

**Ciencia y Tecnología
Alimentaria**

Ciencia y Tecnología Alimentaria

ISSN: 1135-8122

somonta@gmail.com

Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología
de Alimentos
México

Téllez Luis, S. J.; Ramírez, J. A.; Pérez Lamela, C.; Vázquez, M.; Simal Gándara, J.
Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos
Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol. 3, núm. 2, julio, 2001, pp. 66-80
Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos
Reynosa, México

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72430101>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's homepage in redalyc.org

redalyc.org

Scientific Information System

Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal

Non-profit academic project, developed under the open access initiative

APLICACIÓN DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA EN LA CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

APPLICATION OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE IN THE FOOD PRESERVATION

APLICACIÓN DA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA NA CONSERVACIÓN DOS ALIMENTOS

Téllez-Luis, S. J.¹; Ramírez, J. A.¹; Pérez-Lamela, C.^{2*}; Vázquez, M.³; Simal-Gándara, J.²

¹Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Apdo. Postal 1015 Reynosa. 88700 Tamaulipas. México.

²Área de Nutrición y Bromatología. Departamento de Química Analítica y Alimentaria. Facultad de Ciencias de Ourense. Universidad de Vigo. 32004 Ourense. España.

³Área de Tecnología de Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Santiago de Compostela. Escuela Politécnica Superior de Lugo. 27002 Lugo. España.

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: conchipl@uvigo.es

Recibido: 26 de Febrero de 2001; recibida versión revisada: 4 de Abril de 2001; aceptado: 4 de Abril de 2001

Received: 26 February 2001; revised version received: 4 April 2001; accepted: 4 April 2001

Abstract

Different techniques and methods have been used to preserve foods. As long as scientific knowledge and technology have improved, new systems were discovered and applied in order to preserve foods. Pressurisation is a very recent technology in the food industry. It has been applied by this purpose since 1990. In this review after a brief historic description about high pressure technology; systems, methods and pressurisation equipment applied in foods are also described. Characteristics related to lethal effects and inactivation degree on pressurised microorganisms are extensively discussed and physic-chemist factors (temperature, pH, water activity and concentration of other compounds in food media) implied in high pressure treatments are also reviewed. Pressurisation is an excellent technique to sterilize foods and food ingredients, and it is already possible to get pressurised products in the food market. In general, it can be state that high pressure treatments help to maintain and improve the sensorial quality and foods preservation. © 2001 Altaga All rights reserved.

Key words: Hydrostatic high pressure, pressurised foods, microorganism inactivation

Resumen

Se han utilizado diferentes técnicas y métodos para la conservación de los alimentos. A medida que avanzaba el conocimiento científico y tecnológico, se han descubierto y aplicado nuevas formas para conservar los alimentos. La presurización es una técnica muy reciente en el campo alimentario, empleado desde 1990. En este trabajo, tras una breve descripción histórica de la tecnología de la alta presión; se describen también los sistemas, métodos y equipos generadores de alta presión empleados en la industria alimentaria. Se discuten de forma exhaustiva aspectos acerca de los efectos letales y del grado de inactivación que provoca la presurización sobre los microorganismos. Se revisan los factores físico-químicos más importantes (temperatura, pH, actividad del agua, concentración de solutos y composición del medio). La presurización es una buena técnica de esterilización de alimentos y es ya una realidad comercial. En líneas generales, se puede afirmar que la alta presión favorece y mejora la calidad sensorial y la conservación de los alimentos. © 2001 Altaga. Todos los derechos reservados.

Palabras clave: Alta presión hidrostática, alimentos presurizados, inactivación de microorganismos

Resumo

Utilizáronse diferentes técnicas e métodos pra conservación dos alimentos. A medida que avanzaba o coñecemento científico e tecnolóxico, íbanse descubriendo e aplicando novas formas para conservar-los alimentos. A presurización é unha técnica moi novedosa no campo alimentario, empregada desde 1990. Neste traballo, tras unha breve descripción histórica da tecnoloxía da alta presión, describíense os sistemas, métodos e equipos xeneradores de alta presión empregados na industria alimentaria. Discútense de forma exhaustiva aspectos acerca dos efectos letales e do grado de inactivación que provoca a presurización sobre os microorganismos. Revisáns os factores físico-químicos máis importantes (temperatura, pH, actividade da auga, concentración de solutos e composición do medio). A presurización é unha boa técnica de esterilización de alimentos e xa unha realidade comercial. En liñas xenais, podese afirmar que a alta presión favorece e mellora a calidade sensorial e a conservación dos alimentos. © 2001 Altaga. Todos os dereitos reservados.

INTRODUCCIÓN

La alta presión hidrostática (APH), también denominada pascalización, presurización o simplemente alta presión, es una tecnología de gran interés en la industria de los alimentos debido a que es efectiva en la conservación de los mismos. Esta tecnología destaca sobre los procesos térmicos (Knorr, 1993), pues estos últimos causan inevitablemente una pérdida de nutrientes y sabores. Entre los tratamientos alternativos (no térmicos) usados en la conservación de los alimentos (pulsos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, pulsos luminosos de alta intensidad y ultrasonidos), Hoover (1997) considera la presurización la técnica más viable desde el punto de vista comercial y Meyer *et al.*, (2000) afirman que de todos ellos sólo se ha demostrado la efectividad de la APH en la inactivación de esporas y enzimas. La APH provoca la inactivación de las células microbianas sin alterar la calidad sensorial ni los nutrientes de los alimentos (Cheftel, 1995). El efecto de la alta presión sobre la viabilidad de los microorganismos es una combinación de varias acciones (Farr, 1990): i) Cambios en la morfología de la célula, los cuales son reversibles a bajas presiones (<200 MPa) pero irreversibles a presiones altas (>300 MPa); ii) Desnaturalización de proteínas a presiones altas debido al desdoblamiento de las cadenas peptídicas; iii) Modificaciones que afectan a la permeabilidad de la membrana celular.

La APH ofrece varias ventajas:

- El tratamiento evita la deformación de los alimentos, debido a que la presión se transmite uniforme e instantáneamente, es decir, no hay gradientes (cumple la denominada regla isostática). A diferencia de lo que ocurre con los procesos térmicos, el tratamiento APH es independiente del volumen y de la forma de la muestra, con lo que se reduce el tiempo requerido para procesar grandes cantidades de alimento (Cheftel, 1995; Pothakamury *et al.* 1995).
- No produce deterioro de nutrientes termolábiles como por ejemplo vitaminas (no destruye la vitamina C en los zumos, frente a los métodos tradicionales de pasterización (Kimura *et al.*, 1994), tampoco en patata (Eshtiagi y Knorr, 1993), ni altera otros compuestos de bajo peso molecular, fundamentalmente aquellos responsables del aroma y sabor.
- No se altera el sabor natural, ni la coloración del alimento, pues las altas presiones no favorecen la reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático (Hayashi, 1989b; Tamaoka *et al.*, 1991; Gross y Jaenické, 1994).
- No produce residuos, se trata de una energía limpia, lo que iría en consonancia con las políticas medioambientales de la actualidad.
- No precisa de la incorporación de aditivos al alimento.
- Mejora o provoca la aparición de propiedades funcionales en los alimentos.
- Tiene poco gasto energético; por ejemplo, para calentar 1 litro de agua a 30°C se necesita la misma energía

que para presurizar a 400 MPa ese mismo volumen de agua.

Con respecto a las desventajas podemos enumerar las siguientes:

- El alto coste del equipo, inconveniente que es cada vez menos importante ya que se están desarrollando equipos cada vez más baratos. Además, se va a ahorrar energía debido al bajo consumo energético de esta técnica.
- Con los equipos de APH disponibles hasta ahora en el mercado no se pueden diseñar procesos continuos, aunque sí hay algunos discontinuos que operan en línea (ejemplo: zumos de frutas). Actualmente, algunas firmas están trabajando en el diseño de sistemas continuos que operarían en línea (Flow International Corporation, sitio web: <http://www.flowcorp.com>).
- Imposibilidad de aplicación en algunos alimentos (frutas, verduras) porque perderían su forma y aspecto original.
- La desconfianza del consumidor a decidirse a comprar un producto "presurizado" por ser algo novedoso y desconocido. A pesar de ello, en Japón, USA y algunos países europeos los productos presurizados se consumen cada vez más.

Las altas presiones, por todas sus ventajas y características cuentan con aplicaciones de muy diversa índole en la industria alimentaria, la mayoría de ellas van orientadas a la conservación de los alimentos. En algunos trabajos (Mozhaev *et al.*, 1994; Ledward *et al.*, 1995; Cheftel *et al.*, 1995) se describen de forma más o menos extensa y justificada todas esas aplicaciones para distintos grupos de alimentos. Entre ellas figuran:

- Pasterización y esterilización sin modificar el valor nutritivo ni las propiedades organolépticas de los alimentos.
- Inactivación/Activación de enzimas para retardar/acelerar procesos de maduración, fermentación u otro tipo de transformaciones enzimáticas deseables en los alimentos.
- Modificación de la estructura debido a cambios en la configuración proteica: ablandamiento de textura en carnes y pescados, decoloración de hemoglobina en sangre de animales, inactivación de ciertas toxinas.
- Cambios en las transiciones de fase (congelación a temperaturas bajo cero evitando la formación de cristales de hielo, disminución del punto de fusión de lípidos, gelatinización a bajas temperaturas).
- Extracción de componentes alimentarios (pectinas, pigmentos e incluso agua).
- Agregación de sólidos o polvos alimentarios para elaborarlos en forma de barras, cubos, tabletas.
- Impide el pardeamiento no enzimático en determinados alimentos, pues la APH no favorece la reacción de Maillard y además evita la oxidación lipídica en ciertos productos.

DESARROLLO HISTÓRICO DE LA TECNOLOGÍA DE LA ALTA PRESIÓN

La generación de presión con fines industriales se puede decir que va ligada casi exclusivamente a la industria militar hasta que, a principios del siglo XIX, Perkins (1820, 1826) realizó los primeros estudios sobre la compresibilidad del agua. No es hasta finales de ese siglo cuando Cailletet (1880, 1891) y Amagat (1878, 1888, 1893) hacen las primeras investigaciones sobre el diseño de equipos de alta presión, y también desarrollan métodos para la medición de valores de altas presiones.

La primera aplicación de las altas presiones en un alimento fue investigada por Hite (1899) que intentó esterilizar leche mediante presurización. Este trabajo fue el primero que demostró la reducción de la población microbiana mediante la aplicación de altas presiones. Este investigador y sus colaboradores también estudiaron los efectos de las altas presiones en frutas y hortalizas (Hite *et al.*, 1914).

A comienzos del siglo XX resurge el interés por la investigación de las altas presiones, debido sobre todo a sus aplicaciones potenciales en la industria. Es cuando aparecen los trabajos del investigador que más contribuyó en este campo: Bridgman (1940, 1958, 1964), laureado con el premio Nóbel de Física. Sus trabajos se centran sobre todo en analizar las propiedades de los materiales una vez sometidos a altas presiones, así como en desarrollar procedimientos de aplicación de altas presiones y en diseñar nuevos equipos de generación de Alta Presión. A lo largo de la segunda mitad de este siglo podemos citar las contribuciones de otros autores, entre los que figura Crossland, que investiga acerca de la producción industrial de polietileno de alta densidad, realiza el corte de este material aplicando altas presiones (1971), trabaja en el diseño de equipos de generación de Altas Presiones (1983a), y recopila en una revisión bibliográfica las aplicaciones industriales de la Alta Presión (1983b).

Otros autores dignos de mención en este campo son Poulter (1951) por un lado y McFarland (1973) por otro. Sus trabajos se centran en el diseño de los cilindros, vasijas o cámaras donde se van a presurizar las muestras. La cámara, que tiene forma cilíndrica, es el elemento más importante de todo el equipo de presurización y también la pieza más cara; es de acero y su espesor depende de la presión máxima de operación, del diámetro y del número de ciclos de trabajo previstos. Posteriormente, Zander (1980) investiga sobre el diseño de equipos probando nuevos materiales.

No es hasta la década de los 80 cuando realmente se empieza a investigar de forma exhaustiva las relaciones entre APH y alimentos. Hoover, en 1993 enumera algunos trabajos realizados hasta entonces. Las investigaciones sobre matrices alimentarias comenzaron en USA en 1982 (Universidad de Delaware) (Hoover *et al.* 1989; Hoover, 1993). En 1986 se iniciaron líneas similares de investigación en la Universidad de Kyoto, Japón (Hayashi, 1989a), lo que trae como resultado la creación de la Sociedad Japonesa de Alta Presión y el lanzamiento al mercado de los primeros alimentos presurizados. Japón es el país pionero en cuanto a la producción y comercialización de

alimentos presurizados. Se trataba de alimentos procesados de tipo ácido, como zumos y derivados de frutas (Ledward *et al.*, 1995). El primer tipo de productos alimenticios presurizados fueron mermeladas de fresa, frambuesa, kiwi y manzana y se lanzaron al mercado por la compañía japonesa Meidi-Ya Food Co. Se pusieron a la venta al público en abril de 1990 (Askar, 1998). Hoy en día se comercializan muchos más productos en Japón (Cheftel, 1998) y en menor medida en USA y en Europa. En la Tabla 1 se exponen las mejoras que experimentan distintos tipos de alimentos tras la aplicación de tratamientos de APH, algunos de ellos están siendo ya comercializados.

SISTEMAS Y EQUIPOS GENERADORES DE ALTA PRESIÓN EN ALIMENTOS

En el Sistema Internacional de medidas la unidad de presión es el Pascal o N/m², pero esta es una unidad muy pequeña para medir presiones altas. En la actualidad se utilizan muchas unidades por lo que es muy útil conocer los factores de conversión de las mismas, pues según las aplicaciones y el país se emplean unas u otras: 100 MPa = 1 kbar = 10.2 kgf/mm² = 987 atm = 14504 lbf/in² (psi) = 6.475 tonf/in². Algunos autores incluyen tablas más completas con la conversión de estas unidades (Crossland, 1995; Farkas y Hoover, 2000).

Varios investigadores describen detalladamente las características de los equipos y cámaras de presurización, así como los sistemas existentes para generar altas presiones. Incluso, indican algunas empresas que los fabrican (Crossland, 1995; Mertens, 1994; Pothakamury *et al.*, 1995; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998; Farkas y Hoover, 2000). Otros hacen una descripción más resumida y breve (Zimmerman y Bergman, 1993; Galazka y Ledward, 1995; Sangronis *et al.*, 1997).

Sistemas de presurización

Según varios autores (Mertens y Deplace, 1993; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998) se conocen 3 procesos básicos donde se usan altas presiones con o sin variaciones de temperatura. En la industria se empleará uno u otro en función de la aplicación a que se destinen.

En los sistemas de presión isostática en frío (PIF) los materiales en polvo se colocan en un molde elastómero y se someten a APH. Las presiones aplicadas oscilan entre 50-600 MPa, se opera a temperatura ambiente y el tiempo de tratamiento oscila entre 1 y 30 minutos. El volumen de la vasija, cilindro o cámara de presurización puede variar entre algunos cm³ y más de 1 m³. Esta técnica se empleó inicialmente en la industria de metales, cerámica, carbón-grafito y plástico. Hoy día promete ser la de mayor aplicación en la industria de alimentos.

Cuando estos sistemas se emplean en las industrias alimentarias, el medio o agente presurizante utilizado es agua potable mezclada con un pequeño porcentaje de aceite como anticorrosivo y lubricante. En la industria alimentaria se utilizan básicamente los sistemas de presurización en frío. El procesamiento de alimentos requiere tiempos de tratamiento de 5 a 20 minutos y las presiones

Tabla 1.- Aplicaciones de la alta presión hidrostática (APH) en diferentes productos alimentarios.

Producto Alimentario	Condiciones de tratamiento*	Función de la Alta Presión	Referencia
Maíz	500 MPa, 5 min.	Dstrucción de la estructura cristalina del almidón	Hibi <i>et al.</i> , 1993
Sorgo	500 MPa, 5 min.	Mejora en la calidad de la malta de sorgo	Dewar <i>et al.</i> , 1994
Zanahoria	400 MPa, -20°C	Mejora en la textura y estructura histológica	Fuchigami <i>et al.</i> , 1997
Kinu-tofu (extracto de soja)	400 MPa, -20°C	Mejora en la textura y estructura histológica	Fuchigami y Teramoto, 1997
Kommyaku (gel proteico)	700 MPa, -20°C	Mejora de la textura del gel	Fuchigami y Teramoto, 1997
Carne cruda de vaca	100-150 MPa, 30-40 min., 20°C	Acelera la maduración, mejora la vida útil y provoca ablandamiento	Cheftel, 1995
Pastel de arroz	400 MPa, 10 min, 45-70°C	Reducción de la carga bacteriana de la materia prima	Cheftel, 1995
Salchichas y pasteles de pescado	400 MPa	Gelatinización, disminución de la carga bacteriana	Cheftel, 1995
Sake (aguardiente de arroz)	Presurización de partículas insolubles	Inactivación de las levaduras, se detiene la fermentación	Cheftel, 1995
Mermeladas, yogur, salsas, gelatinas de frutas, geles	400 MPa, 10-30 min, 20°C	Pasteurización, facilita la penetración de azúcar y la formación de geles	Cheftel, 1995
Zumo de pomelo	120-400 MPa, 2-20 min, 20°C	Reducción del sabor amargo	Cheftel, 1995
Zumo de mandarina	300-400 MPa, 2-3 min, 20°C	Mejora del aroma	Cheftel, 1995
Zumo de guava	400-600 MPa, 10 min	Aumenta la viscosidad de forma más suave que la pasterización	Yen y Lin, 1998
Abadejo	200 MPa, 50 °C	Aumento en la consistencia	Park, 2000
Merluza	400 MPa, 3ciclos 5 min, 7°C	Prolonga 2 semanas la vida útil	Hurtado <i>et al.</i> , 2000
Lechuga y tomate	300 MPa, 10 min, 20°C	Reduce en 1 log la población microbiana	Arroyo <i>et al.</i> , 1997

* El tratamiento se realizó a temperatura ambiente si no se especifica la temperatura.

aplicadas no suelen ser inferiores a 400 MPa y no superan los 900 MPa.

Los otros 2 sistemas se diferencian básicamente por el rango de temperaturas aplicadas. Así, los sistemas de presión isostática templada (PIT) emplean temperaturas que oscilan entre 20°C y 200°C, mientras que los de presión isostática caliente (PIC) utilizan temperaturas de unos 2000°C y el medio presurizante es un gas.

El primer equipo para procesar alimentos que emplea alta presión fue diseñado por Mitsubishi Heavy Industries Ltd. en Japón (Pothakamury *et al.*, 1995).

Métodos de presurización

La Alta Presión se puede producir por distintos métodos: compresión directa, compresión indirecta o por calentamiento del medio presurizante.

Para lograr la compresión directa se emplea un pistón para presurizar; la alta presión es generada por la presurización del medio a través del extremo del pistón de diámetro pequeño. Este método permite compresiones muy rápidas, pero las limitaciones del sellado entre el pistón y la superficie interna de la vasija restringe su uso a laboratorios pequeños o a plantas piloto.

intensificador de alta presión para bombear el medio presurizante desde un depósito hacia la cámara de presurización y así se alcanza la presión deseada. Este es el método más empleado a escala industrial.

En cuanto al tercer procedimiento, se basa en la propiedad de expansión del medio presurizante cuando se le aplica temperatura, produciéndose una elevación de la presión. El efecto se logra cuando se combina alta presión con alta temperatura. Este método requiere un control muy preciso de la temperatura dentro del volumen interno total de la cámara de presurización.

Descripción del proceso de presurización

El alimento se coloca en un recipiente de plástico estéril, se sella y se introduce en la cámara de presurización para su procesamiento. Se recomienda que el material plástico sea una película de alcohol de polivinilo (PVOH) y películas copoliméricas de alcohol de etileno y vinilo (EVOH). No hay posibilidad de deformación del paquete porque la presión ejercida es uniforme (no hay gradientes). Mertens (1993) expone y discute aspectos relacionados con la aplicabilidad de distintos materiales de envasado en la tecnología de la alta presión. La cámara de

material de envasado apropiado, se cierra y se llena con el medio transmisor de la presión, normalmente agua. La presión aplicada comprime el medio transmisor alrededor del alimento provocando una disminución del volumen que varía según la presión y la temperatura aplicadas. A temperatura ambiente es del orden del 4% a 100 MPa, 7% a 200 MPa, 11.5% a 400 MPa y 15% a 600 MPa (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). El hecho de que se comprima tan poco volumen hace que el proceso sea poco peligroso, siempre que se use agua como medio presurizante. El alimento es sometido a alta presión por un tiempo determinado, el cual depende del tipo del alimento y de la temperatura del proceso. Al finalizar el tiempo, la cámara se descomprime y se extrae el alimento tratado. Seguidamente, se coloca una nueva carga de alimento en la cámara de presurización y se inicia así otro ciclo (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

El proceso descrito en el párrafo anterior es un ejemplo típico de un sistema de presurización discontinuo. Es decir, en estos casos el alimento es presurizado por cargas, una después de otra. Este sistema es el que recomienda la firma sueca ABB Autoclave Systems, Inc. que fabrica equipos generadores de alta presión (Zimmerman y Bergman, 1993) para presurizar alimentos. Las ventajas que ofrece son: i) reducción del riesgo de contaminación del alimento por los lubricantes de la máquina; ii) mayor flexibilidad, porque permite procesar distintos tipos de alimentos sin necesidad de limpiar la cámara tras cada operación y sin peligro de recontaminación; iii) simplicidad de fabricación y limpieza. La velocidad de producción de los procesos discontinuos se puede aumentar operando con sucesivas cámaras de presión sin tiempos de inducción en el procesado, pues el sistema opera secuencialmente, convirtiendo el proceso en semi-continuo (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). No obstante, es más fácil automatizar un proceso que trabaja con materiales semi-fluidos más o menos homogéneos que con sólidos deformes y de tamaños irregulares.

El proceso en los sistemas PIF puede ser de dos tipos: bolsa húmeda, en el que el molde elastómero se llena con la muestra fuera del cilindro de presurización y bolsa seca, donde el molde se fija en el cilindro y se llena *in situ* con la muestra que se va a presurizar. El primero se emplea en procesos discontinuos y el segundo en los semicontinuos y en línea. Aunque no se dispone de equipos que trabajan en régimen continuo, actualmente se está trabajando en el diseño de plantas de presurización que operarán en un futuro próximo en continuo y en línea según indica la empresa Flow International Corporation.

EFFECTO DE LA APH SOBRE LOS MICROORGANISMOS

La extensión del efecto de la APH sobre la inactivación microbiana depende de variables de tratamiento, tales como presión, tiempo y temperatura de exposición, además de la composición del alimento y tipo de microorganismos involucrados (Sangronis *et al.*, 1997). La APH produce cambios de tipo morfológico en las células vegetativas: compresión del gas de las vacuolas

(a 0.6 MPa puede colapsarse) (Walsby, 1972), alargamiento de las células y formación de filamentos (Zobell y Cobet, 1962; Zobell, 1970), separación de la membrana celular de la pared celular (Osumi *et al.*, 1992), contracción de la pared celular con la formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y de los orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula (Cheftel, 1995). También provoca modificaciones bioquímicas y genéticas al inactivar las enzimas involucradas en la replicación y transcripción del ADN (Smelt, 1998; Linton *et al.*, 2000). Algunos de estos cambios, expuestos por distintos autores se reflejan en la Tabla 2 (Hoover *et al.*, 1989; Smelt, 1998).

Casi todas las bacterias pueden crecer hasta valores de 20-30 MPa. A aquellos microorganismos que pueden crecer a presiones sensiblemente más altas (40-50 MPa) se les denomina barófilos; aquellos incapaces de crecer a presiones de 30-40 MPa se les conoce como barófilos, y a los que crecen en el intervalo de 1-50 MPa se les llama euribáricos. Los organismos barodúricos sobreviven a presiones de 50-200 MPa, pero no pueden crecer. Los microorganismos pueden variar significativamente en su respuesta a la APH. Esta variación existe no sólo entre especies, sino también entre cepas de las mismas especies (Galazka y Ledward, 1995).

El mayor grado de inactivación sobre los microorganismos se lleva a cabo en la etapa logarítmica de crecimiento. En general, los microorganismos Gram negativos son los más sensibles a las Altas Presiones; les siguen las levaduras y hongos, los Gram positivos y por último las esporas; los virus son muy resistentes a las altas presiones, aunque depende del tipo de virus (Smelt, 1998). La mayoría de los autores coinciden en que las esporas bacterianas son las formas de vida más resistentes a la presurización (Farkas y Hoover, 2000). Presiones de 400 a 600 MPa inactivan las células vegetativas, mientras que para inactivar las esporas se necesitan presiones mayores. Ya en la primera mitad del siglo pasado se comprobó que la inactivación de ciertas esporas requiere presiones de 1200 MPa (Larson y Hartzell, 1918). Otros autores más actuales rebajan esta presión a 1000 MPa (Sangronis *et al.*, 1997) y en algunos casos se requieren valores de hasta 1500 MPa a temperatura ambiente (Smelt, 1998). En la Tabla 3 se recopilan las condiciones de presurización necesarias para reducir la población de ciertos microorganismos patógenos, en distintos substratos.

La inactivación de los microorganismos por la APH puede ser debida a un incremento en la permeabilidad de la membrana, la inhibición de las reacciones productoras de energía y la desnaturalización de las enzimas esenciales para el desarrollo y reproducción de la célula (Pothakamury *et al.*, 1995).

Varios sistemas enzimáticos de los microorganismos son inhibidos o inactivados por la presión. Este es el caso de varias deshidrogenasas en *Escherichia coli* (100 MPa), carboxipeptidasas de las levaduras (400 MPa) y la ATPasa localizada en la capa de los fosfolípidos, involucrada en el fenómeno del transporte activo a través de la membrana. La actividad de la ATPasa Na^+/K^+ de la membrana celular se reduce

Tabla 2.- Efecto de la alta presión hidrostática (APH) en ciertas características fisiológicas de los microorganismos.

Microorganismo	Condiciones	Efecto observado	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	40 MPa	Aumenta de 5 a 100 veces la longitud celular	Zobell y Cobet, 1962
<i>Vibrio</i> spp.	40 MPa	Aumenta de 5 a 8 veces la longitud de los filamentos	Zobell, 1970
<i>Bacillus mycoides</i>	27 MPa	Células 2-3 veces más largas	Zobell, 1970
<i>Serratia marcescens</i>	60 MPa	Aumenta de 130-2000 veces la longitud de los filamentos	Zobell, 1970
<i>Pseudomonas</i>	300-450 MPa	Alargamiento de las células	Kriss <i>et al.</i> , 1969
<i>E. coli</i> , <i>Vibrio</i> y <i>Pseudomonas</i>	20-40 MPa	Inmovilización y pérdida de flagelos	Zobell y Cobet, 1962; Zobell, 1970
La mayoría de las bacterias	20-30 MPa	Crece normalmente	Zobell, 1970
Algunos microorganismos (barófilos)	40-50 MPa	Crece lentamente	Zobell, 1970
Microorganismos barodúricos	50-200 MPa	Sobreviven pero no crecen	Zobell, 1970
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150-400 MPa	Ausencia de daños mecánicos en la célula	Butz <i>et al.</i> , 1990
<i>Candida tropicalis</i>	200 MPa	Separación de la pared celular y disgregación de la capa intermedia entre pared y membrana	Osumi <i>et al.</i> , 1992
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 MPa	Alteraciones en mitocondrias, citoplasma y membrana nuclear	Shimada <i>et al.</i> , 1993

por la alta presión. Seguramente este efecto es debido a la bicapa asociada (Chong *et al.*, 1985). Cuando se aplica la presión, varios sitios dentro de la célula bacteriana pueden dañarse y por lo tanto la ATPasa de la membrana no puede realizar su función, debido a la desnaturalización directa o por la dislocación de la membrana. El ATP ya no se hidroliza, y por lo tanto, ya no está disponible para llevar a cabo el transporte activo de protones, el pH celular se acidifica y la célula finalmente muere.

Se ha observado una disminución en la síntesis del ADN a altas presiones. Ésta se relaciona con la inactivación de las enzimas implicadas en esa síntesis. La doble hélice del ADN permanece estable debido a que los enlaces de hidrógeno no se alteran con las altas presiones. La desnaturalización de las proteínas es irreversible por encima de 300 MPa (entre 100 y 300 MPa es reversible). Pero la replicación y transcripción del ADN, así como la síntesis de las proteínas, son inhibidas a niveles mucho más bajos de presión. Este fenómeno explica parcialmente la ausencia del desarrollo microbiano con los tratamientos de presiones antes mencionados (Pothakamury *et al.*, 1995).

Las proteínas se ven afectadas de forma importante por la presión. La fluidez de la membrana celular parece tener gran importancia en la inactivación por la presión. Las células son más resistentes a la presión cuando sus membranas son más rígidas. Células de *Lactobacillus plantarum*, cultivadas a 10° C, mostraron una relación alta de ácidos grasos saturados/insaturados y un incremento en la resistencia a la presión. Esto puede ser debido a un menor grado de cristalización de los

fosfolípidos de la membrana en condiciones de alta presión cuando las células crecen a 10° C, pues la temperatura de fusión de los lípidos aumenta, de una manera reversible, en más de 10°C por cada 100 MPa (Cheftel, 1995).

Un contaminante frecuente en leche es *Listeria monocytogenes*. Una población de *L. monocytogenes* de 10⁶ UFC/mL fue inactivada por la exposición a 340 MPa a 23°C en leche ultrapasteurizada (Drake *et al.*, 1997) y la misma población de *Vibrio parahaemolyticus* (patógeno presente en productos marinos) fue inactivada por exposición a 170 MPa durante 10 min a 23°C en jugo de almeja (Styles *et al.*, 1991). Algunos investigadores (Rademacher *et al.*, 1998) consideran que la presurización de leche a 500 MPa durante unos minutos equivale a un tratamiento de pasteurización (72° durante 15 s), estos autores demostraron que tiempos superiores a 8 minutos presurizando entre 400 y 700 MPa no facilitaban la inactivación microbiana, la cual oscila entre 1 y 2.5 reducciones logarítmicas.

Factores físico-químicos en la inactivación de células vegetativas por la presión

El desarrollo de bacterias depende, entre otros factores, de la temperatura, del pH, de la composición del medio de desarrollo y de la actividad del agua del mismo. La alta presión altera el pH del medio disminuyéndolo. Los microorganismos son más susceptibles a la inactivación en un medio no nutritivo que en uno enriquecido, el cual es más protector debido a la presencia de aminoácidos esenciales y vitaminas. La

presencia de nutrientes que afectan a la actividad de agua del medio como son el azúcar y la sal ejercen una marcada influencia en la resistencia a la APH.

La temperatura es muy importante para que el tratamiento de presurización sea efectivo. Células de *E. coli O157:H7* se sometieron a tratamientos de alta presión a 200 MPa durante 30 min a 30° C. Las células una vez presurizadas, se sometían a temperaturas de 55, 58 y 60° C. Si esto se realizaba inmediatamente los resultados indicaron que el tratamiento de alta presión aumentaba la sensibilidad al calor de estas bacterias. Cuando los cultivos tratados por la alta presión fueron almacenados a 3° C, antes de someterlos a calentamiento, la sensibilidad al mismo persistió más de 10 días.

Un estudio similar se realizó con *E. coli O157:H7* en leche desnatada. También, se observó un incremento en la sensibilidad al calentamiento inmediatamente después del tratamiento con APH, pero tras almacenarla durante 4 días a 3° C no hubo diferencias significativas

en la termotolerancia entre las muestras presurizadas y las no presurizadas (Linton *et al.*, 2000).

Otro factor físico-químico relevante es la concentración de solutos en el medio. La destrucción de *Saccharomyces cerevisiae* en mermelada de fresa fue menos efectiva y requirió niveles de presiones más altos cuando el contenido en azúcar se incrementó de un 20% a un 50%. Probablemente la resistencia a la presión es debida a las condiciones fisiológicas del organismo al reducirse la actividad del agua. Esta resistencia puede disminuir al aumentar la temperatura y el tiempo de presurización.

Para la inactivación de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* se requirieron niveles de presiones más altas o combinaciones de presión y temperatura cuando se encontraban en alimentos ricos en azúcar. Experimentos realizados con la levadura *Rhodotorula rubra* procesados a 400 MPa y a diferentes temperaturas durante 15 min en soluciones de sacarosa a concentraciones de 40% ($a_w =$

Tabla 3.- Sensibilidad de algunos microorganismos patógenos (formas vegetativas o esporuladas) a la alta presión hidrostática.

Microorganismo	Substrato	Condiciones De presurización*	RLPM	Referencia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Tampón fosfato +3% NaCl, pH 7	170 MPa, 30 min, 23°C	6	Styles <i>et al.</i> , 1991
	Productos marinos (almeja enlatada)	170 MPa, 10 min, 23°C	<5	Styles <i>et al.</i> , 1991
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Tampón fosfato a pH 7	325 MPa, 10 min	6	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
	Cerdo	325 MPa, 10 min, 25°C	6	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cerdo	300 MPa, 10 min, 25°C	6	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
<i>Salmonella typhimurium</i> 7136	Alimento infantil a base de pollo	340 MPa, 5 min	2	Metrick <i>et al.</i> , 1989
	Tampón fosfato+0.9%NaCl, pH 7	300 MPa, 10 min, 23°C	6	Metrick <i>et al.</i> , 1989
	Cerdo	340 MPa, 10 min, 25°C	2	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
<i>Salmonella senftenberg</i> 775W	Alimento infantil a base de pollo	340 MPa, 10 min, 23°C	4	Metrick <i>et al.</i> , 1989
	Tampón fosfato+0.9% NaCl,pH 7	340 MPa, 10 min, 23°C	3	Metrick <i>et al.</i> , 1989
<i>Salmonella bareilly</i>	Tampón fosfato a pH 7	300 MPa, 20 min	8	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Tampón fosfato pH 7	700 MPa, 13 min,	6	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
	Leche UHT	800 MPa, 10 min	2	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
	Leche UHT	600 MPa, 30 min	2	Patterson <i>et al.</i> , 1995
	Carne de ave	700 MPa, 30 min	5	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
<i>Listeria monocytogenes</i> (Scott A)	Tampón fosfato pH 7	340 MPa, 20 min	<6	Styles <i>et al.</i> , 1991
	Leche cruda	340 MPa, 60 min, 23°C	6	Styles <i>et al.</i> , 1991
	Leche UHT	340 MPa, 80 min, 23°C	6	Styles <i>et al.</i> , 1991
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cerdo	600 MPa, 10 min, 25°C	6	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
	Leche UHT	600 MPa, 30 min	2	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
	Leche pasteurizada	586 MPa, 3 ciclos de 1 min, 5°C	5	Takahashi <i>et al.</i> , 1991
Esporas de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Leche UHT	600 MPa, 60 min, 70°C	4	Hayakawa <i>et al.</i> , 1994
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> 168	Agar nutritivo, pH 6-7	404 MPa, 15 min, 25°C	<0.5	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
	Agar nutritivo, pH 6-7	404 MPa, 15 min, 70°C	5	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
Esporas de <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	Medio clostridial + agar, pH 7	404 MPa, 30 min, 25°C	<0.5	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991
	Medio clostridial + agar, pH 4	404 MPa, 30 min, 25°C	<3	Shigehisa <i>et al.</i> , 1991

0.96), 50% ($a_w=0.94$), y 55% ($a_w=0.91$) indicaron claramente un efecto protector de la sacarosa frente a la inactivación por la presión hasta temperaturas de 30° C. La inactivación de este microorganismo sí fue posible a temperaturas más altas 40-50° C ($a_w=0.94-0.91$) pero con tiempos de tratamiento más largos. La presencia de 5 - 20% de etanol favoreció progresivamente la inactivación de *Rhodotorula rubra* al aplicar APH (200 MPa, 25° C, 15 min), mientras que la adición de 50% - 60% de sacarosa al medio junto con el etanol revierte este efecto (Knorr, 1994).

Esto nos lleva a concluir que para una actividad del agua cercana o por debajo de 0.9, las células vivas entran en un estado latente en el cual la membrana celular es modificada y llega a ser más resistente a la presión. Este efecto fue confirmado por Oxen y Knorr (1994) en otros experimentos realizados con *Rhodotorula rubra*. Por lo tanto, la inactivación de los microorganismos sometidos a presurización depende de la actividad del agua. La resistencia a la inactivación se incrementa con una disminución en la actividad de agua y puede ser atribuida a una reducción y supresión del desarrollo de la célula.

Las soluciones salinas también favorecen la resistencia a la APH. Soluciones de NaCl 2-4 M ejercen un marcado efecto protector en *E. coli* o *S. cerevisiae* en soluciones tamponadas a pH 7 aplicando valores de presión de 100-400 MPa. En el caso de *E. coli* este efecto se observó presurizando desde -20° C hasta 20° C. En el caso de *S. cerevisiae* el efecto protector se midió sólo a 20° C. Asimismo, en las levaduras *Zygosaccharomyces rouxii* y *S. cerevisiae* se observaron efectos baroprotectores usando NaCl y glucosa. Estos microorganismos se inactivaron sin la adición de estos solutos a 200 MPa. Al añadir NaCl al 20% o glucosa al 40% se necesitó aplicar presiones de 400-500 MPa para conseguir el mismo nivel de inactivación en las mismas condiciones de presurización (25° C, 30 min) (Takahashi *et al.*, 1993). Sin embargo, en productos alimentarios desecados o con bajo contenido en agua, como las especias, el tratamiento APH no es efectivo con fines de esterilización, al menos se necesita un porcentaje de agua de un 70% para lograr reducir algo la población microbiana en mezclas de especias que contienen 10⁵ microorganismos por gramo (Kowalski *et al.*, 1992).

Inactivación de esporas bacterianas

Una de las operaciones más difíciles en la conservación de los alimentos es la inactivación de las esporas bacterianas. Aunque es posible inactivar las esporas por tratamientos térmicos, no es muy deseable debido a que el calor afecta a la calidad de los alimentos destruyendo nutrientes termolábiles. A temperatura ambiente, las esporas de las levaduras y mohos se inactivan fácilmente a presiones que oscilan entre 300-400 MPa. Pero las esporas bacterianas en muchas ocasiones resisten presiones de hasta 1000 MPa. Generalmente en la inactivación de las esporas se necesitan combinaciones de presión y temperatura, debido a que la aplicación de APH resulta insuficiente. Por ejemplo, las esporas microbianas no se inactivaron cuando se sometieron a presiones de 1000 MPa a

temperaturas bajas (0° C). Cuando la temperatura se elevó, el efecto letal a los mismos valores de APH llegó a ser muy efectivo (Cheftel, 1995).

La presión induce la germinación de las esporas, la subsecuente presión y la temperatura actúan sobre la spora germinada reduciendo así la carga bacteriana. Las células vegetativas obtenidas de las esporas germinadas son mucho más sensibles a la presión y/o al calor. Las esporas una vez activadas, germinan completamente y se pueden someter a APH para conseguir la esterilización del alimento. Sin embargo una proporción de las esporas iniciales permanecen todavía en un estado de «super» latencia y no germinan (Russel, 1982). La germinación inducida por la presión parece ser provocada por la ionización de los constituyentes de las esporas: las cargas eléctricas resultantes aumentan la hidratación del protoplasma de la spora. La temperatura y los rangos de la presión para la germinación e inactivación dependen de las especies de las esporas. Las presiones y temperaturas bajas causan la germinación, pero no hay inactivación apreciable de las esporas germinadas. Las presiones intermedias provocan una germinación considerable y una proporción grande de las esporas germinadas es inactivada. Las presiones altas causan menos germinación y sólo una pequeña proporción de las esporas germinadas resulta inviable.

La inactivación de las esporas es más efectiva cuando el valor de pH es cercano a la neutralidad y menos efectiva a niveles extremos de pH. Los solutos no iónicos a baja a_w tienen pocos efectos sobre la inactivación de las esporas mediante tratamientos de APH. La presencia de solutos iónicos como NaCl o CaCl₂ disminuye la inactivación (Sale *et al.*, 1969). La mayoría de las esporas no pueden germinar a presiones altas en ausencia de iones inorgánicos. Los iones también provocan un aumento en la pérdida de la resistencia al calentamiento por las esporas en soluciones tampón si los comparamos con suspensiones de agua destilada a la misma presión y temperatura.

La germinación iniciada a tratamientos de APH bajos es dependiente de los constituyentes del medio. Los aminoácidos alanina y riboniacina actúan como potenciadores efectivos de la presión en la germinación de esporas de *Bacillus cereus*. Los potenciadores e inhibidores de la germinación son menos eficaces cuando se incrementa la presión. Los inhibidores alcohol octílico y cloruro de mercurio previenen totalmente la germinación de *B. cereus* y *B. coagulans* a 400 y 600 MPa, respectivamente (Cheftel, 1991).

El azúcar y la sal son inhibidores efectivos en la inactivación de las esporas. La presencia de glucosa, sacarosa y glicerol disminuyó la eficiencia en la inactivación. Un comportamiento similar se observó en esporas de *B. licheniformis* en vegetales dulces y salados (Taki *et al.* 1991). Este efecto protector quizá se deba a la disminución de la actividad de agua en la spora.

El comportamiento de las esporas sometidas a altas presiones se ha investigado hace ya algunos años, y así se comprobó que las esporas de *Bacillus spp.*

tratadas en un rango de presiones de 100 a 800 MPa, se inactivaban entre 100 y 300 MPa (Sale *et al.*, 1969). La germinación de las esporas a formas vegetativas ocurre en ese mismo rango, siendo completamente inactivadas con la aplicación de esas presiones (Gould y Sale, 1970). Más recientemente, se lograron hasta 6 reducciones logarítmicas en la velocidad de crecimiento de las esporas de *Bacillus stearothermophilus* cuando se aplicaron presiones de 600 MPa a 70° C y empleando 4-6 ciclos de 5 min (Hayakawa *et al.*, 1994). En condiciones similares, es decir, una combinación de alta presión (600 MPa), temperatura (60° C); y con sólo un ciclo de tratamiento (20-60 min) se inactivaron también esporas de *B. stearothermophilus* (Seyderhelm y Knorr, 1992).

Se investigaron los efectos combinados de presión, temperatura, pH y la presencia de nisina y laurato de sacarosa sobre esporas de *Bacillus subtilis* 168 y *Clostridium sporogenes* PA 3679. La población de esporas de *C. sporogenes* PA 3679 se redujo a 2.5-log cuando se expusieron a presiones de 404 MPa a 25°C, pH 4 durante 30 min. Pero, el mismo tratamiento a pH 7 redujo las esporas menos de 0.5-log. La presurización de las esporas de *B. subtilis* 168 a 70°C, pH 6 ó 7 durante 15 min a 404 MPa resultó en una reducción de 5-log, comparada con una reducción de <0.5-log para el mismo tratamiento de presurización a 25°C. Las esporas de *Bacillus subtilis* figuran entre las esporas bacterianas más resistentes a la presión.

Se observó que la nisina tuvo un efecto sinérgico en la inactivación de las esporas de *B. subtilis* 168 y *C. sporogenes* PA 3679 cuando se combinaron con la presión, temperatura elevada y pH bajo. *B. subtilis* 168 fue resistente a 0.1% de laurato de sacarosa. Pero, cuando se combinó con un pH de 6 y se le aplicó una presión de 400 MPa a 45° C durante 15 min un efecto sinérgico eliminó la suspensión de esporas de 1 x 10⁶/ mL. Las esporas dañadas térmicamente son más sensibles a la nisina que las no expuestas al tratamiento térmico. Las propiedades antimicrobianas del laurato de sacarosa para inactivar o interferir en el brote de las esporas se aumentaron notablemente por la presión y por la temperatura alta (Stewart *et al.*, 2000).

EFFECTOS DE LA APH SOBRE LOS ENZIMAS

La APH aumenta las velocidades de las reacciones que involucran una disminución del volumen y retarda aquellas donde el volumen aumenta, es decir, su efecto se rige por el principio de Le Chatelier, según la siguiente ecuación:

$$\ln k_{\text{cinética}} = \ln k_0 - \Delta V^{\#} \cdot \frac{P}{RT}$$

donde k es la constante de la reacción y $\Delta V^{\#}$ el volumen de activación (variación de volumen entre el complejo activado y los reactivos). Distintos investigadores explican de forma más o menos detallada las ecuaciones y fenómenos que describen los efectos cinéticos y termodinámicos asociados a las altas presiones

y el efecto que provocan en las proteínas (Balny y Masson, 1993; Gross y Jaenické, 1994; Balny, 1998), enzimas (Hendrickx *et al.*, 1998; Ashie y Lanier, 2000) o/y otras biomoléculas (Mozhaev *et al.*, 1994; Heremans, 1982; 1995; Tauscher, 1995; Farkas y Hoover, 2000).

La APH causa una disminución en el espacio molecular disponible o un aumento de la interacción entre partículas y afecta a las reacciones en las que se produce un cambio en el número de grupos ionizables. Las reacciones no se ven modificadas por las altas presiones si no existe un cambio de volumen entre productos y reactivos o si ambos poseen cargas iguales. Las reacciones en las que se forman enlaces de hidrógeno se ven favorecidas por la APH, debido a que estos enlaces provocan una disminución en el volumen de las moléculas. En las proteínas, la presión actúa principalmente en los enlaces hidrofóbicos y electrostáticos de la molécula. La APH causa la desprotonación de los grupos cargados, la rotura de los puentes iónicos y de los enlaces hidrofóbicos, de este modo se producen cambios conformacionales y estructurales. Las transiciones estructurales están acompañadas de grandes cambios de hidratación. Los cambios de hidratación son la mayor fuente de la disminución del volumen relativo a la disociación y desdoblamiento de las proteínas (Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). La extensión de la desnaturalización mediante la APH depende del carácter hidrofóbico o hidrofílico de la molécula. Como hemos mencionado anteriormente, presiones en el rango de 100-300 MPa provocan una desnaturalización reversible, debido a la disociación de las proteínas oligoméricas, mientras que presiones por encima de 300 MPa causan desnaturalización irreversible, debido a la desnaturalización de la cadena proteínica individual. Los ácidos nucleicos en una célula son más baroresistentes que las moléculas proteicas. Las moléculas del ADN son más estables a altas presiones, mientras que temperaturas altas causan su desnaturalización.

Las altas presiones modifican la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, lo cual significa que las enzimas son alteradas por la APH. Esta alteración es debida a la modificación de las estructuras intermoleculares y cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima. Se ha observado que algunas enzimas se inactivan con las altas presiones, mientras que otras se activan. Por ejemplo, las deshidrogenasas de *E. coli* se inactivan completamente cuando se someten a presiones de 100 MPa durante 15 min a 27° C, mientras que la actividad de la aspartasa de esta bacteria se incrementó cuando la presión se elevó a 680 MPa.

Hendrickx *et al.* (1998) agrupan en dos los efectos de la APH sobre las enzimas: presiones relativamente bajas, del orden de 100 MPa que activan algunas enzimas (fundamentalmente las de tipo monomérico) y presiones mucho más altas, que provocan inactivación enzimática. Tanto la activación como la inactivación mediante el uso de APH tiene mucha relevancia en la calidad de los productos alimentarios. El efecto de inactivación enzimática provocado por las altas presiones se investigó por vez primera en 1932 (Ashie y Lanier, 2000).

Probablemente sean las polifenoloxidasas las enzimas sobre las que más se han estudiado los efectos de la APH. En la Tabla 4 se aprecia cómo varía la actividad de algunas polifenoloxidasas según el tipo de alimento y el tratamiento aplicado. Se determinó la efectividad de la alta presión sobre la actividad en polifenoloxidasas de varias frutas. Presiones de 600, 700, 800 y 900 MPa a 25° C inactivaron las polifenoloxidasas de manzanas, uvas, aguacates y peras, respectivamente. Mientras que las polifenoloxidasas de ciruelas requirieron 900 MPa a 50°C (Weemaes *et al.*, 1998). La diferencia de los sistemas enzimáticos en la estabilidad a la presión y temperatura probablemente es debido a los diferentes efectos mecánicos sobre las distintas conformaciones enzimáticas. La matriz alimentaria también influye en la resistencia/estabilidad a la presurización (Hendrickx *et al.*, 1998). Los efectos de activación observados pueden ser atribuidos a la configuración reversible y/o a los cambios de conformación de la enzima y/o a las moléculas del sustrato (Cano *et al.*, 1997).

Polifenoloxidasas de extractos de patatas y manzanas disminuyeron su actividad en un 60% a 800 MPa durante 10 min. Tanto champiñones como patatas y manzanas mostraron un oscurecimiento después de la presurización (Gomes y Ledward, 1996). En el guacamole (crema de aguacate) se evaluaron los efectos sobre la aceptabilidad sensorial y el color tras realizar tratamientos de presurización continuos utilizando ciclos o pulsos de alta presión y se midieron las actividades de la polifenoloxidasa y de la lipoxigenasa. Después de un tratamiento continuo durante 20 min a 689 MPa, la actividad de la polifenoloxidasa residual fue de 22 % y la de la lipoxigenasa se redujo hasta un 5% con sólo 10 min de tratamiento. La aceptabilidad sensorial y el color del guacamole tratado por la APH no fueron significativamente diferentes del guacamole no presurizado. El oscurecimiento del guacamole durante el almacenamiento a 5, 15 y 25° C después de la presurización, puede ser atribuido a la actividad de la polifenoloxidasa residual después de la alta presión y/o a su regeneración durante el almacenamiento (Palou *et al.*, 2000). Los cambios en las enzimas presurizadas son dependientes del pH, concentración del sustrato, estructura de la subunidad de la enzima y temperatura de presurización.

Otros autores investigaron los efectos de la alta presión sobre la actividad de las proteasas endógenas de músculo de pescado porque pueden ser responsables del ablandamiento en la textura. Las enzimas se inactivaron en mayor o menor medida, dependiendo de la cantidad de presión aplicada y de la duración de la presurización. La catepsina C de las especies de pescados *Pomatomus saltatrix* y *Calamus penna* perdieron más del 80% de su actividad cuando se trataron a presiones de 300 MPa durante 30 min. Bajo las mismas condiciones, las enzimas tripsina y quimiotripsina retuvieron un 30-40 % de su actividad. La actividad de todas las enzimas continuó en declive cuando se almacenaron a temperatura ambiente, pero fueron parcialmente recuperadas durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Parece

ser que la autólisis prevaleció sobre la reactivación a temperaturas de medio ambiente, mientras la reactivación predominó a bajas temperaturas debido a la disminución de la actividad proteolítica (Ashie y Lanier, 2000).

La Tabla 4 muestra las características de inactivación o la pérdida de actividad de algunas enzimas al someterlas a tratamientos de APH en distintas matrices alimentarias. Obsérvese por ejemplo que la transglutaminasa de surimi se inactiva a 300 MPa, mientras que la polifenoloxidasa de pera quintuplica su actividad a 400 MPa. Se aprecia también que los valores de alta presión para reducir la actividad varían mucho, incluso dentro de un mismo tipo de enzima como la polifenoloxidasa.

CALIDAD SENSORIAL DE LOS ALIMENTOS PRESURIZADOS

La APH modifica las características organolépticas de los alimentos. Casi en todos los casos actúa mejorándolas. El zumo de pomelo tratado por APH, a diferencia de los procesos térmicos convencionales, no posee el sabor amargo que le confiere el limoneno. Los zumos de otros cítricos, después del tratamiento a APH adquieren un sabor fresco, sin pérdida de la vitamina C y con una vida útil de 17 meses. Se ha comprobado que melocotones y peras tratados por APH permanecen esterilizados durante al menos 5 años. Peras y kakis adquieren una textura más blanda, se vuelven más transparentes y dulces cuando son tratados con APH. Tanto colores, como sabores y olores, no se ven afectados por la APH (Sangronis *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de algunos tipos de frutas como las peras se produce un oscurecimiento rápido después del tratamiento por altas presiones debido a que los valores de APH aplicados incrementan la actividad de la polifenoloxidasa (Asaka y Hayashi, 1991). Esto no ocurre en otras frutas como manzanas (Ibarz *et al.* 1996), tampoco en plátanos, ni en ciertos tubérculos (patatas y boniatos). Otros autores (Kimura *et al.*, 1994) afirman que las mermeladas obtenidas por APH retienen el sabor y el color de la fruta fresca, a diferencia de las mermeladas convencionales procesadas por calentamiento.

En cuanto al efecto de APH sobre la textura, se han observado efectos contrarios. Por un lado, los tejidos de la carne y filetes de pescado en *pre-rigor mortis*, tratados con APH se ablandan y se vuelven opacos. La carne fresca se ablanda en sólo 10 min y además se incrementa la digestibilidad de sus proteínas, mientras que a presión atmosférica se necesitan 2 semanas para su ablandamiento. Por otro lado, la estructura interna del tomate se endurece con la presurización.

Se utilizó una técnica histológica para evaluar las modificaciones producidas en la microestructura del melocotón y del mango utilizando los métodos clásicos de congelación y se comparó con las obtenidas mediante congelación a alta presión ("high pressure shift freezing"). Con este método, las muestras se

Tabla 4.- Inactivación de enzimas por alta presión hidrostática.

Enzima	Condiciones de tratamiento	Efecto	Matriz alimentaria	Referencia
Peroxidasa	230 MPa, 15 min, 43°C	Reducción de la actividad un 50 %	Puré de fresa	Cano <i>et al.</i> , 1997
Transglutaminasa	300 MPa, 10 min	Inactivación	Surimi	Ashie y Lanier, 2000
	600 MPa	Actividad inalterada	Suero de bovino	Ashie y Lanier, 2000
Fosfatasa alcalina	300 MPa, 5 min, 63°C	Inactivación	Leche de bovino	Ludikhuyse <i>et al.</i> , 2000
Lipoxigenasa	689 MPa, 15 min	Inactivación	Guacamole	Palou <i>et al.</i> , 2000
Polifenoloxidasa	689 MPa, 4 ciclos, 5 min	Reducción de la actividad un 15 %	Guacamole	Palou <i>et al.</i> , 2000
	900 MPa, 25°C	Inactivación	Melocotón	Weemaes <i>et al.</i> , 1998
	285 MPa, 15 min, 25°C	Reducción de la actividad un 40 %	Puré de fresa	Cano <i>et al.</i> , 1997
	6 MPa en CO ₂ , 1 min 43°C	Inactivación	Langosta	Kim <i>et al.</i> , 2000
	400 MPa, 10 min, 25°C	La actividad se multiplica por 5	Peras	Asaka y Hayashi, 1991
	400 MPa, 10 min, 25°C	Actividad inalterada	Manzanas, plátanos y boniatos	Asaka y Hayashi, 1991
	800 MPa, 5 min	Inactivación	Champiñones	Gomes y Ledward, 1996

congelaron a -20°C a presiones de 200 MPa, evitando así la formación de hielo. El nivel alto de superenfriamiento provoca una nucleación uniforme y rápida del hielo a través del volumen del alimento. Este método mantiene la estructura del tejido natural en casi toda su extensión, ya que se evitan los problemas asociados con gradientes térmicos. La congelación mediante altas presiones previene la pérdida de la calidad debido a la presencia de grandes cristales de hielo (Otero *et al.*, 2000). Los cambios producidos en las transiciones de fase al aplicar altas presiones se pueden aprovechar para ciertas operaciones de procesado y conservación en determinados alimentos (Knorr *et al.*, 1998).

La alta presión provoca la gelatinización del almidón, efecto que se manifiesta a presiones superiores a 400 MPa en harinas de trigo (Gomes *et al.*, 1998). La alteración de la estructura del almidón y de la proteína aplicando APH podría ser utilizada en el arroz para cocerlo en pocos minutos (Hoover *et al.*, 1989). La estructura cristalina del almidón de maíz y de arroz se destruyeron por presiones de 500 MPa, mientras que la del almidón de la patata no se vio afectada. Estos cambios de la estructura cristalina se deben al incremento de la densidad. Por consiguiente el mejoramiento de la estructura cristalina disminuye la densidad del grano (Hibi *et al.*, 1993). El grano de sorgo se sometió a presiones de 500 MPa a temperatura ambiente por periodos de 5 minutos, observándose un incremento en la calidad de la malta de esta gramínea (Dewar *et al.*, 1994). Grant *et al.*, (1941), ya observaron a mediados del siglo pasado la gelatinización y coagulación de la clara de huevo y comprobaron que se

debía a la desnaturalización proteica provocada por las altas presiones.

Los huevos sometidos a altas presiones no tienen el sabor y el olor sulfuroso característico provocado por el calentamiento. El calor produce la formación de lisinoalanina, promotora de estas características. Además, la lisinoalanina limita la asimilación de aminoácidos en el cuerpo humano (Hayashi, 1989b).

La APH (200-300 MPa) impide el incremento en la acidez del yogur ya que evita la reproducción de las bacterias lácticas (Hoover, 1993). Las altas presiones retardan las reacciones de fermentación, así, la leche no se agria en 12 días cuando se trata a 70 MPa y la aplicación de presiones de 1371 MPa durante 1 hora posponen la descomposición de la leche, que se puede consumir durante 4 días más (Johnston *et al.*, 1992).

Shimada *et al.* (1990) analizaron las características organolépticas de 11 alimentos tras someterlos a 500 MPa durante 15 min. Encontraron que en arroz y soja no se producían cambios con respecto a la textura y apariencia ni en cuanto al sabor y olor, pero la textura de patatas y otros tubérculos se volvió más flexible y el sabor de algunas patatas era más dulce. Peras y manzanas presurizadas resultaron ser más dulces y transparentes, además las peras adquirieron una textura más blanda. Estos autores afirman que el pardeamiento enzimático de la patata se incrementaba con la presurización, esto puede ser debido a un incremento en la actividad de la polifenoloxidasa, como se ha comentado previamente.

La APH inhibe las reacciones de condensación que inician el oscurecimiento no enzimático conocida como reacción de Maillard. Este efecto puede ser

beneficioso o no, dependiendo del alimento presurizado. Tamaoka *et al.* (1991) comprobaron que las reacciones de pardeamiento no enzimático fueron inhibidas aplicando 50-200 MPa. Otro grupo de investigación (Hill *et al.*, 1996) llegó a resultados similares, trabajando ambos grupos con sistemas modelos en lugar de matrices alimentarias.

La no alteración del sabor de los alimentos puede deberse al hecho de que la APH no ataca los enlaces covalentes, los cuales son típicos en el sabor, pero los enlaces no covalentes como los puentes de hidrógeno típicos de la estructura terciaria de las proteínas sufren modificaciones importantes (Sangronis *et al.*, 1997).

La APH representa una tecnología de procesamiento potencial para los alimentos marinos con los que se fabrica surimi. La gelificación de surimi mediante la APH se atribuye a un incremento de los enlaces cruzados de las cadenas de miosina en el músculo del pescado. Se investigaron los efectos de la APH en la consistencia del gel del surimi de pescadilla del Pacífico y de carbonero de Alaska. En los geles obtenidos con presurización la resistencia a la deformación se incrementó 3 veces con respecto a los geles obtenidos por calentamiento a 90° C en baño de agua. Tanto el surimi de carbonero como el de pescadilla mostraron un incremento significativo en la resistencia a la deformación del gel para todos los tratamientos de la presión excepto para los realizados a 50° C porque las proteasas en el surimi tienen una temperatura óptima de actividad en torno a 55° C. La relación entre la presión y los valores de deformación fue inversamente proporcional (Park, 2000).

Tanto la textura como la estructura histológica de zanahorias mejoraron cuando se expusieron a presiones de 200 a 400 MPa a temperaturas de -20° C. Cuando se congelaron a 100 MPa se observaron daños histológicos. Este hecho se basa en que la densidad del agua a 200 MPa a -20° C es mayor que la densidad a presión atmosférica. Utilizando presiones por encima de los 500 MPa se obtuvieron resultados de textura peores que utilizando 100 MPa debido a que durante la reducción de la presión o la descongelación existen estados de transición (Fuchigami *et al.*, 1997).

Un hecho similar se observó en extracto de soja (Kinu-Tofu) tras someterlo a APH y congelación. Se utilizaron presiones entre 100 y 700 MPa a -20° C durante 90 min. Se apreció en las partes externas del tofú congelado a 200 MPa y 400 MPa la formación de cristales pequeños de hielo. A partir de los 500 MPa el tamaño de los cristales se incrementó y cuando se trató a 700 MPa se formaron cristales de hielo grandes. Se observaron diferencias en el tamaño de los cristales de hielo entre el centro y las partes externas del tofú. Se encontraron más cristales pequeños en las partes externas que en las del interior del tofú, debido a la congelación rápida. La textura y estructura del tofú congelado a 200 MPa, 340 MPa y 400 MPa fueron mejores. A 100 MPa y arriba de los 500 MPa la ruptura del esfuerzo, la deformación y los poros del hielo se incrementaron, con lo que la calidad disminuyó (Fuchigami y Teramoto, 1997).

La podredumbre gris del tejido del melocotón produce cambios indeseables en la composición química

y física. Se estudió la mejora de la calidad del puré de melocotón utilizando un lavado con agua a altas presiones, entre 345 a 758 MPa, para eliminar la podredumbre gris. El proceso se mostró eficaz y puede ser utilizado comercialmente para procesos previos o posteriores al pelado. El lavado con agua a altas presiones puede ayudar a asegurar la calidad del puré y a una utilización más eficiente del tejido de la fruta sana (Tidwell *et al.*, 1997).

También se estudiaron los efectos de la alta presión sobre el comportamiento emulsificador de la proteína concentrada del suero. Muestras de soluciones y emulsiones de proteínas se sometieron a presiones de 800 MPa durante 40 min. Se observó que la lactoglobulina, la proteína del suero presente en el concentrado de proteína en un 55%, sufrió una agregación limitada después de someterla a un tratamiento de presurización. Mediante datos de densidad óptica se apreció que una agregación similar ocurre en el concentrado de proteína. Esto es debido probablemente a la exposición de las regiones hidrofóbicas y/o los grupos sulfídricos de las proteínas del suero facilitando la formación de oligómeros. Sin embargo, la agregación de la proteína del suero es la causa principal de la pérdida de la funcionalidad ya que ningún aumento en la superficie hidrofóbica debería mejorar la eficiencia emulsificadora. El tratamiento de APH a temperatura ambiente, no parece mejorar las propiedades de emulsificación de las proteínas del suero (Galazka *et al.*, 1995).

Aunque las características sensoriales de los alimentos en la mayoría de los casos mejoran o no sufren modificaciones con la APH, en otros sí se alteran y algunas veces de forma indeseable. La influencia de la APH en las características organolépticas de los alimentos depende del tipo de alimento y de las condiciones de presurización y no se puede generalizar, hay que estudiar cada caso en particular antes de plantearse la comercialización de un producto alimenticio presurizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Amagat, E. H. 1878. Sûr La Compressibilité de Gaz des Pressions Élevées. *Compt. Rend.* **87**, 432-434.
- Amagat, E. H. 1888. Solidification des Liquides par la Pression. *Compt. Rend.* **105**, 165-167.
- Amagat, E. H. 1893. Memoires sûr l'Élasticité et la Dilatabilité des Fluides jus'qu'aux tres hautes Pressions. *Annal. Chim. Phys.* **29**, 68-114.
- Arroyo, G.; Sanz, P. D.; Préstamo, G. 1997. Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 735-742.
- Asaka, M.; Hayashi, R. 1991. Activation of polyphenol oxidase in pear fruits by high pressure treatment. *Agric. Biol. Chem.* **55**(9), 2439-2440.
- Ashie, I. N y Lanier, T.C. 2000. Influence of High-Pressure processing on enzymes in fish Ch. 20 in Seafood enzymes, N. F. Haard and B. K. Simpson. P. 549-570. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Askar, A. 1998. Minimally processed tropical fruits. *Fruit Process.* **8**(8), 339-343.
- Balny, C.; Masson, P. 1993. Effects on high pressure on proteins. *Food Rev. Int.* **9**(4), 611-628.

- Balny, C. 1998. Pressure effects on protein oligomeric dissociation. *Progress in Biotech.* **15**, 187-204.
- Barbosa-Cánovas, G.V.; Pothakamury, U.R.; Palou, E.; Swanson, B.G. 1998. Procesado de alimentos con alta presión. En: Conservación no térmica de alimentos, pp. 9-48. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.
- Bridgman, P. W. 1940. Compression of 46 Substances to 50000 kg/cm². *Proc. Am. Acad. Arts. Sci.* **81**, 167-251.
- Bridgman, P. W. 1958. The Physics of High Pressure. G. Bell and Son Ltd. London.
- Bridgman, P. W. 1964. Studies in Large Plastic Flow and Fracture. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Butz, V. P.; Ries, J.; Traugott, U.; weber, H.; Ludwig, H. 1990. Hochdruckinaktivierung von Bakterien und Bakteriensporen. *Pharm. Ind.* **52**(4), 487-491.
- Cailletet, L. 1880. Gasverdickungs-Versuche, Wein, Sitz: Ber **12**, 199-208.
- Cailletet, L. 1891. Description du Monometre, Air Libre de 300 Metres Étable, la Tour Eiffel. *Compt. Rend.* **112**, 764-767.
- Cano, M. P.; Hernández, A.; Ancos de, B. 1997. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in Strawberry and orange products. *J. Food Sci.* **62**, 85-88
- Crossland, B.; Agnew, R. H.; Birks, A. W.; Ludlow, C. G.; Logan J. G. 1971. Proc. 27th Fluid Power Convention, Chicago, 117-135.
- Crossland, B. 1983a. Vessels for very High Pressures. In Developments in Pressure Vessel Technology. pp 69-109. Edited by R. W. Nichols. Applied Science Publishers. London and New York,
- Crossland, B. 1983b. Some Industrial Applications of High Pressure. En: High Pressure Measurement Techniques. Edited by G N Peggs. Applied Science Publishers. London and New York.
- Crossland, B. 1995. The development of high pressure processing. En: High pressure processing of foods. pp 7-27. Edited by Ledward, Jonhstn, Earnshaw and Hasting. Ed. Nottingham University Press.
- Cheftel, J. C. 1991. Applications des hautes pressions en technologie alimentaire. *Ind. Alim. Agric.* **108**, 141-153.
- Cheftel, J. C. 1995. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol. Int.* **1**, 75-90.
- Cheftel, J. C. 1998. Commercial pressurized foods in Japan. En: High pressure food science, bioscience and chemistry. N.S. Isaacs (pp. 506-507). The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Chong, P. L.; Fortes, P.A.; Jameson, D. M. 1985. Mechanisms of inhibition of Na/K ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* **260**, 14484-14490.
- Dewar, J., Joustra, S. M., Taylor, J. R. N. 1994. Sorghum malt effect of hydrostatic pressure on malt quality. 1994, pp 357-361. Proc. 4th Aviemore Conf. on Malting, Brewing and Distilling. Ed. Campbell, I. and Priest, F.G. Institute of Brewing. London.
- Drake, M. A., Harrison, S. L., Asplund, M., Barbosa-Cánovas, G., Swanson, B. G. 1997. High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of cheddar cheese. *J. Food Sci.* **62**, 4, 843-845.
- Eshtiaghi, M. N.; Knorr, D. 1993. Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* **58**(6), 1371-1373.
- Farkas, D. F.; Hoover, D. G. 2000. High Pressure Processing. *Journal Food Science*, Supplement. 47-64.
- Farr, D. 1990. High pressure technology in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **1**, 14-16.
- Fuchigami, M., Kato, N., Teramoto, A. 1997. High pressure freezing effects on textural quality of carrots. *J. Food Sci.*, **65**(1), 155-160.
- Fuchigami, M.; Teramoto, A. 1997. Structural and textural changes in kinu-tofu due to high pressure freezing. *J. Food Sci.* **62**(4), 804-808.
- Galazka, V. B.; Ledward, D.A. 1995. Developments in high pressure food processing. *Food Technol. Int. Eur.* 123-125.
- Galazka, V.B., Ledward, D.A., Dickinson, E., Langley, K.R. 1995. High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *Journal Food Science* **60**(6), 1341-1343.
- Gomes, M. R. A.; Clark, R.; Ledward, D. A. 1998. Effects of high pressure on amylases and starch in wheat and barley flours. *Food Chem.*, **63**(3), 363-372.
- Gomes, M. R. A.; Ledward, D. A. 1996. Effect og high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chem.* **56**(1), 1-5.
- Gould, G. W.; Sale, A. J. H. 1970. Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 335-346.
- Grant, E. A.; Dow, R. B.; Franks, W. R. 1941. Denaturation of egg albumin by pressure. *Science.* **94**, 616.
- Gross, M. and Jaenické, R. 1994. Proteins under pressure. *Eur. J. Biochem.* **221**, 617-630.
- Hayakawa, I; Kanno, T.; Yoshiyama, K.; Jujio, Y. 1994. Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization of *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Sci.* **59**, 159-163.
- Hayashi, R. 1989a. Use of high pressure in food. San-Ei Shuppan Co., Kyoto.
- Hayashi, R. 1989b. Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development. En: Engineering and Food. 2, pp 815-826. Spiess, W y Schubert, H. (ed.). Elsevier Appl. Sci. London.
- Hendrickx, M.; Ludikhuyze, L.; Van der Broeck, I.; Weemaes, C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Sci. & Technol.* **9**, 197-203.
- Heremans, K. 1982. High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **11**, 1-21.
- Heremans, K. 1995. High pressure effects on biomolecules. En: High pressure processing of foods. pp 81-97. Edited by Ledward, Jonhstn, Earnshaw and Hasting. Ed. Nottingham University Press.
- Hibi, Y., Matsumoto, T., Hagiwara, S. 1993. Effect of high pressure on the crystalline structure of various starch granules. *Cereal Chem.* **70**(6), 671-675.
- Hill, V. M.; Ledward, D. A.; Ames, J. A. 1996. Influence of high hydrostatic pressure and pH on the rate of Maillard browning in a glucose-lysine system. *J Agric. Food Chem.* **44**, 594-598.
- Hite, B. H. 1899. The effect of pressure on the preservation of milk. *W. Va Agric. Exp. Sta. Bull.* **58**, 15-35.
- Hite, B. H.; Giddins, N. J.; Weakly, C. E. 1914. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *West Virginia Agric. Exp. Sta. Bull.* **146**, 2-67.
- Hoover, D. G.; Metrick, C.; Papineau, A. M.; Farkas, D. F.; Knorr, D. 1989. Biological effects on high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* **43**(3), 99-107.
- Hoover, D. G. 1993. Pressure effects on biological systems. *Food Technol.* **47**(6), 150-154.

- Hoover, D.G. 1997. Minimally processed fruits and vegetables: reducing microbial load by nonthermal physical treatments. *Food Technol.* **51**(6), 66-71.
- Hurtado, J.L.; Montero, P.; Borderías, A.J. 2000. Prolongación de la vida útil de merluza (*Merluccius capensis*) sometida a altas presiones conservada en refrigeración. *Food Sci Tech. Int.* **6**(3), 243-249.
- Ibarz, A.; Sangronis, E.; Barbos-Cánovas, G. V.; Swanson, B. G. 1996. Inhibition of polyphenoloxidase in apple slices by high pressure treatment. Trabajo presentado en la reunión del IFT-1996.
- Johnston, D. E.; Austin, B. A.; Murphy, R. J. 1992. Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft.* **47**(12), 760-763.
- Kim, J., Marshall, M. R., Wei, C. 2000. Polyphenoloxidase. Capítulo 10 en *Seafood enzymes*, N. F. Haard and B. K. Simpson. pp. 289-290. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kimura, K.; Ida, M.; Yosida, Y.; Ohki, K.; Fukumoto, T.; Sakui, N. 1994. Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavor components, hue, and nutrients during storage. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(8), 1386-1391.
- Knorr, D. 1993. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technol.* **47**(6), 156-161.
- Knorr, D. 1994. Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology. Ch. 8 in *New methods of food preservation*, G.W. Gould. pp. 159-175. Blackie Academic & Professional.
- Knorr, D.; Schlueter, O.; Heinz, V. 1998. Impact of high hydrostatic pressure on phase transitions of foods. *Food Technol.* **52**(9), 42-45.
- Kowalski, E.; Ludwig, H.; Tauscher, B. 1992. Hydrostatic high pressure to sterilize food. 1. Application to pepper (*Piper nigrum* L.). *Dtsch. Lebensm-Rundsch.* **88**, 74-75.
- Kriss, A. E.; Mitskevich, I. N.; Cherni, N. E. 1969. Changes in ultrastructure and chemical composition of bacterial cells under the influence of high hydrostatic pressure. *Mikrobiologiya* **38**, 88.
- Larson, W. P.; Hartzell, T. B. 1918. The effects of high pressures on bacteria. *J. Infect. Dis.* **22**, 271-279.
- Ledward, D. A.; Johnston, D. E.; Earnshaw, R. G.; Hasting, A.P.M. 1995. En: *High pressure processing-The potential. High pressure processing of foods*. pp 1-6. Ed. Nottingham University Press.
- Linton, M., McClements, J. M., Patterson, M. 2000. The combined effect of high pressure and storage on the heat sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* **1**, 31-37
- Ludikhuyse, L., Claeyss, W., Hendrickx, M. 2000. Combined pressure-temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: a kinetic study. *J. Food Sci.* **65**(1), 155-160.
- McFarland, I. 1973. A New Fabrication Method for Large High Pressure Vessels. Proc. 2nd International Conference on Pressure Vessel Technology, 1151-1158.
- Mertens, B. 1994. Hydrostatic pressure treatment of food: equipment and processing. Capítulo. 7 en *New methods of food preservation*, G.W. Gould. pp. 135-158. Blackie Academic & Professional.
- Mertens, B. 1993. Packaging aspects of high-pressure food processing technology. *Pack. Technol. Sci.* **6**(1), 31-36.
- Mertens, B.; Deplace, G. 1993. Engineering aspects of high pressure technology in food industry. *Food Technol.* **47**(6), 164-169.
- Metrick, C.; Hoover, D. G.; Farkas, D. F. 1989. Effects of high hydrostatic pressure on heat-sensitive strains of *Salmonella*. *J. Food Sci.* **54**, 1547-1564.
- Meyer, R. S.; Cooper, K. L.; Knorr, D.; Lelieveld, H. L. M. 2000. High pressure sterilization of foods. *Food Technol.* **54**(11), 67-71.
- Mozhaev, V. V.; Heremans, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C. 1994. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *T. Biotechnol.* **12**, 493-501.
- Otero, L., Martino, M., Zaritzky., Solas, M., Sanz, P. D. 2000. Preservation of Microstructure in peach and mango during high pressure-shift freezing. *J. Food Sci.* **65**(3), 466-470.
- Osumi, M.; Yamada, N.; Sato, M.; Kobori, H.; Shimada, S.; Hayashi, R. 1992. Pressure effects on yeast cell ultrastructure: changes in the ultrastructure and cytoskeleton of the dimorphic yeast, *Candida tropicalis*. En Balny *et al.* (eds.). *High Pressure and Biotechnology*. John Libbey Eurotext, Montrouge, p. 9.
- Oxen, P. y Knorr, D. 1994. Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rodotorula rubra*. *Lebensmittel-Wiss. Technol.* **26**, 220-223.
- Palou, E., Hernández, C., López, A., Barbosa, G., Swanson, B., Welti, J. 2000. High pressure-processed guacamole. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* **1**, 69-75.
- Park, J, W. 2000. Surimi seafood: products, market, and manufacturing. Ch. 8 in *Surimi and surimi seafood*, J, W Park. P. 224-225. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Patterson, M.; Quinn, M.; Simpson, R.; Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J. Food Protection* **58**, 524-529.
- Perkins, J. 1820. On the compressibility of water. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **110**, 324-329.
- Perkins, J. 1826. On the progressive compression of water by a high degree of force, with trials on the effect of other fluids. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **116**, 541-547.
- Poulter, T. C. 1951. High pressure apparatus. US Patent No. 2554499.
- Pothakamury, U. R., Barbosa-Cánovas, G., Swanson, B. G. 1995. The pressure builds for better food processing. *Chem. Eng. Progress*. March. 45-53.
- Rademacher B.; Pfeiffer, B.; Kessler, H. G. 1998. Inactivation of microorganisms and enzymes in pressure treated raw milk. En: *High pressure food science and bioscience chemistry*, pp 145-151. Proc of the 35th Joint Meeting of the European High Pressure Research Group and Food Chemistry Group held at The University of Reading in 1997. Edited by Isaacs, Neil S. The Royal Society of Chemistry.
- Russel, A. D. 1982. The destruction of bacterial spores. Academic press, London, p. 259.
- Sale, A. J. H.; Gould, G. W.; Hamilton, W. A. 1969. Inactivation of bacterial spores by hydrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.* **60**(3), 323-334.
- Sangronis, E.; Pothakamury, U.; Ramos, A. M.; Ibarz, A.; Barbosa, G. V. 1997. La alta presión hidrostática: Una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria*, **33**, 32-43.
- Seyderhelm, I; Knorr, D. 1992. Reduction of *Bacillus stearothermophilus* spores by combined high pressure and temperature treatments. *ZfL (J. Food Industry)* **43**(4), 17-20.
- Shigehisa, T.; Ohmori, T.; Saito, A.; Taji, S.; Hayashi, R. 1991. Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated

- with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 207-216.
- Shimada, A.; Kasai, M.; Yamamoto, A.; Hatae, K. 1990. Effect of hydrostatic pressurization on the palatability of foods. En: *Pressure Processed Food-Research and Development*. Ed. R. Hayashi, pp 249-261. San-ei Pub. Co., Kyoto, Japan.
- Shimada, S.; Andou, M.; Naito, N.; Yamada, N.; Osumi, M.; Hayashi, R. 1993. Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 123-131.
- Smelt, J. P. M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *T. Food Sci & Technol.* **9**, 152-158.
- Stewart, C. M., Dunne, C. P., Sikes, A., Hoover, D. G. 2000. Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA 3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* **1**, 49-56.
- Styles, M. F.; Hoover, D. G.; Farkas, D. F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *J. Food Sci.* **56**(5), 1404-1407.
- Takahashi, K.; Ishii, H.; Ishikawa, H. 1991. Sterilisation of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. En: *High Pressure Science of Food*. Pp 225-232. Edited by Hayashi, R. Kyoto: San-Ei Pub. Co.
- Takahashi, K.; Ishii, H.; Ishikawa, H. 1993. Sterilization of bacteria and yeasts by hydrostatic pressurization at low temperature. En: *High pressure science for food*. Ed. Hayashi, R. pp 225-232. Kyoto: San-Ei Pub. Co.
- Taki, Y.; Awao, T.; Toba, S.; Mitsuura, N. 1991. Sterilization of *Bacillus* sp. spores by hydrostatic pressure. En: *High Pressure Science for Food* (Hayashi R. ed.), pp. 217-224. Kyoto: San Ei Pub. Co.
- Tamaoka, T.; Itoh, N.; Hayashi, R. 1991. High pressure effect on Maillard reaction. *Agric. Biol. Chem.* **55**(8), 2071-2074.
- Tauscher, B. 1995. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **200**, 3-13.
- Tidwell, A. N.; Gonzalez, A. R.; Fenn, P.; Marks, B. P.; Mauromoustakos, A. 1997. High pressure washing to remove decayed tissue and improve quality of clingstone peach puree. *Journal of Food Science* **62**(1), 131-134, 149.
- Walsby, A. E. 1972. Gas-filled structures providing buoyancy in photosynthetic organisms. En: *The effects of pressure on living organisms*. Eds Sleight, M. A. y Macdonald, A.G. p. 233. Academic Press. New York.
- Weemaes, C., Ludikhuyze, L., Van Den Broeck, I., Hendrickx, M. 1998. High pressure inactivation of polyphenoloxidases. *J. Food Sci.* **63**(5), 873-876.
- Yen, G. C.; Lin, H. T. 1998. Effects of high pressure and heat treatment on pectic substances and related characteristics in guava juice. *Eng. Proc.* **63**(4), 684-687.
- Zander, K. 1980. Some safety aspects of wire-wound pressure vessels and press frames for isostatic pressing and industrial applications in general. *Proc. 4th Int. Conf. on Pressure Vessel Technology*, 549-560.
- Zimmerman, F.; Bergman, C. 1993. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. *Food Technol.* **47**(6), 162-163.
- Zobell, C. E. 1970. Pressure effects on morphology and life processes of bacteria. En *High pressure effects on cellular processes*. Editor: Zimmerman, A.M. Acad. Press., New York and London.
- Zobell, C. E.; Cobet, A. B. 1962. Growth, reproduction, and death rates of *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *J. Bacteriol.* **84**, 1228-1236.