperatura en la formación de nuevos compuestos volátiles en el producto crudo.

Tabla 9.11. Porcentaje de varianza calculado correspondiente a los dos componentes principales PC1 y PC2.

Compuestos	Componentes Principales	
	PC1	PC2
<i>Compuestos Aromáticos</i>		
Tolueno	0,045	0,248
Etilbenzeno	0,189	0,148
p-xileno	-0,062	0,236
m-xileno	0,178	0,182
o-xileno	0,152	0,204
Estireno	-0,081	0,070
m-cimeno	-0,165	0,135
1,2,4-trimetilbenzeno	0,230	0,071
Naftaleno	0,065	0,196
<i>Aldehidos</i>		
Hexanal	0,205	0,122
Octanal	-0,123	0,196
Nonanal	0,207	0,117
<i>Alcoholes</i>		
Etanol	-0,169	0,127
1-hexanol	0,122	0,216
2-octanol	-0,184	0,100
1-octen-3-ol	-0,184	0,180
1-heptanol	0,052	-0,036
1-octanol	-0,165	0,085
1-nonanol	-0,016	0,271
Fenol-2-metoxi	-0,164	0,154
Fenol	0,196	0,063
4-vinil-2-metoxifenol	-0,221	0,106
<i>Cetonas</i>		
3-octanona	0,205	0,127
6-metil-5-hepten-2-ona	0,208	0,070
2-nonanona	-0,221	0,096
1-pentiletanona	0,014	0,244
1-etanona	-0,157	0,162
<i>Terpenos</i>		
α - pineno	0,232	-0,056
β - pineno	0,208	0,067
Limoneno	0,080	0,243
Y-terpieno	0,046	-0,215
l- α -terpineol	-0,023	0,219

Tabla 8.11. Porcentaje de varianza calculado correspondiente a los dos componentes principales PC1 y PC2. (*Continuación*)

Compuestos	Componentes Principales	
	PC1	PC2
<i>Ácidos</i>		
Hexanoico	-0,061	-0,209
Benzoico	-0,219	0,076
Butanoico	-0,161	0,171
<i>Furanos</i>		
2-pentilfurano	-0,206	0,121
<i>Ésteres</i>		
Etil Caprilato	-0,148	0,178
<i>Diacepinas</i>		
11H-Dibenzodiazepina	0,209	0,128
% Varianza explicada	39	32

9.2.3. Evolución del perfil de volátiles de los licuados durante su vida útil

La evolución del perfil sensorial de los alimentos almacenados constituye un buen indicador de su calidad. Durante la vida útil de los alimentos se generan nuevos compuestos aromáticos, resultantes de reacciones bioquímicas, microbiológicas o enzimáticas existentes en los productos almacenados. Los compuestos formados se diferencian entre los que desempeñan un efecto positivo en el perfil organoléptico del alimento (procedentes de procesos de maduración, fermentación, etc., mayoritariamente controlados), y los resultantes de reacciones de degradación (lo cuales influenciarán negativamente sobre su perfil sensorial).

En la Tabla 9.12 se observa la evolución de las familias de componentes volátiles de las horchatas durante su almacenamiento en refrigeración (4 °C). Como se puede apreciar, el contenido total en compuestos volátiles en las diferentes horchatas fue significativamente inferior ($P < 0,05$) al final de su conservación en frío. Las familias de

los alcoholes, compuestos aromáticos, aldehídos y terpenos continuaron siendo las que caracterizaron el perfil volátil de todos los licuados de chufa, coincidiendo los compuestos que integraron estas familias de compuestos con los descritos en el día 1 (Tablas 9.14-9.19).

Como se muestra en la Tabla 9.13, en general, los compuestos aromáticos en las diferentes horchatas se mantuvieron estables durante la vida útil de los productos almacenados. Los alcoholes, una de las familias de compuestos volátiles más importantes en todos los licuados, también fueron una familia de compuestos que se mantuvo estable, si bien se apreciaron cambios en ciertos compuestos. En general, se observó un incremento del compuesto 1-nonanol en todas las horchatas, probablemente debido a la reducción de sus correspondientes aldehídos o cetonas, procedentes de los procesos de oxidación de la grasa del producto. Destacar que en la horchata homogenizada a 300 MPa se observó un aumento importante de la cantidad de 1-octanol y nonanol al final de la vida útil del producto, probablemente debido a los mismos procesos de oxidación lipídica. También se apreció un ligero incremento del compuesto fenol al final de la vida útil de las horchatas P1 y P2, y del fenol 4-vinil-metoxifenol en ambas bebidas tratadas por UHPH.

Por lo que al contenido en aldehídos se refiere, en general, se observó una tendencia inversa entre las horchatas pasteurizadas P1 y P2 y las homogenizadas a ultra alta presión. En el primer caso, el contenido total en aldehídos decreció con el tiempo de almacenaje, mientras que en las bebidas UHPH este tendió a incrementar. En el último día de muestreo, el licuado homogenizado a 300 MPa fue el que presentó un contenido en aldehídos superior (Tabla 9.14), probablemente debido a un aumento en las reacciones secundarias de oxidación de la grasa. Este incremento estuvo determinado, principalmente, por el compuesto nonanal, la cantidad del cual incrementó notablemente a partir de los 14 días de almacenaje del producto.

La familia de los compuestos terpénicos también disminuyó a razón del tiempo de almacenaje de los licuados (Tabla 9.17). Destacar que al final de la vida útil de las horchatas pasteurizadas P1 y P2 se apreció una pequeña cantidad de γ -terpeneo compuesto no detectado a día 1 y que contribuye al perfil aromático de diferentes frutas y vegetales (Badui, 2006).

En cuanto a las familias de compuestos minoritarias (cetonas, ácidos, furanos, ésteres y diacepinas), sus contenidos también disminuyeron a razón de la vida útil de los productos. Los furanos (Tabla 9.19), compuestos asociados a las reacciones de Maillard derivadas de la aplicación de temperatura en los productos, se mantuvieron bastante estables en el licuado P1, no detectándose en el P2 al final de su vida comercial, pero incrementaron significativamente en las horchatas UHPH, en las cuales se detectó una cantidad mínima significativa ($P < 0,05$) de este compuesto al final de su conservación en frío. Polisel-Scopel (2012) también observaron un ligero incremento de este grupo de compuestos al final de la vida útil de licuados de soja homogenizados por ultra alta presión. De hecho, en este estudio, el contenido en furanos estuvo representado tan sólo por el compuesto, el 2-pentilfuran, el cual también se podría relacionar con los procesos de oxidación de la grasa, hecho que probablemente explicaría la aparición de furanos en las horchatas UHPH con el transcurso del tiempo.

La cantidad de ácidos en las diferentes horchatas también disminuyó a razón del tiempo de almacenaje de los licuados (Tabla 9.18). En la horchata homogenizada a 300 MPa no se detectaron ácidos durante la evolución de este licuado en frío. La Tabla 9.17 muestra el contenido en los ácidos benzoico y butanoico en las horchatas pasteurizadas P1 y P2 durante su almacenamiento en frío, contenido que disminuyó significativamente ($P < 0,05$) a razón del tiempo. Por el contrario, al final de la vida útil de estos licuados apareció cierta cantidad de ácido hexanoico. Este ácido, probablemente, proceda de la oxidación del aldehído hexanal, aunque su existencia también podría estar relacionada con el metabolismo de los carbohidratos del producto (Badui, 2006). Al ácido hexanoico se le asocian aromas fétidos, rancios y a pescado, y, entre otros, es uno de los principales responsables de los aromas desagradables en los frutos secos rancios (Wilkens *et al.*, 1970).

El contenido en cetonas, diacepinas y ésteres de las horchatas (Tablas 9.16 y 9.19), en general, también disminuyó a durante el tiempo de almacenamiento, lo que apuntaría a que estas familias de compuestos aromáticos se vieran tan solo involucradas en el desarrollo del aroma de los licuados durante el primer período de su conservación en frío.

Cabe destacar que la baja concentración en que todos estos compuestos se encontraron en los diferentes licuados tuvo, probablemente, un efecto muy leve sobre el perfil aromático final de las horchatas almacenadas.

Tabla 9.12. Evolución de las diferentes familias de compuestos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol/mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
C. Aromáticos	10731,95 ^a	3764,98 ^{ab}	10000,80 ^a	8228,28 ^{ab}	11097,06 ^a	11035,38 ^a
Alcoholes	8397,21 ^{ab}	3702,10 ^{cd}	5559,74 ^{bc}	6821,89 ^{ab}	8704,06 ^{ab}	9447,75 ^{ab}
Aldehídos	1330,61 ^b	264,36 ^{cd}	310,10 ^{cd}	2264,67 ^a	1265,08 ^b	1563,78 ^{ab}
Cetonas	70,58 ^c	36,80 ^{cd}	23,35 ^{cd}	51,20 ^{cd}	45,93 ^{cd}	132,52 ^b
Terpenos	1011,36 ^a	266,45 ^b	399,69 ^b	791,69 ^{ab}	1226,36 ^a	1056,49 ^a
Ácidos	281,60 ^a	83,03 ^b	31,33 ^c	82,30 ^b	< LOQ	24,96 ^c
Furanos	127,12 ^a	65,82 ^b	97,57 ^{ab}	94,80 ^{ab}	< LOQ	< LOQ
Ésteres	110,75 ^a	67,79 ^b	62,62 ^b	50,35 ^{bc}	51,02 ^{bc}	47,49 ^c
Diacepinas	235,93 ^a	228,52 ^a	260,04 ^a	248,00 ^a	101,35 ^b	108,37 ^b
Total	22297,11^a	8479,85^c	16745,24^{bc}	18633,18^{ab}	22490,86^c	23416,74^c

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
C. Aromáticos	6865,66 ^{ab}	4962,66 ^{ab}	2280,91 ^b	8308,00 ^{ab}	5701,12 ^{ab}	6853,76 ^{ab}	12200,06 ^a
Alcoholes	5716,41 ^{bc}	5565,12 ^{bc}	2424,58 ^d	4705,07 ^{bc}	4808,93 ^{bc}	6274,62 ^{ab}	10508,15 ^a
Aldehídos	163,24 ^d	772,95 ^{bc}	513,86 ^{bc}	443,88 ^c	2092,10 ^a	2393,16 ^a	1976,81 ^a
Cetonas	40,68 ^{cd}	15,32 ^{de}	14,23 ^c	255,42 ^a	17,87 ^{de}	28,33 ^d	14,32 ^c
Terpenos	800,68 ^{ab}	595,58 ^{ab}	239,83 ^b	823,04 ^{ab}	786,34 ^{ab}	750,00 ^{ab}	636,92 ^{ab}
Ácidos	47,79 ^{bc}	47,22 ^{bc}	3,36 ^d	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Furanos	< LOQ	< LOQ	70,27 ^b	< LOQ	< LOQ	< LOQ	69,55 ^b
Ésteres	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Diacepinas	< LOQ	< LOQ	< LOQ	54,07 ^c	30,75 ^c	91,16 ^{bc}	125,24 ^b
Total	12833,78^{bc}	11958,85^{bc}	5547,04^c	14585,48^{ab}	13437,11^a	16391,03^c	25531,05^c

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

Capítulo 9

Tabla 9.13. Evolución de los compuestos aromáticos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
Tolueno	9834,75 ^{ab}	3360,80 ^{a1}	9608,02 ^{ab}	7455,59 ^{ab}	10660,14 ^{ab}	10267,68 ^{ab}
Ethylbenzeno	48,40 ^{bc}	55,45 ^{ab}	54,43 ^{ab}	65,46 ^{ab}	68,62 ^{ab}	126,46 ^a
p-xileno	198,69 ^a	36,59 ^b	38,61 ^b	39,86 ^b	54,88 ^b	80,11 ^b
m-xileno	216,07 ^{ab}	153,08 ^{bc}	136,10 ^{bc}	174,81 ^{abc}	189,14 ^{abc}	375,07 ^a
o-xileno	167,36 ^a	44,48 ^c	67,65 ^c	118,56 ^b	76,31 ^c	98,89 ^{bc}
Styreno	61,27 ^a	25,21 ^b	33,72 ^b	236,46 ^a	25,61 ^b	54,00 ^b
m-cymeno	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1,2,4-trimelilbenzeno	183,47 ^a	89,37 ^{ab}	62,27 ^{bc}	114,16 ^{ab}	< LOQ	< LOQ
Naftaleno	21,94 ^{ab}	< LOQ	< LOQ	23,38 ^{ab}	22,36 ^{ab}	33,17 ^a
Total	10731,95^a	3764,98^{a1}	10000,80^{ab}	8018,70^{ab}	11097,06^a	11035,38^a

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
Tolueno	6182,51 ^{ab}	4278,83 ^{ab}	2094,70 ^b	7423,74 ^a	5100,78 ^{ab}	6270,88 ^{ab}	11755,92 ^a
Ethylbenzeno	86,53 ^{ab}	73,30 ^{ab}	10,92 ^c	89,00 ^a	35,29 ^{bc}	59,47 ^{ab}	75,00 ^{ab}
p-xileno	35,88 ^b	53,38 ^b	12,00 ^b	68,47 ^b	20,27 ^b	27,69 ^b	50,69 ^b
m-xileno	247,17 ^{ab}	219,69 ^{ab}	67,00 ^c	289,30 ^a	88,34 ^{bc}	126,91 ^{bc}	191,63 ^{bc}
o-xileno	114,42 ^b	85,76 ^{bc}	30,00 ^c	210,64 ^a	247,20 ^a	144,16 ^b	< LOQ
Styreno	74,55 ^b	41,96 ^b	22,26 ^b	30,59 ^c	59,96 ^b	79,89 ^b	126,82 ^b
m-cymeno	95,94 ^a	< LOQ	< LOQ	85,32 ^a	77,56 ^a	68,77 ^a	< LOQ
1,2,4-trimelilbenzeno	< LOQ	188,35 ^a	37,97 ^c	92,46 ^b	71,72 ^{bc}	75,99 ^b	< LOQ
Naftaleno	28,66 ^a	21,39 ^{ab}	6,06 ^c	18,48 ^{bc}	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Total	6865,66^{ab}	4962,66^{ab}	2280,91^b	8308,00^{ab}	5701,12^{ab}	6853,76^{ab}	12200,06^a

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

Tabla 9.14. Evolución de los alcoholes (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
Etanol	1926,53 ^{ab}	704,57 ^{cd}	729,86 ^{cd}	2259,38 ^{ab}	2278,46 ^a	1053,18 ^b
1-hexanol	191,89 ^b	65,59 ^c	344,46 ^{ab}	119,12 ^{bc}	83,52 ^c	167,12 ^b
2-octanol	33,95 ^a	29,59 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-octen-3-ol	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-heptanol	273,45 ^{bc}	141,45 ^{bc}	280,53 ^{bc}	229,22 ^{bc}	364,64 ^{bc}	382,21 ^{bc}
1-octanol	1295,59 ^{ab}	677,92 ^{bc}	987,65 ^b	1098,47 ^b	1788,34 ^{ab}	1807,76 ^{ab}
1-nonanol	4580,12 ^{ab}	2022,27 ^c	3070,75 ^{bc}	3017,34 ^{bc}	4050,44 ^{ab}	5793,16 ^a
Fenol-2-metoxo	7,47 ^a	4,96 ^a	< LOQ	6,43 ^a	9,51 ^a	< LOQ
Fenol	< LOQ	< LOQ	88,96 ^{ab}	11,14 ^b	25,37 ^b	118,12 ^a
4-vinil-2-metoxifenol	88,21 ^{ab}	55,10 ^{ab}	57,53 ^{ab}	80,79 ^{ab}	103,78 ^a	126,20 ^a
Total	8397,21^{ab}	3702,1^{cd}	5559,74^{abc}	6821,89^{ab}	8704,06^{ab}	9447,75^{ab}

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
Etanol	823,34 ^{bc}	952,94 ^b	371,86 ^d	490,59 ^d	828,02 ^{bc}	645,06 ^c	274,95 ^d
1-hexanol	355,38 ^{ab}	314,00 ^{ab}	92,22 ^c	295,16 ^{ab}	244,73 ^{ab}	402,61 ^{ab}	598,08 ^a
2-octanol	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-octen-3-ol	271,69 ^a	20,50 ^b	37,12 ^b	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-heptanol	< LOQ	< LOQ	100,06 ^c	1294,72 ^a	197,89 ^{bc}	232,61 ^{bc}	549,16 ^b
1-octanol	1167,77 ^{ab}	1004,68 ^b	432,21 ^c	13,07 ^d	1034,51 ^b	1602,18 ^{ab}	2428,38 ^a
1-nonanol	3066,98 ^{ab}	3196,32 ^{ab}	1356,92 ^d	2570,65 ^{bc}	2461,81 ^{bc}	3348,48 ^{ab}	6531,03 ^a
Fenol-2-metoxo	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Fenol	17,62 ^b	3,99 ^b	4,44 ^b	35,66a ^b	27,52 ^{ab}	23,52 ^b	27,87 ^{ab}
4-vinil-2-metoxifenol	13,63 ^{cd}	72,69 ^{ab}	29,75 ^{bc}	4,22 ^d	14,45 ^{cd}	20,16 ^{cd}	98,68 ^{ab}
Total	5716,41^{abc}	5565,12^{abc}	2424,58^d	4705,07^{abc}	4808,93^{abc}	6274,62^{ab}	10508,15^a

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (P < 0,05).

Tabla 9.15. Evolución de los aldehídos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
Hexanal	28,36 ^c	22,41 ^c	34,53 ^c	76,17 ^{bc}	60,04 ^{bc}	59,04 ^{bc}
Octanal	< LOQ	< LOQ	< LOQ	89,54 ^{ab}	114,33 ^a	134,46 ^a
Nonanal	1302,25 ^b	241,95 ^{cd}	275,57 ^{cd}	2098,96 ^a	1090,71 ^b	1370,28 ^b
Total	1330,61^b	264,36^{cd}	310,10^{cd}	2264,67^a	1265,08^b	1563,78^{ab}

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
Hexanal	45,52 ^c	32,86 ^c	34,81 ^c	212,39 ^a	117,62 ^{ab}	133,61 ^{ab}	191,44 ^a
Octanal	47,11 ^b	< LOQ	< LOQ	138,77 ^a	122,28 ^a	< LOQ	< LOQ
Nonanal	70,61 ^d	740,09 ^c	479,05 ^{cd}	92,72 ^d	1852,20 ^{ab}	2259,55 ^a	1785,37 ^{ab}
Total	163,24^d	772,95^{bc}	513,86^{bc}	443,88^c	2092,10^a	2393,16^a	1976,81^a

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (*P* < 0,05).

Tabla 9.16. Evolución de las cetonas (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
3-octanona	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
6-metil-5-hepten-2-ona	16,81 ^{ab}	< LOQ	< LOQ	16,26 ^{ab}	17,34 ^{ab}	13,37 ^b
2-nonanona	12,52 ^b	< LOQ	< LOQ	6,39 ^b	< LOQ	< LOQ
1-pentiletanona	25,30 ^a	8,44 ^b	23,35 ^a	28,55 ^a	28,58 ^a	33,02 ^a
1-etanona	15,95 ^b	28,35 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Total	70,58^c	36,80^{cd}	23,35^{cd}	51,20^{cd}	45,93^{cd}	132,52^b

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
3-octanona	< LOQ	< LOQ	< LOQ	5,15 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ
6-metil-5-hepten-2-ona	21,73 ^a	18,12 ^{ab}	< LOQ	27,09 ^a	18,85 ^{ab}	17,87 ^{ab}	28,33 ^a
2-nonanona	< LOQ	< LOQ	< LOQ	197,43 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-pentiletanona	18,95 ^a	9,32 ^{ab}	7,61 ^b	25,75 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ
1-etanona	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Total	40,68^{cd}	15,32^{de}	14,23^e	255,42^a	17,87^{de}	28,33^d	14,32^e

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (*P* < 0,05).

Tabla 9.17. Evolución de los terpenos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
α - pinene	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
β - pinene	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Limoneno	975,11 ^{ab}	266,45 ^c	386,16 ^c	791,69 ^b	1226,36 ^a	1032,12 ^a
γ -terpiene	< LOQ	< LOQ	13,53 ^{cd}	< LOQ	< LOQ	24,37 ^{bc}
l- α -terpineol	36,25 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Total	1011,36^a	266,45^b	399,69^b	791,69^{ab}	1226,36^a	1056,49^a

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
α - pinene	39,59 ^a	35,48 ^{ab}	17,26 ^{bc}	37,73 ^{ab}	< LOQ	< LOQ	< LOQ
β - pinene	9,12 ^a	< LOQ	< LOQ	6,24 ^a	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Limoneno	722,50 ^b	479,97 ^{bc}	217,20 ^c	750,00 ^b	773,15 ^b	750,00 ^b	683,71 ^b
γ -terpiene	14,21 ^{cd}	80,13 ^a	5,37 ^d	17,39 ^{cd}	13,19 ^{cd}	15,13 ^{cd}	33,21 ^b
l- α -terpineol	15,26 ^b	< LOQ	< LOQ	11,68 ^{ab}	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Total	800,68^{ab}	595,58^b	239,83^b	823,04^{ab}	786,34^{ab}	765,13^{ab}	716,92^{ab}

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (*P* < 0,05).

Tabla 9.18. Evolución de los ácidos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
<i>Ácidos</i>						
Hexanoico	< LOQ	< LOQ	10,65 ^b	< LOQ	< LOQ	24,96 ^a
Benzoico	36,01 ^{ab}	22,94 ^{bc}	20,68 ^c	41,19 ^a	< LOQ	< LOQ
Butanoico	245,59 ^a	60,09 ^b	< LOQ	41,11 ^b	< LOQ	< LOQ
Total	281,6^a	83,03^b	31,33^c	82,30^b	< LOQ	24,96^c

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
<i>Ácidos</i>							
Hexanoico	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Benzoico	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Butanoico	47,79 ^b	47,22 ^b	3,36 ^c	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Total	47,79^{bc}	47,22^{bc}	3,36^d	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (*P* < 0,05).

Tabla 9.19. Evolución de los furanos, ésteres, diacepinas y alquenos (expresado en base a ng de 2-metil-4-pentanol / mL de horchata) en las horchatas¹ durante su almacenamiento en frío.

Nombre	P1			P2		
	1	14	21	1	14	21
2-pentilfurano	127,12 ^a	65,82 ^b	97,57 ^{ab}	94,80 ^{ab}	< LOQ	< LOQ
Etil Caprilate	110,75 ^a	67,79 ^b	62,62 ^b	50,35 ^{bc}	51,02 ^{bc}	47,49 ^c
11H-Dibenzodiazepina	235,93 ^a	228,52 ^a	260,04 ^a	248,00 ^a	101,35 ^b	108,37 ^b

(continuación)

Nombre	200			300			
	1	14	30	1	14	30	54
2-pentilfurano	< LOQ	< LOQ	70,27 ^b	< LOQ	< LOQ	< LOQ	69,55 ^b
Etil Caprilate	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
11H-Dibenzodiazepina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	54,07 ^c	30,75 ^c	91,16 ^{bc}	125,24 ^b

¹Media del valor de las áreas calculado a partir de tres replicados. ²Cruda: cruda; P1: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s); P2: homogenizada-pasteurizada (80 °C, 15 s) con aditivos (E-339ii + E-331iii, E-472c + E-473); 200: homogenizada a ultra alta presión (200 MPa, T_i = 40 °C); 300: homogenizada a ultra alta presión (300 MPa, T_i = 40 °C). ^{a-c} Valores en la misma fila con diferente superíndice indican diferencias significativas (*P* < 0,05).

9.3. Conclusiones

El método empleado en este estudio para la extracción e identificación de compuestos volátiles se presentó como un método útil para la caracterización del perfil volátil de la horchata de chufa. Las condiciones óptimas de extracción se obtuvieron utilizando la fibra CVB/CAR/PDMS, realizando la extracción a la temperatura de 60 °C, con un volumen de 2 mL de horchata y sin adición de cloruro sódico en la muestra. Bajo estas condiciones, se consiguió identificar 83 componentes diferentes en una horchata de chufa UHT comercial, la mayor parte de los cuales correspondieron a la familia de los terpenos.

En la caracterización del perfil volátil de las horchatas elaboradas y tratadas en este estudio se identificaron un total de 9 compuestos volátiles diferentes. El licuado crudo se caracterizó por las familias de compuestos aldehídos, alcoholes y compuestos aromáticos. Con menor representación, también se identificaron algunos terpenos, cetonas, ácidos, furanos, ésteres y diacepinas. Los tratamientos de pasteurización convencional y UHPH modificaron ligeramente el perfil volátil de las horchatas tratadas, diferenciando también a estos licuados entre sí. Las horchatas pasteurizadas P1 y P2 se caracterizaron por presentar las mayores cantidades de componentes volátiles en las familias aldehídos, alcoholes y compuestos aromáticos, observándose algunas diferencias entre ellas, probablemente debido a la adición de aditivos estabilizantes en el licuado P2. Por el contrario, las horchatas homogenizadas a ultra-alta presión (200 y 300 MPa) presentaron mayores diferencias entre sus respectivos perfiles, ambos caracterizados por cantidades mayores de compuestos volátiles de las familias de alcoholes, terpenos y compuestos aromáticos. Probablemente, el origen de estos compuestos se relacione con las reacciones de degradación de los componentes del producto (oxidación lipídica, Maillard, etc.) principalmente debidas a los efectos de la ultra alta presión de homogenización, incluida la temperatura. Durante la vida útil de todas las horchatas almacenadas en refrigeración (4 °C), el perfil de los licuados se mantuvo en general estable, destacando nuevamente en todas ellas los compuestos pertenecientes a las familias de alcoholes, aldehídos, compuestos aromáticos y terpenos.

Aún así, los contenidos estimados en la mayoría de estos compuestos en todos los licuados fueron muy bajos, por lo que se supone que su repercusión organoléptica en el producto final sería poco destacable, siendo estos productos sensorialmente aceptados por el consumidor. Por todo ello, la tecnología de UHPH se presentaría como alternativa al tratamiento de pasteurización convencional de la horchata de chufa, por lo que al perfil volátil del producto se refiere.

Capítulo 10

Conclusiones

Conclusiones

1. Las características físico-químicas peso, forma, color, composición básica (humedad, grasa, proteína, cenizas, fibra y MELN) y factores antinutricionales (fitatos y taninos) de las chufas son muy variables entre partidas y dependen, en gran parte, de su procedencia geográfica. Las características relacionadas con el perfil proteico de este tubérculo (fracciones proteicas y caracterización de los polipéptidos) son similares entre chufas, definidas por la fracción mayoritaria de las albúminas y la presencia de polipéptidos de un amplio intervalo de pesos moleculares.
2. En el proceso de elaboración de licuado de chufa, y considerando las variables de proceso *proporción chufa:agua* (1:3 - 1:7), *incremento de temperatura del agua de extracción* ($20 \leq T^a \leq 60$ °C), *maceración del producto molturado a diferentes temperaturas* (5 min a $20 \leq T^a \leq 60$ °C) y *reajuste de pH* (pH = 6 y 9), la composición del producto final tan solo depende del estado de hidratación de las chufas y de la proporción chufa:agua que se utilice. La extracción de proteína del tubérculo mejora a partir de chufas hidratadas con un contenido en humedad $\geq 20\%$.
3. Las semillas de mijo que se utilizaron en este estudio se caracterizan por su forma cono-esférica y su alto contenido en MELN y grasa. Su perfil proteico está representado por la fracción de prolaminas, siendo la mayor parte de los polipéptidos de las fracciones aisladas de pesos moleculares inferiores a los 65 kDa. Con la germinación de las semillas de mijo, su contenido en fitatos, taninos e inhibidores de tripsina se reduce notablemente, lo que confirma la efectividad de esta operación en la obtención de mijos mejorados nutricionalmente, para su utilización como ingredientes base en la elaboración de productos derivados.

4. El mijo se presenta como fuente de proteína para la obtención de un licuado de chufa de composición mejorada (sólidos totales, grasa y proteína), aunque el proceso tecnológico de elaboración de este licuado es complejo.
5. Con la aplicación de los tratamientos de homogenización a ultra alta presión a 200 y 300 MPa y a $T_i = 40\text{ }^\circ\text{C}$, se consigue una horchata de chufa microbiológicamente estable durante ~ 30 y ~ 60 días, respectivamente, almacenada en refrigeración (4°C). Este tratamiento mejora la vida útil microbiológica obtenida en el licuado crudo (≤ 3 días) y homogenizado-pasteurizado (18+4 MPa y $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 s) de ~ 25 días.
6. En términos de estabilidad química, el tratamiento a 300 MPa ($T_i = 40\text{ }^\circ\text{C}$) inactiva totalmente la enzima peroxidasa en el producto crudo, no observándose diferencias entre las bebidas homogenizadas-pasteurizadas y la homogenizada a 200 MPa ($T_i = 40\text{ }^\circ\text{C}$), cuya reducción es de $\sim 80\%$. Después de su tratamiento, la horchata homogenizada a 200 MPa es la que presenta un menor contenido de aldehídos totales, indicando una mayor estabilidad oxidativa en este producto.
7. En las horchatas de chufa analizadas se han detectado un total de 39 compuestos volátiles diferentes. El licuado crudo se caracteriza por las familias de compuestos aldehídos, alcoholes y compuestos aromáticos. Los tratamientos de homogenización-pasteurización aumentan la presencia de estos compuestos en el licuado, así como de otros compuestos de las familias de los furanos, cetonas, y ácidos. En comparación con el producto crudo, las horchatas UHPH se caracterizan por el aumento en los compuestos alcoholes, terpenos, compuestos aromáticos y cetonas. Con el tiempo de almacenamiento de los licuados, la cantidad de compuestos volátiles disminuye.
8. La estabilidad coloidal del producto crudo mejora notablemente con la aplicación de los tratamientos de estabilización, siendo el producto más estable el homogenizado a 300 MPa. En todas las horchatas se observan fenómenos de desestabilización por cremado de las gotas de grasa y sedimentación de partículas más densas.

9. La adición de los aditivos estabilizantes E-339ii+E-331iii y E-472+E-473 en la horchata de chufa homogenizada-pasteurizada, y en comparación con su licuado homólogo sin aditivos, produce un licuado de pH más elevado, con mayor contenido en aldehídos totales y de estabilidad coloidal mejorada.

10. Bajo la temperatura de consumo de la horchata (≤ 10 °C) y en comparación con la horchata de chufa cruda, los catadores tan solo detectaron en las horchatas homogenizadas-pasteurizadas y UHPH modificaciones sensoriales moderadas en su color (más blanco) y sabor (menos intenso). A lo largo del tiempo de almacenamiento de los productos en frío, todas las horchatas recibieron una buena aceptación por parte del consumidor.

11. Considerando la evolución de las características físico-químicas y organolépticas de los licuados durante su almacenamiento en refrigeración, la calidad microbiológica de las horchatas de chufa UHPH y homogenizadas-pasteurizadas es la principal determinante de la vida útil del licuado.

12. La tecnología de UHPH se presenta como un tratamiento alternativo al tratamiento de homogenización-pasteurización convencional de la horchata de chufa para la higienización y estabilización del producto, el cual permite obtener un licuado de calidad y sin aditivos estabilizantes añadidos.

Capítulo 11

Bibliografía

Bibliografía

- Abara, A.E. 2011. Proximate and mineral elements composition of the tissue and peel of *Dioscorea bulbifera* tuber. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (6): 543-551.
- Abdalla, A.A., El Tinay, A.H., Mohamed, B.E., y Abdalla, A.H. 1997. Proximate composition, starch, phytate and mineral contents of 10 pearl millet genotypes. *Food Chemistry*, 63 (2): 243-246.
- Abdelrahmann, A., Hosene, R.C., y Varriano-Marston, E. 1984. The proportions and chemical composition of hand-dissected anatomical parts of pearl millet. *Journal of Cereal Science*, 2 (2): 127-133.
- Achouri, A., Boye, J.I., y Zamani, Y. 2006. Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chemistry*, 99 (4): 759-766.
- Addy, E., y Eteshola, E. 1984. Nutritive value of a mixture of tigernut tubers (*Cyperus esculentus* L.) and baobab seeds (*Adansonia digitata* L.). *Science of Food and Agriculture*, 35 (4): 437-440.
- Adejuyitan, J.A. 2011. Tigernut processing: Its food uses and health benefits. *American Journal of Food Technology*, 6 (3): 197-201.
- Adekanmi, O.K., Oluwatooyin O.F., Yemisi, O.A., y Yemisi, A.A. 2009. Influence of processing techniques on the nutrient and antinutrient of tiger nut (*Cyperus esculentus* L.). *Dairy and Food Science*, 4 (2): 88-93.
- Agte, V.V., y Joshi, S.R. 1997. Effect of traditional food processing on phytate degradation in wheat and millets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (5): 1959-1661.
- Akoma, O., Elekwa, U.O., Afodunrinbi, A.T., Onyeukwu G. C. 2000. Yogurt from coconut and tigernuts. *The Journal of Food Technology in Africa*, 5 (4): 132-134.
- Alegría-Torán, A., y Farré-Rovira, R. 2003. Horchata y Salud. Aspectos nutricionales y dietéticos. En: Fundación Valenciana de Estudios Avanzados (ed.). Jornada de Chufa y Horchata: Tradición y Salud. Valencia: Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, p. 55-70.
- Amador-Espejo, G.G., Suárez-Berencia, A., Juan, B., Bárcenas, M.E., y Trujillo, A.J. 2014. Effect of moderate inlet temperatures in ultra-high-pressure

- homogenization treatments on physicochemical and sensory characteristics of milk. *Journal of Dairy Science*, 97 (2): 659-671.
- Anderson, J.W., Baird, P., Davis, R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4): 188-205.
- AOAC-Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17^a ed.). Gaithersburg, Md.: AOAC International.
- Arafat, S.M., Gaafar, A.M., Basuny, A.M., y Nassef, S.L. 2009. Chufa tubers (*Cyperus esculentus* L.): as a new source of food. *World Applied Sciences Journal*, 7 (2): 151-156.
- Arranz-Santamarta, A., Gasco-Moreno, R., Periz-Pastor, R., y Coma-Beneito, J.M. 1996. Hygiene education and the microbiological quality of horchata. *Alimentaria*, 275: 127-132.
- Augusto, P. E.D., Ibarz, A., y Cristianini, M. 2013. Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Creep and recovery behaviours. *Food Research International*, 54 (1): 169-176.
- Badui, S. 2006. *Química de los Alimentos*. (4^a ed.). México: Pearson Educación.
- Barminas, J.T., Maina, H.M., Tahir, S., Kubmarawa, D., y Tsware, K. 2001. A preliminary investigation into the biodiesel characteristics of tigernut (*Cyperus esculentus*) oil. *Bioresource Technology*, 79 (1): 87-89.
- Baryeh, E.A., 2002. Physical properties of millet. *Journal of Food Engineering*, 51 (1):39-46.
- Beleia, E.A., Varriano-Marston, E., y Hosenev, R.C. 1980. Characterization of starch from pearl millets. *Cereal Chemistry*, 57 (5): 300-303.
- Belewu, M.A., Orisameyiti, B.R., y Ajibola, K.A. 2007. Effect of feeding graded levels of tigernut (*Cyperus esculentus*) seed meal on the performance characteristics of West African dwarf goat. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6 (6): 528-529.
- Bernardino-Nicanor, A., Scilingo, A.A., Añón, M.C., y Dávila-Ortíz, G., 2006. Guava seed storage protein: Fractionation and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 39 (8), 902-910.
- Bixquert, M. 2006. *La horchata de Chufa: Propiedades Saludables y de Prevención de Enfermedades Digestivas*. Valencia: Servicio de Patología y Digestivo del Hospital Arnau de Vilanova. Disponible en: <http://www.chufadevalencia.org/bd/archivos/archivo52.pdf>
- Borges, O., Gonçalves, B., de Carvalho, J.L.S., Correia, P., y Silva, A.P., 2008. Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chemistry*, 106 (3), 976-984.

- Bosch, L., Alegria, A., y Farrre, R. 2005. RP-HPLC determination of tiger nut and orgeat amino acid contents. 2005. *Food Science & Technology International*, 11 (1): 33-40.
- Briñez, W.J., Roig-Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M., y Guamis, B. 2007. Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenization at inlet temperature of 6 and 20 °C. *Food Control*, 18 (10), 1282-1288.
- Butler, L.G., Riedl, D.J., Lebryk, D.G., y Blytt, H.J. 1984. Interaction of proteins with sorghum tannin: Mechanism, specificity and significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61 (5): 916-920
- Calligaris, S., Foschia, M., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., y Manzocco, L. 2012. Study on the applicability of high-pressure homogenization for the production of banana juices. *LWT-Food Science and Technology*, 45 (1), 117-121.
- Câmara, J.S., Alves, M.A., Marques y J.C. 2006. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Analytica Chimica Acta* 555, 191–200.
- Camarasu, C.C. 2000. Headspace SPME method development for the analysis of volatile polar residual solvents by GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23: 197-210.
- Cantalejo, M. J. 1996. Development of new products from earth-almond. *Fruit Processing*, 6 (3): 87-91.
- Cantalejo, M.J. 1997. Analysis of volatile components derived from raw and roasted earth-almond (*Cyperus esculentus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45 (5): 1853-1860.
- Cavanilles, A.J. 1795-1797. *Observaciones sobre la Historia Natural, Geografía y Agricultura, Población y Frutos del Reyno de Valencia*. Vol. I, Madrid: Imprenta Real. Disponible en: http://bv2.gva.es/consulta/resultados_navegacion.cmd?id=27248&posicion=20&forma=ficha
- Contarini, G., Povolò, M., Leardi, R., Toppino, P.M. 1997. Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45 (8): 3171-3177.
- Chandna, M., y Matta, N.K. 1990. Characterization of pearl millet protein fractions. *Phytochemistry*, 29 (11): 2295-3399.
- Chandrasekher, D.G., Raju, S., y Pattabiraman, T.N. 1982. Natural plant enzyme inhibitors. Protease inhibitors in millet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(5): 447-450.
- Chinma, C.E., Adewuyi, O., y Abu, J.O., 2009. Effect of germination on the chemical, functional and pasting properties of flour from brown and yellow varieties of tigernut (*Cyperus esculentus*). *Food Research International*, 42 (8), 1004–1009.

- Chukwuma E.R., Obioma, N., y Christopher, O.I. 2010. The phytochemical composition and some biochemical effects of Nigerian tigernut (*Cyperus esculentus* L.) tuber. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (7): 709-715.
- Corrales, M., de Souza, P.M., Stahl, M.R., y Fernández, A. 2012. Effects of the decontamination of a fresh tiger nuts' milk beverage (horchata) with short wave ultraviolet treatments (UV-C) on quality attributes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13: 163-168.
- Cortés, C. 2007. Estudio de parámetros nutritivos y de calidad en alimentos líquidos de origen vegetal procesados por tecnologías no térmicas. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Cortés, C., Esteve, M.J., Frigola, A., y Torregrosa, F. 2004. Physical and chemical properties of different commercially available types of 'horchata de chufa'. *Italian Journal of Food Science*, 16 (1): 113-121.
- Cortés, C., Esteve, M.J., Frígola, A., y Torregrosa, F. 2005. Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life. *Food Chemistry*, 91(2): 319-325.
- Cortés-Muñoz, M., Chevalier-Lucia, D., y Dumay, E. 2009. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage. *Food Hydrocolloids*, 23 (3): 640-645.
- Coşkuner, Y., Ercan, R., Karababa, E., y Nazlican, A.N., 2002. Physical and chemical properties of chufa (*Cyperus esculentus* L) tubers grown in the Çukurova region of Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (6), 625-631.
- CRCHV: Consejo Regulador de la Denominación de Origen Chufa de Valencia. 2014. Disponible en: www.chufadevalencia.org.
- Cruz, N. 2008. Efecto de la Ultra Alta Presión de Homogenización en licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., y Ferragut, V. 2007. Ultra high pressure homogenization of soymilk: microbiological, physicochemical and microestructural characteristics. *Food Research International*, 40 (6): 725-732.
- Dagleish, D.G., Tosh, S.M., y West, S. 1996. Beyond homogenization: The formation of very small emulsion droplets during the processing of milk by a microfluidizer. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50 (2): 135-148.
- Datta, N., Hayes, M.G., Deeth, H.C., y Kelly, A.L. 2005. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenization on milk. *Journal of Dairy Research*, 72 (4): 393-399.
- Desrumaux, A., y Marcand, J. 2002. Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins wit high-pressure homogenization (up to 350 MPa): effect of

- pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (3): 263-269.
- Diels, A.M.J., Callewaert, L., Wuytack, E.Y., Masschalck, B., y Michiels, C.W. 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress*, 20 (5): 1512-1517.
- Diels, A.J., Callewaert, L., Wuytack, E.Y., Masschalck, B., y Michiels, C.W., 2005. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (3): 281-291.
- Diels, A.M.J., y Michiels, C.W. 2006. High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 32 (4): 201-216.
- Djomdi, Ejoh, R., y Ndjouenkeu, R. 2007. Soaking behaviour and milky extraction performance of tiger nut (*Cyperus esculentus*) tubers. *Journal of Food Engineering*, 78 (2): 546-550.
- Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolicc, P. Vasiljevic, T. y Shah, N.P. 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17(6): 657-665.
- Donsí, F., Ferrari, G., y Maresca, P. 2009. High-pressure homogenization for food sanitization. In G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle y P. Colonna (eds). *Global Issues in Food Science and Technology New York*: Academic Press, p. 309-352.
- Donsí, F., Annunziata, M., y Ferrari, G. 2013. Microbial inactivation by high pressure homogenization: effect of the disruption valve geometry. *Journal of Food Engineering*, 115 (3): 362-370.
- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., y Parmentier, M., 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (7), 710–732.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., y Blayo, C. 2012. Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31 (1):13-26.
- Ejeta, G., Hassen, M.M., y Mertz, E.T. 1987. In vitro digestibility and amino acid composition of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and other cereals. *Applied Biology*, 84 (17): 6016-6019.
- Ejoh, R.A., Djomdi, Ndjouenkeu, R. 2006. Characteristics of tigernut (*Cyperus esculentus*) tubers and their performance in the production of a milk drink. *Journal of food Processing and Preservation*, 30 (2): 145-163.
- España, 1988. Real Decreto 1338/1988, de 28 de octubre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de horchata de

- chufa. *Boletín Oficial del Estado*, de 10 de noviembre de 1988, núm. 270, pp. 32069-32073. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/1988/11/10/pdfs/A32069-32073.pdf>
- España. 1991. Real Decreto 1410/1991, de 27 de septiembre, por el que se modifica la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de horchatas de chufa, aprobada por el Real Decreto 1338/1988, de 28 de octubre. *Boletín Oficial del Estado*, 4 de octubre de 1991, núm. 238 pp 32282-32283. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/1991/10/04/pdfs/A32282-32283.pdf>
- España, 2003. Real Decreto 140/2003 del 7 de febrero de 2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de calidad del agua de consumo humano. *Boletín Oficial del Estado*, 21 de febrero de 2003, núm 45, pp.7228-7245. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>
- Espert, C., Bosch, M.J., Hernández, E., y Hernández-Haba, J. 1990. A comparative study of some chemicals and bacteriological aspects of natural and pasteurized horchata. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 8 (4): 371-375.
- Falade, K.O. y Kolawole, T.A. 2013. Effect of γ -Irradiation on Colour, Functional and Physicochemical Properties of Pearl Millet [*Pennisetum glaucum* (L) R. Br] Cultivars. *Food Bioprocess Technology*, 6 (9):2429-2438
- Farran, A., Zamora, R., y Cervera, P. 2004. Tablas de composición de alimentos del CESNID. Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona.
- Fennema, O.R. 1993. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.
- Floury, J., Desrumaux, A., y Lardières, J. 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1 (2): 127-134.
- Floury, J., Desrumaux, A., y Legrand, J. 2002. Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 67 (9): 3388-3395.
- Floury, J., Bellettre, J. Legrand, J., y Desrumaux, A. 2004a. Analysis of a new type of high pressure homogenizer. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*, 59 (4): 843 – 853.
- Floury, J. Legrand, J., y Desrumaux, A. 2004b. Analysis of new type of high pressure homogenizer. Part B. Study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*. 59 (6): 1285-1294.
- Fukushima, D. 2001. Recent progress in re-search and technology on soybeans. *Food Science and Technology Research*, 7: 323-352.
- Gallart, J. 1999. Guía para la aplicación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en industrias elaboradoras de horchata de chufa natural. Valencia: Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat.

- Galliard, T., 1971. The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers. *European Journal of Biochemistry*, 121 (3), 379–90.
- Goristein, S., Yamagata, S., y Hadziyev, D. 1988. Electrophoretic separation of proteins and their amino acid composition in raw and processed potatoes. *Journal of Food Sciences*, 12 (1), 37-50.
- Guichard, E. 2000. COST Action 96: interaction of food matrix with small ligands influencing flavor and texture. *Food Research International*, 33: 187-190.
- Gulewicz, P., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Ciesiolka, D., Gulewicz, K., y Vidal-Valverde, C. 2008. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry*, 107 (2): 830-844.
- Hashim, L. y Chaveron, H. 1995. *Isolation and identification of off-flavor components from soy milk*. In *Developments in Food Science*. France: Elsevier.
- Haugh, W., y Lantzsch, H.J. 1983. Sensitive method for the determination of phytate in cereals and cereals products. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 34 (12): 1423-1426.
- Hayes, M.G., y Kelly, A.L. 2003a. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) Effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70 (3): 297-305.
- Hayes, M.G., y Kelly, A.L. 2003b. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research*, 70 (3): 307– 313.
- Hayes, M.G., Fox, P.F., y Kelly, A.L. 2005. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research*, 72 (1): 25-33.
- Hebshy, E.H. 2013. Application of ultra high-pressure homogenization (UHPH) in the production of submicron/nano-oil-in-water emulsions using vegetable oils and milk proteins as emulsifiers. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, V., Frias, J., y Gorecki, R. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und – Forschung*, 206 (4): 279-289.
- Horak, M.J., Holt, J.S. y Ellstrand, N.C. 1987. Genetic variation in yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*). *Weed Science*, 35: 506-512.
- Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W., y Lin, Y.H., 2001. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10), 4956–60.
- Hulse, J.H., Laing, E.M., y Pearson, O.E. 1980. *Sorghum and the Millets: their Composition and Nutritive Value*. New York: Academic Press.

- Hunter, J.E., 2001. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* 36 (7), 655–68.
- ICMSF. 1999. *Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza: Acribia.
- IDF 21B: 1987. *Milk, Cream and Evaporated Milk : Determination of Total Solids Content (Reference Method)*.
- ISO 2446:1976. *Milk-Determination of fat content (Routine method)*.
- ISO 9648-1988. . *Sorghum – Determination of Tannin Content*.
- ISO 14981- IDF 185: 2002 Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle.
- Iucci, L., Patrignani, F., Vallivelli, M., Guerzoni, M.E., y Lanciotti, R. 2007. Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18 (5): 558-565.
- Jain, P.K., y Bal, S. 1997. Properties of Pearl Millet. *Journal of Agriculture Engineering Research*, 66(2): 85-91.
- Jood, S., Chauhan, B.M., y Kapoor, A.C. 1987. Polyphenols of chickpea and blackgram as affected by domestic processing and cooking methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39 (2): 145-149.
- Jorcín, S., Guamis, B., y López. T. 2012. Influencia de la aplicación de ultra alta presión de homogenización (UAPH) y de la $[Ca^{++}]$ en la estabilidad de la leche de arroz. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*, 7:16-20.
- Haug, W., y Lantzsch, H-J. 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereals products. *Journal of Science Food and Agriculture*, 34 (12): 1423-1426.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.E., y Puski, G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51 (3): 376-381.
- Karababa, E., Coskuner, Y., y Nazlican, A. N. 2001. Chemical composition and technological evaluation of chufa tuber (*Cyperus esculentus L.*). *Gida*, 26 (4): 243-246.
- Kasaoka, S., Oh-Sashi., A., Morita, T., y Kiriyaama, S. 1999. Nutritional characterization of millet protein concentrates produced by heat stable α -amylase digestion. *Nutrition Research*, 19 (6): 899-910.
- Khantisophon, N., Montet, D., Loiseau, G., Rakshit, S.K., Stevens, W.F., y Ray, C. 2007. Formulation of a nutritional cassava (*Manihot esculenta crantz*) starch-based beverage. *Acta Alimentaria*, 36 : 355-364.

- Kheadr, E.E., Vachon, J.F., Paquin, P., y Fliss, I. 2002. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 12(5): 435 – 446.
- Kim, M., No, S., y Yoon, S.H., 2007. Stereospecific Analysis of Fatty Acid Composition of Chufa (*Cyperus esculentus* L.) Tuber Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84 (11), 1079-1080.
- Kleinig, A.R., y Middelberg, A.J. 1998. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenization. *Chemical Engineering Science*. 53 (5): 891 – 898.
- Kubo, M.T.K., Augusto, P.E.D., y Cristianini, M. 2013. Effect of high pressure homogenization (HPH) on the physical stability of tomato juice. *Food Research International*, 51 (1): 170-179.
- Laemmly, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lafuente, B., Gasque, F., Piñaga, F. y Vila Aguilar, R. 1985. *La Horchata de Chufas: Higienización, Estabilización y Tipificación*. Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Iucci, L., Vallicelli, M., Ndagijimana, M. y Guerzoni, M.E. 2006. Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. *Journal of Dairy Research*, 73 (2): 216 – 226.
- Lasekan, O., y Abdulkarim-Sabo, M. 2012. Extraction of oil from tiger nut (*Cyperus esculentus* L) with supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). *LWT-Food Science and Technology*, 47 (2): 287-292.
- Lee, H., Kizito, S., Weese, S., Craig-Schmidt, M., Lee, Y., Wei, C.I. y An, H. 2003. Analysis of headspace volatile and oxidized volatile compounds in DHA-enriched fish oil on accelerated oxidative storage. *Journal of Food Science*, 68:2169-77.
- Lestienne, I., Icard-Vernière, C., Mouquet, C., Picq, C., y Trèche, S. 2005. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry*, 89 (3): 421- 425.
- Lestienne, I., Buisson, M., Lullien-Pellerin, V., Picq, C., y Trèche, S. 2007. Losses of nutrients and anti-nutritional factors during abrasive decortication of two pearl millet cultivars (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry*, 100: 1316-1323.
- Li, Cui, Chun-quan, L. y Da-jing, Li. 2010. Changes in volatile compounds of sweet potato tips during fermentation. *Agricultural Sciences in China*, 9 (11):1689-1695.

- Linssen, J.P.H., Kielman, G.M., Cozijnsen, J.L., y Pilnik, W., 1988. Comparison of chufa and olive oils. *Food Chemistry*, 28 (4): 279–285.
- Linssen, J.P.H., Cozijnsen, J.L., Pilnik, W. 1989. Chufa (*Cyperus esculentus* L.): a new source of dietary fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49 (3): 291 – 296.
- Liu, K. 1999. *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc., p. 532.
- Lo, W.Y., Steinkraus, K.H., Hand, D.B., Hackler, L.R., y Wilkens, W.F. 1968. Soaking soybeans before extraction as it affects chemical composition and yield of soymilk. *Food Technology*, 33, (9): 1188-1190)
- Lombardo, S., Pandino, G., y Mauromicale, G. 2012. Nutritional and sensory characteristics of “early” potato cultivars under organic and conventional cultivation systems. *Food Chemistry*, 133 (4), 1249-1254.
- Longobardi, F., Casiello, G., Sacco, D., Tedone, L. y Sacco, A. 2011. Characterisation of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analices. *Food Chemistry*, 124:1708-1713.
- López-Cortés, I., Salazar-García, D.C., Malheiro, R., Guardiola, V., y Pereira, J.A., 2013. Chemometrics as a tool to discriminate geographical origin of *Cyperus esculentus* L. based on chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 51, 19–25.
- Lozano, P.R., Drake, M., Benitez, D. y Cadwallader, K.R. 2007. Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3018-3026.
- Maeshima, M., Sasaki, T., y Asahi, T., 1985. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. *Phytochemistry*, 24 (9):1899-1902.
- Maivesa, H.A., Cardoso De Oliveiraa, D., Bernardo, C., De Oliveira Müller, E. y Amante, E.R. 2012. Microscopy and Texture of raw and cooked cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) roots. *Journal of Texture Studies*, 43: 164-173.
- Mazza, G. y Pietrazak, E.M. 1990. Headspace volatiles and sensory characteristics of earthy, musty flavoured potatoes. *Food Chemistry*, 36:97-112
- Mbithi-Mwikya, S., Van Camp, J., Yiru, Y., y Huyghebaert, A. 2000. Nutrient and antinutrient changes in Finger Millet (*Eleusine Coracana*) during sprouting. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie*, 33 (1): 9-14.
- McClements, D.J. 2005. *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- McDonough, C. , Rooney, L.W. y Serna-Saldívar, S.O. 2002 (2ª ed.). The Millets. En K.Kulp y J.Ponte. (eds.) *Handbook of Cereal Science and Technology*. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Middelberg, A.P.J. 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13 (3): 491-551.
- Monerris, C., Munto, S., Camara, M.D., Ramon, J.H., y Garcia-Abad, M.T. 1999. Effects of storage time on microbiological quality of natural horchata de chufa. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 18 (4): 127-130.
- Monerris, C., Moscardó, G., Moreno, P., Fagoaga, F., Pérez, N., Gisbert, B., Murtó, S., y Blanquer, C.. 2001. Educación Sanitaria y calidad microbiológica de la horchata de chufa natural. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 20 (158): 87 – 93.
- Monerris-Aparisi, C., Varo Galvan, P., y Beneyto Castello, H. 1998. Determination of pH in raw horchata. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 17 (4): 65-67.
- Monerris-Aparisi, C. 2000. Influencia del tiempo de rehidratación en la calidad microbiológica de la chufa como materia prima para la elaboración de horchata natural. *Alimentaria*, 37 (315): 73-75.
- Monte-Neshich, D.C., Rocha, T.L., Guimarães, R.L., Santana, E.F., Loureiro, M.E., Valle, M., y Grossi de Sá, M.F., 1995. Characterization and spatial localization of the major globulin families of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) tubers. *Plant Science*, 112 (2), 149–15
- Moody, J.O., Gundidza, M. y Wyllie, G. 2006. Essential oil composition of *Leucas milanjiana* Guerke. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 872-874.
- Morell, J., y Barber, S. 1983. Chufa y Horchata: Características Físicas, Químicas y Nutritivas. Valencia: C.S.I.C. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.
- Moreno, P., Pla, S., Monerris, C., Pérez, N., Moscardó, G., y del Aguila, M. 2000. Influencia del tiempo de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de la horchata. *Alimentaria*, 37: 133-136.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J., y Fliss, I. 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic pressure. *International Dairy Journal*, 12 (11): 907 – 913.
- Morris, W.L., Shepherd, T., Verrall, S.R. McNicol, J.W. y Taylor, M.A. 2010. Relationships between volatile and non-volatile metabolites and attributes of processed potato flavour. *Phytochemistry* 71, 1765-1773.
- Mugocha, P.T., Taylor, J.R.N., y Bester, B.H. 2000. Fermentation of a composite finger millet-dairy beverage. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16 (4): 341–344.
- Muralikrishna, G., Malleshi, N.G., Desikachar, H.S.R., y Tharanathan, R.N. 1986. Effect of popping on the properties of some millet starches. *Starch/Stärke*, 38 (2), 48-51.

- Nadir, A.S., y Helmy, I.M.F. 2004. Fortification of horchata drink prepared from chufa tubers (*Cyperus esculentus* L.) with natural fruit juices. *Egyptian Journal of Food Science*, 31 (1/2): 153 – 178.
- Nagai, T., y Nagashima, T., 2006. Functional properties of dioscorin, a soluble viscous protein from Japanese yam (*Dioscorea opposita* thunb.) tuber mucilage Tororo. *Z. Naturforsch C.*, 61, 792–8.
- Navarro, J.L., Schwartz, M., Gasque, F., Alberola, J., Pérez, E., y Lafuente, B. 1984. Effect of harvesting dates of ‘chufa’ tubers (*Cyperus esculentus* L.) on the composition of ‘hochata’ beverage. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 24 (2): 199-208.
- Nielsen, S.S. 2008. Análisis de los alimentos. Editorial Acribia, S.A.
- Nithya, K.S., Ramachandramurthy, B. y Krishnamoorthy, V.V. 2006. Assessment of Anti-Nutritional Factors, Minerals and Enzymes Activities of the Traditional (Co7) and Hybrid (Cohcu-8) Pear Millet (*Pennisetum glaucum*) as Influenced by Different Processing Methods. *Journal of Applied Sciences Research*, 2 (12): 1164-1168.
- Oderinde, R.A. y Tairu, A.O. 1992. Determination of the triglyceride, phospholipid and unsaponifiable fractions of yellow nutsedge tuber oil. *Food Chemistry*, 45 (4): 279-282.
- Okafor J.N.C., Mord,i J.I., Ozumba, A.U., Solomon, H.M., y Olatunji, O. (2003). Preliminary studies on the characterization of contaminants in tigernut (Yellow variety). En: *Proceedings of 27th annual Nigerian Institute of Food Science and Technology (NIFST) Conference*.13-17 October, 2003. p. 210-211.
- Okladnikov-Yu, N., Vorkel-Ya, B., Trubachev, I. N., Vlasova, N. V., y Kalacheva, G. S. 1977. The introduction of chufa into the human diet as a source of polyunsaturated fatty acids. *Voprosy Pitaniya*, 3: 45-48.
- Oladele, A.K., y Aina, J.O. 2007. Chemical composition and functional properties of flour produced from two varieties of tigernut (*Cyperus esculentus*). *African Journal of Biotechnology*, 6 (21): 2473-2476.
- Omode, A.A., Fatoki, O.S. y Olaogun, K.A. 1995. Physicochemical properties of some underexploited and nonconventional oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (11):2850-2853.
- Opoku, A.R., Ohenhen, S.O.,y Ejiofor, N. 1981. Nutrient Composition of Millet (*pennisetum typhoides*) grains and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29 (6): 1247-1248.
- Osborne, T.B. 1924. *The Vegetable Proteins* (2nd ed). London: Longmans Green and Co.
- Osborne T.B., y Mendel LB. 1914. Nutritive properties of the maize kernel. *The Journal of Biological Chemistry*, 18: 1-16.

- Osman MA. 2011. Effect of traditional fermentation process on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet during preparation of lohoh. *J Saudi Soc Agric Sci* **10**:1–6.
- Paquin, P. 1999. Technological properties of high pressure homogenizers: The effect of fat globules, milk proteins and polysaccharides. *International Dairy Journal*, 9 (3-6): 329-335.
- Parameswaran, K.P., y Thayumanavan, B. 1997. Isolation and characterization of a 20 kDa prolamin from kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) (L.): Homology with other millets and cereals. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50 (4): 359-373.
- Park, W.D., Blackwood, C., Mignery, G.A., Hermodson, M.A., y Lister, R.M., 1983. Analysis of the Heterogeneity of the 40,000 Molecular Weight Tuber Glycoprotein of Potatoes by Immunological Methods and by NH₂-Terminal Sequence Analysis. *Plant Physiology*, 71 (1): 156-160.
- Partrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S.L., Lanciotti, R., y Guerzoni, M.E. 2009. Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology*, 136 (1): 26-31.
- Pelleg, M. 1988. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, 53 (4): 1216-1217
- Pereda, J. 2008. Utilización de la Ultra Alta Presión por Homogenización como alternativa al tratamiento de pasteurización para la obtención de leche de consumo. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B., y Trujillo, A.J., 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf-life of milk. *Journal of Dairy Science*, 90 (3): 1081-1093.
- Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., y Trujillo, A.J. 2008. Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 111 (3): 696-702.
- Pérez Melero, D., Arranz, A., Beneyto, H., y Soler, R. 1993. Study of hygiene in horchata. Application of analysis and identification of critical control points. *Alimentaria*, 240: 25-29.
- Pla, S., Moreno, P., Moneris, C., Rodríguez, M.C, y Pérez, N. 1999. Estudio comparativo de la calidad bacteriológica de horchatas en industrias de transformación y puntos de venta en las áreas de salud de Alcoi y Xativa. *Alimentaria*, 36: 91-95.
- Plutowska, B., y Wardencki, W. 2007. Aromagrams-Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101 (2): 845-872.
- Picart, L., Thiebaut, M., René, M., Guiraud, J.P., Cheftel, J.C., y Dumay, E. 2006. Effects of high pressure homogenization of raw bovine milk on alkaline

- phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research*, 73(4):454-63.
- Poliseli-Scopel, F.H. 2012. Study of the Ultra high pressure homogenization (UHPH) technology for producing high quality soymilk. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Poliseli-Scopel, F.H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., Ferragut, V. 2012. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *Food Science and Technology*, 46 (1): 42-48.
- Poliseli-Scopel, F.H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., y Ferragut, V. 2013a. Characteristics of soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization (UHPH). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20: 73-80.
- Poliseli-Scopel, F.H., Gallardo-Chacón, J.J., Juan, B., Guamis, B., Ferragut, V. 2013b. Characterisation of volatile profile in soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Food Chemistry*, 141 (3): 2541-2548.
- Poliseli-Scopel, F.H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., y Ferragut, V. 2014. Sterilization and aseptic packaging of soymilk treated by ultra high pressure homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22: 81-88.
- Pooper, L., y Knorr, D. 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, 44 (7): 84-89.
- Prosen, H. y Zupancic-kralj, L. 1999. Solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (4): 272-282.
- Racusen, D., y Foote, M., 1980. A Major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Food Biochemistry*, 4 (1), 43-52.
- Ramachandra, G., Virupaksha, T.K., y Shadakdharaswamy, M. 1978. Comparison of the protein fractions of finger millet. *Phytochemistry*, 17 (9): 1487-1490.
- Ramos-Herrero, J. 2012. Establecimiento del cultivo in vitro de la chufa de valencia (*Cyperus esculentus* L. Var. *Sativus* Boeck). Desarrollo de un protocolo de micropropagación. Proyecto de Fin de Máster en mejora genética vegetal. Universitat Politècnica de València.
- Rathi, A., Kawatra, A., y Sehgal, S. 2004. Influence of depigmentation of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) on sensory attributes, nutrient composition, in vitro protein and starch digestibility of pasta. *Food Chemistry*, 85 (2): 275-280.
- Ravindran, G. 1992. Seed proteins of millets: amino acid composition, proteinase inhibitors and *in vitro* digestibility. *Food Chemistry*, 44 (1): 13-17.
- Sánchez-Zapata, E., Fuentes-Zaragoza, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas, E., y Pérez-Alvarez, J.A., 2010. Reclaim of the By-Products from "Horchata" Elaboration Process. *Food and Bioprocess Technology*. 5 (3) 954-963.

- Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., y Pérez-Álvarez, J.A. 2012. Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) Commercialization: Health aspects, composition, properties, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4): 366-377.
- Sánchez-Zapata, E., Zunino, V., Pérez-Alvarez, J.A., y Fernández-López, J. 2013. Effect of tiger nut fibre addition on the quality and safety of dry-cured pork sausage (“Chorizo”) during the dry-curing process. *Meat Science*, 95 (3): 562-568.
- Saldo, J., Suárez-Jacobo, A., Gervilla, R., Guamis, B., y Roig-Sagués, A. 2009. Use of ultra-high-pressure homogenization to preserve apple juice without heat damage. *International Journal of High Pressure Research*, 29 (1): 52-56.
- Scher, C.F., de Oliveira Rios, A., y Noreña, C.P.Z., 2009. Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. *International Journal of Food Science & Technology*, 44 (11), 2169-2175.
- Shewry, P.R. 2003. Tuber Storage Proteins. *Annals of Botany*, 91, 755-769.
- Selma, M.V., Valero, M., Fernández, P.S., y Salmerón, C. 2002. Application of HACCP in microbiological quality assurance of horchata de chufa. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 21 (165): 83-89.
- Siegmund, B. y Murkovic. M. 2004. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 2: volatile compounds). *Journal of Food Chemistry*, 84:367-374.
- Simwemba, Sh.G., Hosney, R.C., Varriano-Marston, E., y Zeleznak, K. 1984. Certain B vitamin and phytic acid content of pearl millet (*pennisetum americanum* (L.) Leeke). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 32 (1): 31-34.
- Temple, J.V., Ojobe, T.O., y Dapu, M.M. 1990. Chemical analysis of tiger nut (*Cyperus esculentus*). *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 50 (2):261-263.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Guiraud, J.P., y Cheftel, J.C. 2003. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13 (6): 427-439.
- Sandra, S., y Dalgleish, D.G. 2005. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. *International Dairy Journal*, 15 (11): 1095-1104.
- Schwartz, M., Vila R., Gasque, F., Navarro, J.L., y Lafuente, B. 1982. Heat stabilization of horchata beverage obtained from chufa tubers (*Cyperus esculentus*, L.). *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 22 (4): 531-538.
- Schwartz, M., Costell, E., y Gasque, F. 1984. Effects of stabilizaing treatments on the colour and viscosity of the extract from “chufa” (*Cyperus esculentus* L.) tubers. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 24 (2): 271-277.

- Schwartz, M., Gasque, F., Montesinos, M., y Lafuente, B. 1986. Secado por atomización de la horchata de chufa (*Cyperus Esculentus*, L.). Efecto de las condiciones de proceso sobre la calidad del producto. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 26 (1): 81-89.
- Serra, M., Trujillo, A.J., Guamis, B., y Ferragut, V. 2009. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*, 23 (1): 82-91.
- Shaw, L.A., McClements, D.J., y Decker, E.A. 2007. Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for w-3 fatty acids into food systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (8): 3112-3119.
- Spivallo, R., Novero, M., Berteà, C., Bossi, S. y Bonfante, P. 2007. Truffle volátiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 175: 417-424.
- Suárez-Jacobo, A. 2011. Study of the application of ultra-high pressure homogenization (UHPH) treatments in apple juice. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Suárez-Jacobo, A., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., y Saldo, J. 2010. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: a preliminary study of microbial shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 36 (3): 261-267.
- Suárez-Jacobo, A., Rüfer, C.E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., y Saldo, J. 2011. Influence of ultra-high pressure homogenization on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, 127 (2): 447-454.
- Suárez-Jacobo, A., Saldo, J., Rüfer, C.E., Guamis, G., Roig-Sagués, A.X., y Gervilla R. 2012. Aseptically packaged UHPH-treated apple juice: Safety and quality parameters during storage. *Journal of Food Engineering*, 109 (2): 291-300.
- Taylor, J.R.N. 2004. Millet: pearl. En C. Wrigley, H. Corke, H., y C.E Walker (eds.) *Encyclopedia of Grain Science*, Vol 2. Amsterdam: Elsevier, p. 253–261.
- Taylor, J.R.N., y Naushad, M. 2008. Gluten-free foods and beverages from millets. En E. K. Arendt y F. Del Bello (eds.). *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. London: Academic Press, p. 119-148.
- Temple, J.V., Ojobe, T.O., y Dapu, M.M. 1990. Chemical analysis of tiger nut (*Cyperus esculentus*). *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 50 (2):261-263.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P., y Cheftel, J.C. 2003. High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13 (6): 427-439.
- Tigernuts Traders S.L. 2014. Disponible en: www.tigernuts.com

- Turhan, M., Sayar, S., y Gunasekaran, S. 2002. Application of Peleg model to study water absorption in chickpea during soaking. *Journal of Food Engineering*, 53 (2): 153-159.
- Umerie, S.C., y Enebeli, J.N. 1996. Malt caramel from tubers of *Cyperus esculentus*. *Bioresource Technology*, 57 (2): 215-216.
- Umerie, S.C., Obi, A.N. y Okafor, E.O. 1997. Isolation and characterization of starch from *Cyperus esculentus* tubers. *Bioresource Technology*, 62 (1-2): 63-65.
- Vachon, J.F., Kheadr, E.E., Giasson, J., Paquin, P., y Fliss, I. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65 (2): 345-352.
- Valencia-Flores, D.C., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., y Ferragut, V. 2013. Comparing the effects of ultra-high-pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of almond beverages. *Journal of Food Science*, 78 (2): 199-205.
- Valls, C., Díaz A., y Torija, M.E., 1980. Mineral elements in the tubers of *Cyperus esculentus* (chufa). *Anales de Bromatología*, 32 (2): 139-144.
- Van Koningsveld, G.A., Walstra, P., Gruppen, H., Wijngaards, G., van Boekel, M.A.J.S., y Voragen, A.G.J., 2002. Formation and stability of foam made with various potato protein preparations. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50 (26): 7651-7659.
- Van Koningsveld, G.A., Walstra, P., Voragen, A.G.J., Kuijpers, I.J., van Boekel, M.A.J.S., y Gruppen, H., 2006. Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 (17): 6419-6427.
- Van Wyk, B.E. 2011. The potential of South African plants in the development of new food and beverage products. *South African Journal of Botany*, 77 (4): 857-868.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., y Guerzoni, M.E. 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (2): 123-135.
- Varriano-Marston, E., y Hosney, R.C. 1979. Note on mineral content and location in pearl millet. *Cereal Chemistry*, 57 (2): 150-152.
- Varo-Galvan, P., Company, R., y Guillem, C. 1998. Composición nutricional básica de la horchata de chufa natural. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 17 (8): 107-110.
- Velázquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., Gervilla-Fernández, R., Guamis-López, B., Roig-Sagués, A.X. 2008. Effect of ultra high pressure homogenisation (UHPH) on the microbiological and chemical characteristics of orange juice. 46th EFPRG Conference, Spain. p.73

- Velázquez-Estrada, R.M., Hernández-Herrero, M.M., López-Pedemonte, T.J., Briñez-Zambrano, W.J., Guamis-López, B., y Roig-Sagués, A.X. 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric* serovar Senftenberg 775 W inoculated into fruit juice by means of ultra high pressure homogenization. *Food control*, 22 (2): 313-317.
- Vila, R., Hernández, E., y Legorburo, M.B. 1970. Bacterial decontamination of 'horchata de chufas' by pretreatment of tubers. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 10 (1): 117-124.
- Virveda, J.R., y Virveda, P. 1997, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrónoma de Pamplona, Pamplona, España. Estudio microbiológico de la horchata elaborada en el municipio de Alboraya (Valencia). *Alimentación Equipos y Tecnología*, 16 (4): 83-86.
- Waglay, A., Karboune, S., y Alli, I., 2014. Potato protein isolates: recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry*, 142: 373-82.
- Walstra, P. y Oria Almudí, R.M. Ciencia y Tecnología de productos lácteos. 2001. Editorial Acribia, S.A.
- Walter, J.W. (1970). Soybean Proteins: their functional, chemical and physical properties. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 18 (6): 969-976.
- Walter, AM Jr., Collins W.W., y Purcell A.E., 1984. Sweet potato protein: a review *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 32 (4): 659-99.
- Wang, Z.H., Dou, J., Macura, D., Durance, T.D. y Nakai, S. 1997. Solid phase extraction for GC analysis of beany flavours in soymilk. *Food Research International*, 30: 503-511.
- Weaver, C.M., y Kannan, S. 2002. Phytate and mineral bioavailability. En N.R.Reddy y S.K.Sathe (eds.), *Food Phytates*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, p.211-224.
- Wercinsky, S.A.S. 1999. Solid Phase Microextraction: A Practical Guide. New York: Marcel Dekker.
- Wilbey, R.A. 2002. Homogenization of milk. En H. Roginski (ed), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press, London, p. 1346-1349.
- Wilkens, W.F. y Lin, F.M. 1970. Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18: 333-336.
- Wuytack, E.Y., Diels, A.M., y Michiels, C.W. 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization a high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77 (3): 205-212.
- Yang, Yu., Kayan, B., Bozer, N., Pate, Bryan. 2007. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *Journal of Chromatography A*, 1152: 262-267.

- Yaoa, P.L., Hwangb, M.J., Chena, Y.M., y Yeha, K.W. 2001. Site-directed mutagenesis evidence for a negatively charged trypsin inhibitory loop in sweet potato sporamin. *FEBS Letters*, 496, 134–138.
- Yeboah, S.O., Mitei, Y.C., Ngila, J.C., Wessjohann, L., y Schmidt, J., 2012. Compositional and structural studies of the oils from two edible seeds: Tiger nut, *Cyperus esculentum*, and asiato, *Pachira insignis*, from Ghana. *Food Research International*, 47 (2): 259-266.
- Yeh, K.-W., Chen, J.-Ch., Lin, M.-I., Chen, Y.-M., y Lin, Ch.-Y. 1997. Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. *Plant Molecular Biology*, 33, 565–570.
- Yuan, S.H. y Chang, K.C. 2007. Selected odor compounds in cooked soymilk as affected by soybean materials and direct steam injection. *Journal of Food Science*, 72, 481-486.
- Zamora, A. 2009. Ultra-high pressure homogenisation of milk: effects on cheese-making. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P.D., Guamis, B., y Trujillo, A.J. 2007. Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 13 – 23.

Anexo I

Fecha:
Hora:
Nombre del catador:

FICHA DE DEGUSTACIÓN

1. DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO:

INSTRUCCIONES: Cátese atentamente las siguientes muestras y señálese la valoración que se considere para cada carácter (comparando con la muestra *control*, C).

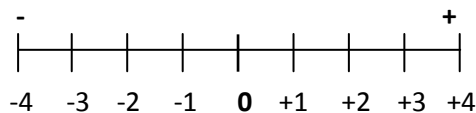
Para la notación de cada atributo, la siguiente escala da la magnitud de la desviación (nota hacia la parte positiva o negativa de la escala según sea mayor o menor la desviación apreciada respecto a la muestra *Control*):

Puntos

- **C** : desviación no apreciable respecto al Control
- **-1 y 1**: desviación mínima respecto al Control
- **-2 y 2**: desviación notable respecto al Control
- **-3 y 3**: desviación considerable respecto al Control
- **-4 y 4**: desviación muy considerable respecto al Control

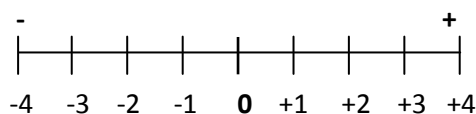
1.1. Color:

Intensidad

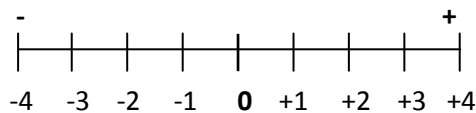


1.2. Impresión Olfativa:

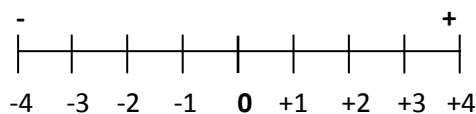
Intensidad



Tostado / Cocido

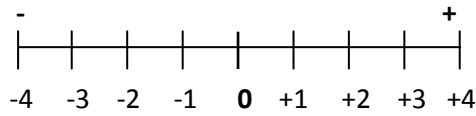


Aromas extraños

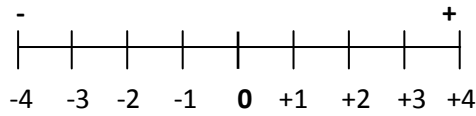


1.3. Cuerpo/textura:

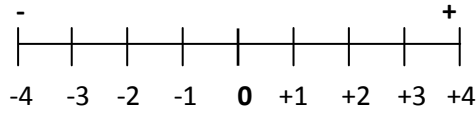
Viscosidad



Sensación acuosa

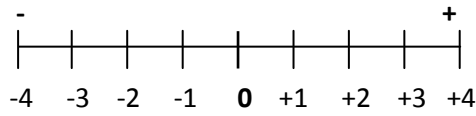


Presencia de partículas

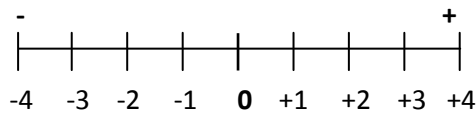


1.4.Sabor:

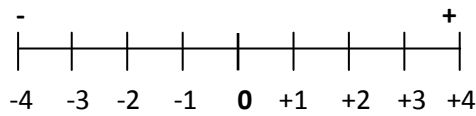
Intensidad



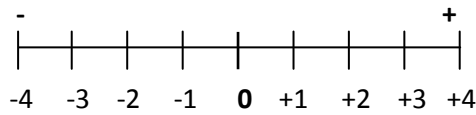
Dulzor



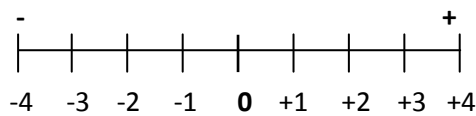
Tostado / Cocido



Metálico



Sabores extraños



2. GRADACIÓN:

- Ordene las muestras según su grado de preferencia (de más a menos):

+	
-	

Instrucciones

En la siguiente puntuación, marque con una X el comentario que mejor describe la muestra que ha probado.

<input type="checkbox"/>	Me gusta muchísimo (9)
<input type="checkbox"/>	Me gusta mucho (8)
<input type="checkbox"/>	Me gusta moderadamente (7)
<input type="checkbox"/>	Me gusta ligeramente (6)
<input type="checkbox"/>	Ni me gusta ni disgusta (5)
<input type="checkbox"/>	Me desagrada ligeramente (4)
<input type="checkbox"/>	Me desagrada moderadamente (3)
<input type="checkbox"/>	Me desagrada mucho (2)
<input type="checkbox"/>	Me desagrada muchísimo (1)