



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

**EFFECTO DE LA ULTRA ALTA PRESIÓN DE
HOMOGENEIZACIÓN EN LICUADO DE SOJA Y SU
COMPORTAMIENTO EN EL DESARROLLO DE UN PRODUCTO
FERMENTADO**

Memoria presentada para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

NELLY CRUZ CANSINO

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2008



Facultat de Veterinària



XaRTA

Xarxa de Referència
en Tecnologia dels Aliments
de la Generalitat de Catalunya

Membre de:



IT

XARXA DE CENTRES
DE SUPORT
A LA INNOVACIÓ
TECNOLÒGICA

VICTORIA FERRAGUT PÉREZ y MARTA CAPELLAS PUIG, profesoras titulares del área de Tecnología de los Alimentos del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Vetèrinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona*,

Informan:

Que la memoria titulada **”Efecto de la ultra alta presión de homogeneización en licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado“**, presentada por **Nelly del Socorro Cruz Cansino** para optar el grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos** por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha sido realizado bajo su dirección y considerándola finalizada, se autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 23 de Septiembre de 2008.

Dra. Victoria Ferragut Pérez

Dra. Marta Capellas Puig

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación aportada por:

El Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2003-03439) y la Comisión de la Unión Europea (CRAFT proyecto 512626).

El Programa de Mejoramiento Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP) de México y la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, a través de la financiación otorgada al autor para realizar los estudios de postgrado dentro del Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar con todas aquellas personas que de una forma u otra intervinieron en esta etapa de mi vida profesional y que en este momento escapan de mi memoria, de antemano, hago extensivo mi más sincero agradecimiento. A **Victoria Ferragut**, por su dirección, tutoría e instruirme en el desarrollo de la tesis, por la confianza depositada en mi al aceptarme en el proyecto, sin ello no estaría aquí, reitero mi enorme gratitud. A **Marta Capellas**, por su apoyo en el proyecto, dirección y asesoramiento en el desarrollo de la tesis, todo mi agradecimiento. A **Oriol**, sin su aportación no hubiera sido posible el desarrollo de la investigación. A **Joan Miquel**, por colaborar en todo momento en la planta piloto. A todos los compañeros integrantes de Tecno e Higiene, **Ramón, Josep, Jordi, Ana, Buenaventura, Martín, Mar, Bibiana, Roger, Raúl, Idoia, Diana, Nata, Rita, Vanesa, Abel, Tomás, Wilfido, Bety, Teresa, Silvia, Ibrahima**, por conoceros, por compartir y convivir en las comidas organizadas. A **Sonia**, presente siempre en el laboratorio. A **Manoli y Toni**, siempre disponibles para cualquier duda. A mis amigas/os, **Pam, Juli, Dora, Bego, Martina, Angela y Fabio**, por su amistad y cariño desinteresado, por estar siempre ahí, en las alegrías y las penas, por el apoyo incondicional en toda situación de trabajo y también por los estupendos momentos compartidos. A **Dolors**, quien ha sido un soporte muy fuerte y por brindarme todo su apoyo y cariño. A **Julia** de administración por ayudarme en todo trámite. A **Julia y Jordi** de informática, por solucionar los problemas de mi portátil. A mi **Madre y Padre** por sus mensajes de aliento cada vez que hablaba con ellos desde el otro continente. A mis Hermanos: **Ricardo, Jorge, Adriana y Milton**, a pesar de la distancia siempre recibía sus buenos deseos por e-mail. A la abuela **Antonia**, quien siempre ha sido para mí, un digno ejemplo a seguir luchando toda su vida. A **Doña Viky, Zuri, Cheque y Perico**, mi familia de Pachuca, siempre al pendiente de mí. Al **Dr. Luis Gil Borja**, Rector de la UAEH, por su confianza y apoyo incondicional en toda circunstancia laboral. A mi más que amigas/os de trabajo del ICSa: **Esther, Amanda, Zuli y Javier**, por apoyarme para realizar el doctorado, sabiendo que la carga de trabajo sería mayor para ellos. Al Programa de Mejoramiento Profesorado (**PROMEPE**), por la beca proporcionada. En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han convivido conmigo estos cuatro años, desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo amistad y cariño.

"La gratitud en silencio no sirve a nadie" (G.B. Stern).

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Listado de tablas	xiii
	Listado de figuras	xv
	Listado de abreviaturas	xvii
I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Soja	3
1.2.	Composición del haba de soja	3
1.3.	Licuado de soja	8
1.4.	Modificaciones en los componentes del licuado de soja debidas al procesamiento	14
1.5.	Licuado de soja fermentado con bacterias del yogur	17
1.6.	Ultra alta presión de homogeneización (UHPH)	23
1.7.	Aplicación de la UHPH en alimentos	31
1.7.1.	Efecto de la UHPH sobre la grasa	31
1.7.2.	Efecto de la UHPH sobre las proteínas	33
1.7.3.	Efecto de la UHPH sobre las propiedades físicas	37
1.7.4.	Efecto de la UHPH sobre los microorganismos	38
II.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	41
2.1.	Objetivos	43
2.2.	Plan de trabajo	44
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1.	Obtención de licuado de soja	51
3.2.	Equipo de ultra alta presión de homogeneización	51
3.3.	Tratamientos aplicados	53
3.4.	Análisis químicos	54
3.5.	Análisis microbiológico	54
3.6.	Microestructura del licuado de soja	55
3.7.	Análisis de tamaño de partícula	55
3.8.	Evaluación reológica	56
3.8.1.	Determinación de la viscosidad del licuado de soja	57
3.8.2.	Análisis de la viscoelasticidad de los yogures de soja	57
3.9.	Análisis de la desnaturalización de proteínas	58
3.10.	Determinación de estabilidad física del licuado de soja	58
3.11.	Análisis de color	58

3.12.	Determinación de volátiles	59
3.13.	Determinación de Lipoxigenasa (LOX)	60
3.14.	Determinación de la oxidación	60
3.15.	Análisis de la actividad del inhibidor de tripsina (IT)	61
3.16.	Determinación de digestibilidad de proteína <i>in vitro</i>	63
3.17.	Fermentación del licuado de soja	63
3.18.	Cinética del proceso de acidificación del licuado de soja	64
3.19.	Análisis de la acidez valorable	64
3.20.	Medida del pH	64
3.21.	Evaluación del proceso de coagulación	65
3.22.	Microestructura de los yogures de soja	65
3.23.	Análisis instrumental de textura de los yogures de soja	66
3.24.	Análisis de la capacidad de retención de agua (CRA) de los yogures de soja	66
3.25.	Análisis de sinéresis espontánea	67
3.26.	Evaluación sensorial del yogur de soja	67
3.27.	Análisis estadístico	67
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1.	Estudio del licuado de soja	71
4.1.1.	Composición química	71
4.1.2.	Microbiología	71
4.1.3.	Microestructura	72
4.1.4.	Tamaño de partícula	75
4.1.5.	Viscosidad	77
4.1.6.	Desnaturalización de proteínas	78
4.1.7.	Estabilidad física	80
4.1.8.	Color	81
4.1.9.	Componentes volátiles	83
4.1.10.	Lipoxigenasa	90
4.1.11.	Análisis de sustancias reactivas al TBA (TBARS)	92
4.1.12.	Determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina	94
4.1.13.	Estimación de digestibilidad de proteína <i>in vitro</i>	95
4.2.	Estudio de la coagulación	99

4.2.1.	Evolución del pH y de la acidez durante la fermentación	99
4.2.2.	Propiedades de coagulación	101
4.2.3.	Determinación de microestructura	105
4.2.4.	Determinación de textura	107
4.2.5.	Capacidad de retención de agua	110
4.2.6.	Evaluación sensorial del yogur de soja	112
4.3.	Estudio de almacenamiento del yogur de soja	115
4.3.1.	Composición química	115
4.3.2.	Evolución de pH y acidez del yogur de soja durante el almacenamiento	115
4.3.3.	Comportamiento de los microorganismos durante el almacenamiento	118
4.3.4.	Microestructura de los yogures de soja	121
4.3.5.	Propiedades viscoelásticas	123
4.3.6.	Firmeza del yogur de soja durante el almacenamiento	127
4.3.7.	Capacidad de retención de agua (CRA) del yogur de soja durante el almacenamiento	128
4.3.8.	Parámetros de color del yogur de soja durante el almacenamiento	130
4.3.9.	Actividad del inhibidor de tripsina (IT) en el yogur de soja durante el almacenamiento	134
4.3.10.	Oxidación en el yogur de soja durante el almacenamiento	136
V.	CONCLUSIONES	137
VI.	BIBLIOGRAFÍA	143

Listado de tablas

Tabla 1.	Suministro y uso de la soja en el mundo (millones de Tm) ¹ , 2005-2006.	4
Tabla 2.	Composición en aminoácidos de habas de soja (mg/g proteína) de las variedades Maple Arrow y OT89-16.	5
Tabla 3.	Composición de ácidos grasos de la soja.	6
Tabla 4.	Composición y otras propiedades fisicoquímicas de licuado de soja por métodos de procesamiento y almacenaje.	11
Tabla 5.	Condiciones de tratamiento y formulación en la elaboración de yogur de soja.	20
Tabla 6.	Estudios realizados con equipos de ultra alta presión de homogeneización en alimentos.	27
Tabla 7.	Recuento de poblaciones bacterianas (log UFC/ml \pm d.e.) de los licuados de soja PB y UHPH.	72
Tabla 8.	Valores promedio (\pm d.e) de los parámetros relacionados con el tamaño de partícula y temperatura de entrada y de salida de los licuados de soja PB, UHT y UHPH.	76
Tabla 9.	Índice de estabilidad durante el almacenamiento de los licuados de soja PB, UHT y UHPH.	81
Tabla 10.	Valores (promedio \pm d.e.) de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y diferencia de color (ΔE) en licuados de soja PB, UHT y UHPH.	83
Tabla 11.	Compuestos volátiles de licuados de soja PB, UHT y UHPH.	88
Tabla 12.	Valores medios (\pm d.e.) de temperaturas de tratamiento UHPH, actividad lipoxigenasa (LOX), sustancias reactivas al TBA (TBARS) y actividad residual de los inhibidores de tripsina (IT) de los licuados de soja.	91
Tabla 13.	Valores medios (\pm d.e.) de temperatura de los licuados de soja tratados por UHPH.	101
Tabla 14.	Parámetros de coagulación y valores de pH y acidez titulable (%) al tiempo de coagulación de licuados de soja tratados por AC, UHT y UHPH (promedio \pm d.e.).	104
Tabla 15.	Evolución de pH y acidez titulable (%) de yogur de soja elaborado con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH.	117
Tabla 16.	Valores medios (\pm d.e.) de Tang δ (Pa) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.	126
Tabla 17.	Valores medios (\pm d.e.) de G^* (Pa) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.	126

Tabla 18.	Valores medios (\pm d.e.) de firmeza (N) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.	127
Tabla 19.	Resultado de sinéresis espontánea (%) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento.	128
Tabla 20.	Resultado de parámetros de color de L^* , a^* , b^* y diferencia de color (ΔE) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.	133
Tabla 21.	Contenido en TBARS (mg/l) de licuados de soja tratados a 95°C, 15 min y por UHPH y sus respectivos yogures.	136

Listado de figuras

Figura 1.	Métodos de procesamiento de licuado de soja.	13
Figura 2.	Representación esquemática de (A) una válvula convencional de homogenización (APV-Gaulin, Rannie) y (B) una válvula de un homogenizador de alta presión de homogenización (Stansted model/DRG FPG74).	26
Figura 3.	Esquema del plan de trabajo de la primera etapa de estudio.	46
Figura 4.	Esquema del plan de trabajo de la segunda y tercera etapas de estudio.	47
Figura 5.	Representación esquemática de una válvula Stansted de un homogenizador de alta presión (Stansted model/DRG FPG74).	52
Figura 6.	Micrografías TEM de los licuados de soja PB, UHT y UHPH.	74
Figura 7.	Distribución de tamaño de partículas de licuados de soja PB, UHT y UHPH.	77
Figura 8.	Valores medios de viscosidad (mPa·s ± d.e.) de licuados de soja PB, UHT y UHPH.	78
Figura 9.	Termogramas de licuados de soja PB, UHT y UHPH.	80
Figura 10.	Curvas de digestibilidad <i>in vitro</i> (variación de pH vs tiempo) de licuados de soja PB, UHT y UHPH.	97
Figura 11.	Curvas de acidez y pH durante la fermentación de licuados de soja AC, UHT y UHPH.	100
Figura 12.	Representación general de curvas de coagulación expresadas como señal de atenuación en función del tiempo.	102
Figura 13.	Microestructuras de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH.	106
Figura 14.	Curvas de fuerza-distancia de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH, después de 24 horas de almacenamiento en refrigeración a 4°C.	109
Figura 15.	Firmeza de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH, analizada 24 horas después del almacenamiento en refrigeración.	110
Figura 16.	Porcentaje de agua retenida de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH, tras 24 h de almacenamiento en refrigeración.	112
Figura 17.	Porcentaje de preferencia de yogures de soja elaborados con licuados de soja UHT y UHPH.	113
Figura 18.	Supervivencia de los cultivos iniciadores en el yogur de soja elaborados con licuados tratados a 95°C 15 min y por UHPH.	120
Figura 19.	Micrografías de la matriz proteica de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 y por UHPH, correspondientes a los días 1 y 28 de almacenamiento a 4°C.	122

- Figura 20. Curvas de barrido de frecuencia de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, correspondientes a los días 1 y 28 de almacenamiento a 4°C. 124
- Figura 21. Evolución de agua expulsada inducida por centrifugación en los yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C. 129
- Figura 22. Actividad residual de los IT (%) de licuados de soja tratados a 95°C, 15 min y por UHPH y sus respectivos yogures. 135

Listado de abreviaturas

%	por ciento
β	beta
α	alpha
ΔE	diferencia de color
AR	tasa de agregación
BAPA	N $_{\alpha}$ _Benzoil-L-arginina 4-nitroanilina hidrocloreuro
BDMA	benzildimetilamina
BHT	butilhidroxitolueno
CaCl ₂ 2H ₂ O	cloruro de calcio dihidratado
CRA	capacidad de retención de agua
d.e.	desviación estándar
DBP	dibutil ftalato
DDSA	dodecil anhídrido succínico
DMSO	dimetil sulfóxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
FITC	isoticianato de fluoresceína
g	gramo
G*	módulo complejo
G'	módulo de almacenaje
G''	módulo de pérdida
GD	densidad del gel
HCl	ácido clorhídrico
HOT	tetróxido de osmio
J	joule
log	logaritmo
LOX	lipoxigenasa
MDA	malonaldehído
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
MPa	megapascales
N	newton

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	borato de sodio
NaCl	cloruro de sodio
NaN_3	azida de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
nm	nanómetro
Pa	pascal
PB	producto base
S	Svedburg
TBA	ácido tiobarbitúrico
TC	tiempo de inicio de coagulación
TCA	ácido tricloroacético
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TI	inhibidor de tripsina
TIA	actividad del inhibidor de tripsina
Tm	tonelada métrica
Tris	hidroximetil aminometano
UFC	unidades formadoras de colonias
UHPH	ultra alta presión de homogeneización
UHT	ultra alta temperatura
δ	tangente
μg	microgramo
μl	microlitro

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Soja

La soja (*Glycine max*) pertenece a la familia de las leguminosas, aunque por su contenido elevado de lípidos se incluye también en las oleaginosas. Sus vainas contienen tres o más semillas que se utilizan industrialmente para la extracción del aceite, y el residuo o pasta, rico en proteínas, se utiliza para la alimentación humana o animal. En las últimas décadas, se ha producido un gran desarrollo científico para su aprovechamiento integral. Su composición química depende de muchos factores, tales como la variedad de la semilla, el tipo de suelo, la fertilización, la temperatura ambiental, etc. (Badui, 2006).

La producción de soja ha aumentado sustancialmente en los últimos años: de 13 millones de Tm en 1939 se pasó a 107 millones de Tm en 1992, y esta cantidad se ha duplicado en los últimos 15 años (220 millones de Tm en 2005/2006). Estados Unidos produce casi el 70% mundial de la soja; Brasil y China son también productores importantes, compartiendo alrededor del 15% y 10% de la producción del mundo, respectivamente. Europa aporta menos del 1% a la producción mundial. En el mercado de exportación, los países europeos y Japón son los principales compradores de soja, que es exportada principalmente por Estados Unidos y Brasil (Kwok & Niranjana, 1995). En la tabla 1 aparecen datos sobre la producción y comercio mundial de soja (USDA, 2007).

1.2. Composición del haba de soja

En promedio, los lípidos y las proteínas juntos constituyen cerca del 60% de peso del haba de soja seca. El resto de materia seca está compuesto principalmente por glúcidos (35%) y cenizas (5%). La humedad del haba madura es usualmente del 13%, para asegurar su estabilidad durante el almacenamiento (Liu, 1999). Además, existen una serie de componentes residuales tales como saponinas, isoflavonas y componentes responsables del típico sabor de harina de soja cruda (Wolf, 1970). Los productos de soja han representado una gran fuente de proteína (ya que el haba de soja contiene alrededor del 40%) en la dieta de países orientales durante siglos (Molina *et al.*, 2001). Desde el punto de vista de su función biológica, las **proteínas** de soja son mayoritariamente proteínas de almacenamiento. Desde el punto de vista de la

solubilidad, la mayor parte de éstas son globulinas (glicininas y conglicininas), solubles en disoluciones salinas diluidas (Wolf, 1970).

Tabla 1. Suministro y uso de la soja en el mundo (millones de Tm)¹, 2005-2006.

	Producción	Importaciones	Exportaciones
Mundial ¹	220,56	64,14	63,97
Estados Unidos	83,37	0,09	25,58
Argentina	40,50	0,58	7,25
Brasil	57,00	0,06	25,91
China	16,35	28,32	0,35
Unión Europea	1,17	13,95	0,05
Japón	0,23	3,96	0,00
México	0,19	3,67	0,00

¹Las importaciones y exportaciones del mundo no pueden ser balanceadas debido a diferencias en los años locales de mercado y a retrasos entre exportaciones e importaciones informadas. Fuente:(USDA, 2007)

Sin embargo, la clasificación basada en la solubilidad de las proteínas, no resulta siempre adecuada para la caracterización de las proteínas de soja, ya que pueden darse varias asociaciones entre ellas que modifican la extracción de las diversas fracciones en un mismo medio. Por ello, una manera más precisa de denominar las proteínas es mediante sus coeficientes de sedimentación aproximados, usando la ultracentrifugación (Thanh *et al.*, 1975; Howard *et al.*, 1983). Bajo condiciones tamponadas apropiadas, las proteínas de soja presentan cuatro fracciones después de la ultracentrifugación: 2, 7, 11 y 15S; S hace referencia a las unidades Svedburg, que se relacionan con la velocidad de sedimentación por unidad de fuerza centrífuga. Según la distribución dada por Nielsen (1985), la fracción 7S, supone una tercera parte de la proteína extraíble y consta de, al menos, cuatro diferentes proteínas: hemaglutinina, lipoxigenasa, β -amilasa y β -conglicinina. Esta última representa la mitad del total de la 7S, por lo que también se le denomina a esta fracción β -conglicinina. La fracción 11S supone otra tercera parte de la proteína de soja y la constituye una única proteína llamada globulina 11S o glicinina; la

fracción 2S supone un 20% de la proteína e incluye los inhibidores de la tripsina y el citocromo C, mientras que la fracción 15S, está constituida únicamente por un 10% de la proteína extraíble y se cree que está formada por un polímero de glicinina.

La composición de **aminoácidos** de la proteína de soja, la cual determina el valor nutricional de las mismas, se presenta en la tabla 2, que lista la composición de dos variedades de soja.

Tabla 2. Composición en aminoácidos de habas de soja (mg/g proteína) de las variedades Maple Arrow y OT89-16.

Aminoácido	Variedad	
	Maple Arrow	OT89-16
Ácido aspártico	68,86 ± 3,39	81,77 ± 4,52
Trionina	41,94 ± 1,79	42,05 ± 1,22
Serina	54,05 ± 1,66	58,13 ± 2,12
Ácido glutámico	190,16 ± 3,42	200,07 ± 3,34
Prolina	52,91 ± 2,38	51,76 ± 1,18
Glicina	36,72 ± 0,15	35,97 ± 1,23
Alanina	40,23 ± 1,11	38,04 ± 2,07
Cisteína	25,00 ± 0,67	23,25 ± 1,03
Valina	54,27 ± 0,32	51,08 ± 0,23
Metionina	10,70 ± 0,31	9,64 ± 0,50
Isoleucina	51,58 ± 0,50	50,05 ± 1,37
Leucina	81,69 ± 0,73	78,83 ± 2,67
Tirosina	41,55 ± 0,64	38,83 ± 1,42
Fenilalanina	56,29 ± 0,63	52,62 ± 1,90
Histidina	34,38 ± 5,65	32,28 ± 4,93
Lisina	68,37 ± 1,06	62,06 ± 2,09
Arginina	77,16 ± 2,35	80,21 ± 4,63
Triptófano	12,73 ± 0,41	12,20 ± 0,47
4-Hidroxiprolina	1,40 ± 0,02	1,12 ± 0,08

Fuente: (Zarkadas *et al.*, 1993).

El aminoácido más abundante es el ácido glutámico, que junto con el ácido aspártico, constituyen una cuarta parte del total de aminoácidos; la lisina, arginina e histidina cubren una quinta parte. El haba de soja contiene todos los aminoácidos esenciales, es rica en lisina y es limitante en metionina y triptófano (Zarkadas *et al.*, 1993).

Los **lípidos** constituyen entre el 18 y el 24% del haba de soja (Tabla 3), de los que el 90% son triglicéridos, el 7% fosfolípidos y el 3% glicolípidos. Los ácidos grasos se distribuyen en un 15% de saturados y 80% de insaturados. El ácido graso más abundante en la soja es el ácido linoleico, representando aproximadamente la mitad del contenido total, aunque también contiene niveles considerables de otros ácidos grasos, como el ácido oleico y el ácido linolénico (Prawiradjaja, 2003; Liu, 1999; Sangwan *et al.*, 1986).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos de la soja

Ácidos Grasos	Porcentaje (%)
Saturados (total):	14,4
- Mirístico (C 14)	0,1
- Palmítico (C 16)	10,3
- Esteárico (C 18)	3,8
Insaturados (total):	80,6
- Oleico(C 18:1)	22,8
- Linoleico (C 18:2)	51,0
- Linolénico (C 18:3)	6,8
Otros.	5,0

Fuente: (Prawiradjaja, 2003).

El contenido de **glúcidos** del haba de soja se halla alrededor del 35% en peso seco. De esta fracción, sólo se encuentran trazas de monosacáridos, tales como la glucosa y la arabinosa; los oligosacáridos incluyen cantidades significativas de sacarosa, rafinosa y estaquiosa (Kennedy *et al.*, 1985; Kuo *et al.*, 1988), que corresponden al 7,49%, al 4,62% y al 0,75%, respectivamente (Knudsen *et al.*, 1991). La rafinosa y estaquiosa son de potencial importancia en la aceptación de la soja como alimento, porque su presencia

está ligada a molestias abdominales por flatulencia, ya que estos azúcares pasan intactos al intestino siendo fermentados por microorganismos anaerobios (Guimarães *et al.*, 2001). Los polisacáridos del haba de soja incluyen celulosa, hemicelulosa, pectina y trazas de almidón. Ellos son componentes estructurales que se encuentran principalmente en la pared celular, y suponen el 8% del haba de soja en peso seco.

Como componentes minoritarios de la soja se encuentran, en primer lugar, los **minerales**, de los cuales los sulfatos, los fosfatos y los carbonatos, constituyen aproximadamente el 5% de las cenizas en el haba seca; el **ácido fítico** es la principal fuente de fósforo en la soja, su contenido está en un intervalo del 1 al 1,47% en base seca (Liu, 1999). Las **vitaminas** incluyen la tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico (vitaminas solubles en agua), y las vitaminas A, E, D y K (liposolubles).

Otros componentes minoritarios, aunque importantes, son las **isoflavonas** y las **saponinas**. A estas últimas se les atribuye el sabor amargo y astringente del haba de soja. Sin embargo, tanto las isoflavonas como las saponinas, presentan interés por sus beneficios en la prevención y tratamiento de cáncer, osteoporosis y problemas cardiovasculares. El contenido de isoflavonas se encuentra entre 1261 y 3886 µg/g y las saponinas entre 0,62 a 6,16% del haba de soja (Wang & Murphy, 1994b; Tsukamoto *et al.*, 1995; Shiraiwa *et al.*, 1991; Yoshiki *et al.*, 1998; Messina, 1999).

A pesar del elevado contenido en proteínas y la calidad de éstas, reflejada en la presencia de aminoácidos esenciales, una de las desventajas del consumo de la soja y sus productos derivados, es la presencia de factores antinutricionales. De ellos, los más importantes son los inhibidores proteolíticos, comúnmente llamados **inhibidores de tripsina** y debido a la presencia de estos, la digestibilidad de la proteína de la soja se ve disminuida. Constituyen una pequeña parte de la proteína de soja (2,5%), aunque el 30-40% de cisteína está asociada con el inhibidor (Kwok & Niranján, 1995). Para alcanzar el 90% de inactivación de los inhibidores de tripsina, se requieren tratamientos térmicos intensos, por ejemplo 30 min a 100°C, o 22 min a 110°C (Liu, 1999). El sobrecalentamiento, para eliminar completamente la actividad de los inhibidores de la proteasa, puede destruir importantes aminoácidos tales como la cisteína, arginina y lisina. Por lo tanto, el tratamiento térmico es crítico para la elaboración de productos de soja con máximo valor nutricional (Kwok & Niranján, 1995).

Las habas de soja poseen una elevada actividad de la enzima **lipoxigenasa** (linoleato oxígeno oxidoreductasa EC 1.13.11.12), la cual es de particular interés por ser la causa principal de aromas indeseables comúnmente asociados a la soja, como a hierba o haba (Liu, 1999). El contenido y actividad de lipoxigenasa se relaciona con las variedades cultivadas, año de producción y localización geográfica, indicando que el clima juega un papel importante en la generación de la lipoxigenasa (Yuan & Chang, 2007a). Ésta, cataliza la hidroperoxidación del ácido linoleico y otros ácidos grasos poliinsaturados en presencia de oxígeno y los productos primarios son hidroperóxidos, que se forman tras la activación de la enzima nativa, seguida por la eliminación de un protón del grupo metileno activado y por la introducción del oxígeno en la molécula del sustrato con la formación del hidroperóxido (Robinson *et al.*, 1995). Los métodos desarrollados comercialmente para inactivar la lipoxigenasa se basan en la aplicación de calor en diversas etapas del proceso, siendo estos sistemas suficientes para inactivar la enzima; por ejemplo, temperaturas de entre 80°C y 100°C durante 10 minutos, son efectivas para inactivarla (Kwok & Niranjana, 1995).

1.3. Licuado de soja

Desde el punto de vista coloidal, el **licuado de soja** es, en términos generales, una emulsión aceite en agua. Sin embargo, como la gran mayoría de alimentos coloidales, presenta mayor complejidad, es decir, se trata de una dispersión coloidal formada por una fase acuosa en la que se encuentran las proteínas y las gotas de grasa en dispersión. El licuado de soja se asemeja a la leche en apariencia y composición y es, por tanto, una alternativa al consumo de leche para individuos con determinados problemas de intolerancia o alergias a los componentes de la leche (Johnson *et al.*, 1983), así como para personas que prefieren el consumo de productos de origen vegetal. Por todo ello, este producto está ganando popularidad en Europa en los últimos años.

El licuado de soja no ganaba popularidad en los países occidentales a causa de sus características organolépticas y debido a la disponibilidad de la leche de vaca barata (Ang *et al.*, 1985). Sin embargo, una vez identificados los componentes causantes de los aromas desagradables, las operaciones tecnológicas necesarias para inactivarlos, así como el conocimiento de las propiedades saludables que puede suponer el consumo de

leche de soja, es cuando ha experimentado un incremento en el consumo de dicho producto en occidente (Chen, 1989). Otro aspecto que ha contribuido a la expansión de este producto, es el desarrollo experimentado en el procesamiento del licuado de soja por ultra alta temperatura (UHT), que permite obtener un producto de características de flavor suaves, lo que añadido a la introducción de envases asépticos como formato más común, consigue un producto de larga duración a temperatura ambiente (Golbitz, 1995; Chen, 1989). Asimismo, esta tecnología ha sido beneficiosa para el transporte y distribución, por lo que las grandes compañías internacionales, han abierto sucesivamente nuevos mercados para su distribución (Kwok & Niranjana, 1995). El Reino Unido es el principal mercado europeo, seguido por Alemania, Francia y Holanda, y muchos otros países están comenzando a producirlo y comercializarlo, como México, India y Brasil (FAO, 2002; Keinan-Boker *et al.*, 2002). Las ventas de licuado de soja aumentaron de dos millones de dólares en 1980, a 207 millones de dólares en 1998, y es el alimento de consumo más creciente entre los productos derivados de la soja (FAO, 2002).

En la tabla 4 se muestra la variación en la composición química de licuados de soja, dependiendo de los diferentes sistemas de procesamiento y almacenamiento empleados. En promedio, el licuado de soja contiene un 91,8% de agua, 3,44% de proteína, 1,86% de lípidos, 2,85% de glúcidos y 1,41% de minerales (Iwuoha & Kenneth, 1997). Las proteínas y los lípidos cubren el 70 y 30% de las partículas del licuado de soja respectivamente (Ono *et al.*, 1996). Las **proteínas** que se encuentran en el licuado de soja son las globulinas 2S (8-22 g/100g), 7S (35 g/100g) y 11S (31-52 g/100g) (Zhang *et al.*, 2005). Las globulinas 11S (glicinina) y 7S (β -conglucina) contienen, además, alrededor de 0,8% y 2,3% de lípidos, respectivamente, el 50% de los cuales son fosfolípidos; la β -conglucina contiene el 1,4%, tres veces más fosfolípidos que la glicinina (Ono *et al.*, 1996). En los **lípidos**, los ácidos grasos predominantes son el ácido linoleico (54,8%), el ácido oleico (20,4%), el ácido palmítico (10,7%), el ácido α -linolénico (7,53) y el ácido esteárico (3,7%) (Peñalvo *et al.*, 2004). Respecto a los **glúcidos**, el licuado de soja contiene 37,83 mg/100ml de glucosa + galactosa, 494,69 mg/100ml de sacarosa y 13,33 mg/100ml de fructosa; los principales oligosacáridos son la rafinosa y estaquiosa, con un contenido de 69,6 y 360,2 mg/100 ml respectivamente (Hou *et al.*, 2000). Dentro de los **minerales**, se encuentran el potasio (328,3 mg /250ml), el magnesio (56,08 mg /250ml), el sodio (7,14 mg /250ml), el fósforo (97,18

mg /250ml) y el calcio (45,84 mg /250ml) (Achouri *et al.*, 2007a). En cuanto a las **vitaminas**, el licuado de soja es elevado en tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6) y ácido fólico (B9) (Kwok & Niranjana, 1995).

En comparación con la leche de vaca y la leche humana, el licuado de soja es rico en niacina, ácidos grasos insaturados y hierro, y tiene menos cantidades de grasa, glúcidos y calcio (Liu, 1999). El licuado de soja, además de consumirse como bebida, también es un producto intermedio para la fabricación del tofu y productos análogos al queso y yogur (Yuan & Chang, 2007a; Golbitz, 1995).

Tabla 4. Composición y otras propiedades fisicoquímicas de licuado de soja según métodos de procesamiento y almacenaje.

Parámetro	Método de procesamiento y almacenaje															
	BWD			UWD			TDF			TDL						
	Fresco	Almacenado		Fresco	Almacenado		Fresco	Almacenado		Fresco	Almacenado					
		29 ±1°C	10 ±2°C		-3 ±1°C	29 ±1°C		10 ±2°C	-3 ±1°C		29 ±1°C	10 ±2°C	-3 ±1°C			
Composición (%)																
Humedad	91,56	91,55	91,55	91,56	88,09	88,09	88,04	88,10	90,51	89,97	90,38	90,30	91,00	91,57	91,39	90,66
Proteína	3,07	2,83	3,01	3,04	4,06	3,51	3,93	4,00	3,85	3,49	3,73	3,80	3,84	3,69	3,79	3,81
Cruda																
Grasa cruda	1,82	1,77	1,78	1,82	1,90	1,88	1,86	1,90	1,95	1,93	1,93	1,93	1,93	1,91	1,87	1,93
Fibra cruda	0,28	0,32	0,30	0,27	0,67	0,75	0,71	0,68	0,11	0,17	0,13	0,13	0,08	0,06	0,06	0,09
Cenizas	0,94	0,94	0,94	0,93	0,92	0,91	0,92	0,90	1,92	1,92	1,88	1,91	1,92	1,91	1,91	1,90
Carbohidratos	2,33	2,60	2,43	2,36	4,36	4,87	4,56	4,42	1,66	1,54	1,73	1,94	1,23	0,86	0,84	1,34
Otras propiedades físicas y químicas																
pH	6,60	6,60	6,22	6,95	6,61	6,36	6,03	6,56	6,62	6,37	6,30	6,59	6,62	5,81	6,18	6,60
Acidez (%)	2,67	2,87	2,83	2,67	2,67	2,89	3,11	2,68	2,66	2,88	2,80	2,66	2,65	3,14	2,83	2,64
Viscosidad	38,00	40,33	38,00	40,00	50,00	50,00	50,00	50,67	45,00	42,33	39,30	44,00	45,00	36,67	39,33	43,67
Gravedad específica	1,055	1,049	1,052	1,052	1,250	1,250	1,250	1,253	1,155	1,132	1,122	1,151	1,152	1,086	1,083	1,152

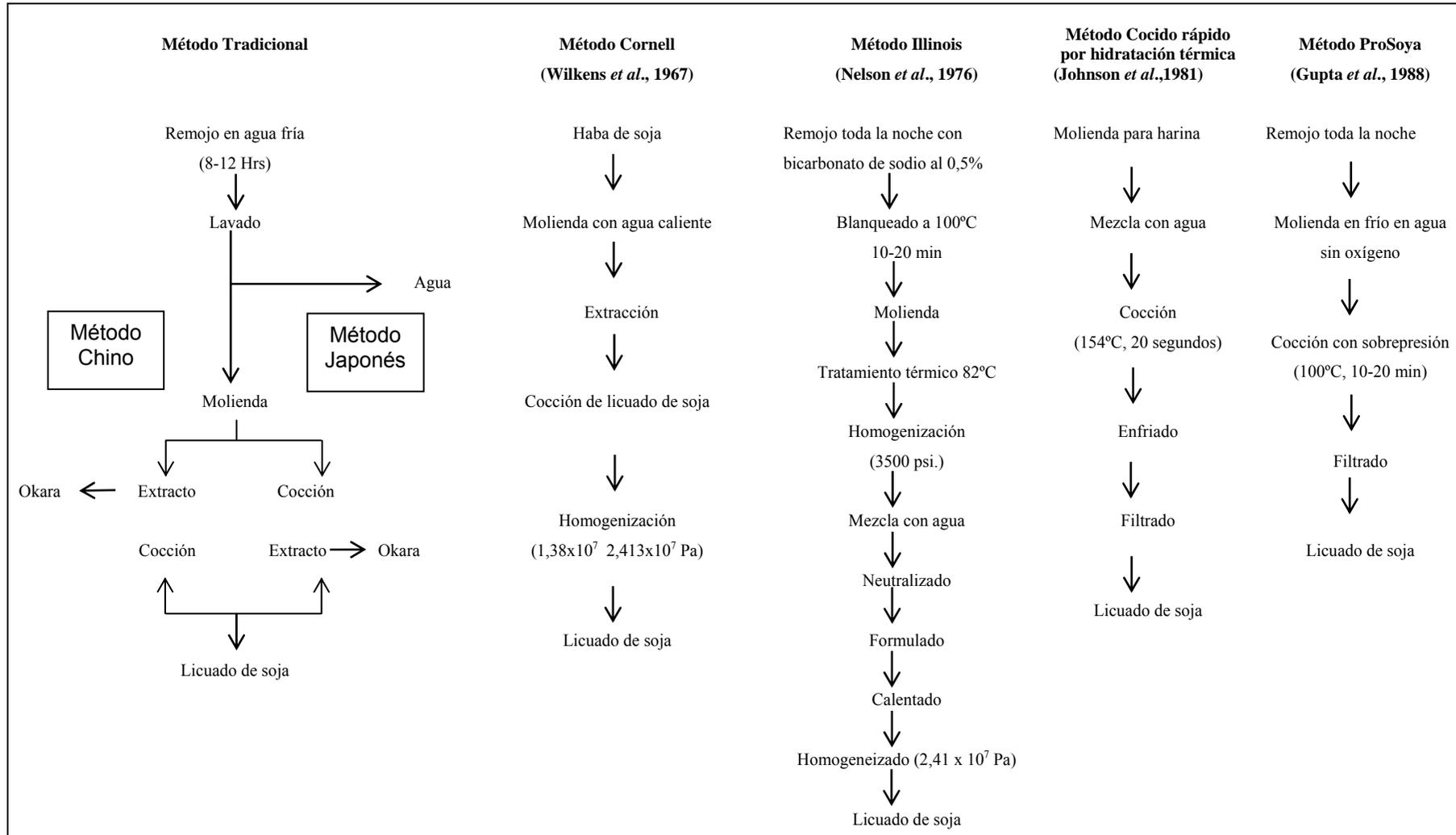
BWD, Licuado de soja de semillas blanqueadas y descascarilladas en húmedo. UWD, Licuado de soja de semillas sin blanqueo descascarilladas en húmedo. TDF, licuado de soja de semillas tostadas, descascarilladas en seco y molidas a tamaño de partícula de menos de 500 µm. TDL, licuado de soja de semillas tostadas, descascarilladas en seco y molidas a tamaño de partícula de más de 500 µm.

Fuente: (Iwuoha & Kenneth, 1997)

Para obtener el licuado de soja, se realiza una extracción acuosa de las habas de soja (Chen, 1989; Golbitz, 1995; Liu, 1999). En el proceso se involucran varias operaciones unitarias que, generalmente, son: la hidratación de la soja, el descascarillado, la molienda, el tratamiento térmico y la filtración (Oguntunde & Akintoye, 1991; Kwok & Niranjana, 1995; Iwuoha & Kenneth, 1997; Mullin *et al.*, 2001). El tratamiento térmico es un factor importante para obtener un licuado de soja con características específicas, dependiendo de los subproductos a desarrollar (Liu, *et al.*, 2004). Sin embargo, el tratamiento térmico influye en el color del licuado de soja y éste es uno de los problemas hacia donde se han dirigido muchos esfuerzos para remediarlo, así como también, la inactivación de los inhibidores de tripsina, la eliminación del flavor de la soja y la precipitación de sólidos durante el almacenamiento (Ang *et al.*, 1985). Estos problemas han incitado a investigadores a desarrollar nuevos sistemas de procesamiento para mejorar el producto.

En la figura 1 se muestra el método tradicional y las principales modificaciones del proceso general del licuado de soja. Algunos de estos ejemplos son el método de Cornell, el método de Illinois, la cocción rápida por hidratación hidrotérmica, la molienda fría al vacío (PROSOYA), los métodos que introducen la desodorización o los que introducen la utilización de antioxidantes y de álcalis (Liu, 1999; Kwok & Niranjana, 1995; Prawiradjaja, 2003). También se han propuesto modificaciones de los ingredientes crudos del licuado de soja y modificaciones genéticas de la soja, con el fin de inactivar la lipoxigenasa (LOX), eliminar el sabor desagradable (*off-flavor*) de la soja, y combinaciones de estos métodos para obtener un licuado de soja agradable y nutritivo, con alto contenido en sólidos y proteína (Kwok & Niranjana, 1995; Prawiradjaja, 2003).

Figura 1. Métodos de procesamiento de licuado de soja.



Fuente: (Liu, 1999; Kwok & Niranjana, 1995; Golbitz, 1995; Gupta & Gupta, 1988; Johnson et al., 1983; Prawiradajaja, 2003).

1.4. Modificaciones en los componentes del licuado de soja debidas al procesamiento.

En el procesamiento para la obtención del licuado de soja se barajan diferentes variables que dan lugar a condiciones muy diversas tales como altas o bajas temperaturas, tiempos cortos o prolongados de cocción, uso de ultra altas temperaturas (UHT), combinaciones de estas variables con procesamiento en medio alcalino, o con otros reactivos químicos. En todos estos pasos, se producen modificaciones químicas y/o fisicoquímicas y sensoriales del licuado de soja (Toda *et al.*, 2007; Kwok & Niranjana, 1995; Kwok *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 1999; Kwok *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 1997; Ono *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 1996).

Así, en el caso de las proteínas, a temperaturas de alrededor de 70°C se desnaturaliza la β -conglucina y a 90°C la glicina (Zhang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; German *et al.*, 1982). El fraccionamiento de las partículas de proteína del licuado de soja crudo mediante centrifugación diferencial da lugar a una distribución de tamaños en grupos de entre 200-120, 120-60, 60-50, 50-40 nm y otros de menos de 40 nm de diámetro; pero cuando se lleva a cabo el tratamiento térmico, el número de partículas de mayor tamaño (>100 nm) disminuye y las partículas de tamaño medio (100-40 nm) aumentan. Esto es debido a que los puentes disulfuro de las partículas de mayor tamaño se rompen y se unen a subunidades β de la fracción 7S y subunidades 11S, que son partículas de tamaño medio. Asimismo, el calentamiento provoca modificación en la fracción lipídica dando lugar por una parte a la interacción de proteína y fosfolípidos y, por otra, a la liberación de triglicéridos (Ono *et al.*, 1991; Ono *et al.*, 1996).

Por otra parte, los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan durante el procesamiento del licuado de soja, observándose a través del aumento del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA) después del tratamiento térmico (Wang *et al.*, 2001). El contenido de oligosacáridos se ve disminuido hasta un 8,87% después del tratamiento térmico, ya que se produce pardeamiento no enzimático de Maillard, que implica la reacción de los azúcares reductores con los grupos amino libres (Wang *et al.*, 2007; Kwok *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 1999; Lakshmanan *et al.*, 2006). Algunas vitaminas como la tiamina, el ácido ascórbico y la piridoxina, pueden sufrir pérdidas durante el tratamiento térmico. La extensión de la destrucción térmica de los nutrientes depende en gran medida de la

combinación tiempo-temperatura durante el proceso térmico (Kwok & Niranjana, 1995; Kwok *et al.*, 1998).

Además de los cambios que se producen en los nutrientes en el licuado de soja, el tratamiento térmico es muy importante para inactivar el inhibidor de tripsina (IT). El calentamiento produce una inactivación parcial del IT y se puede llevar a cabo mediante el blanqueado de las habas de soja, por cocción del haba mediante molienda con agua, o por calentamiento del licuado de soja después de la filtración (Kwok & Niranjana, 1995). El tiempo de calentamiento que se requiere para inactivar el 90% del IT puede variar de entre 30 a 75 min a 93°C, mientras que a 121°C el tiempo varía de 5 a 10 min (Van Buren *et al.*, 1964). Una parte de la actividad residual del IT permanece en el licuado de soja después de tratamiento térmico, atribuyéndose a que el inhibidor de tripsina es bastante estable al calor, por lo que para inactivar el IT aplicando temperaturas por debajo de 100°C se necesitan tiempos prolongados de tratamiento (Kwok & Niranjana, 1995). Sin embargo, los tratamientos térmicos prolongados pueden afectar excesivamente otras propiedades del licuado de soja, como el sabor, debido a las reacciones de pardeamiento, o la calidad de las proteínas, como resultado de degradación de aminoácidos y la pérdida de vitaminas (Friedman & Brandon, 2001; Kwok *et al.*, 1998).

Otro componente que requiere el uso del calor para su inactivación es la enzima LOX. Su actividad se puede reducir en el licuado de soja a través de la homogenización y el calentamiento moderado (Ediriweera *et al.*, 1987), con la finalidad, de evitar la formación de aldehídos (pentanal y hexanal) que son los principales compuestos responsables del desagradable flavor de la soja. A su vez, esta enzima provoca algunos otros efectos no deseables como son la destrucción de ácidos grasos esenciales, la degradación de color y el sabor desagradable (Ludikhuyze *et al.*, 1998b; Torres-Penaranda *et al.*, 1998). Para reducir el flavor típico de la soja, algunas empresas productoras de licuado de soja usan los métodos Cornell e Illinois (Figura 1) con algunas modificaciones, dependiendo de su uso en la elaboración de otros productos. Por lo general, las condiciones de tratamiento térmico para la inactivación de la enzima LOX, son el uso de temperaturas de entre 80 y 100°C durante 10 minutos (Kwok & Niranjana, 1995).

El licuado de soja generalmente presenta un color blanquecino. Sin embargo, las condiciones de tratamiento térmico y la composición, provocan cambios de color dando lugar a pigmentos marrones como resultado de la reacción de Maillard. La determinación del grado de oscurecimiento es útil en la evaluación de la calidad de la proteína del licuado de soja, debido a que las proteínas participan en la reacción y la evaluación cuantitativa de color marrón es considerada como un indicador de tratamiento térmico severo (Kwok & Niranjana, 1995; Kwok *et al.*, 1999; Achouri *et al.*, 2007a). Además, dado que el licuado de soja es una emulsión de aceite en agua, el color también puede ser afectado por los agregados de proteínas, por la concentración de lípidos y por el tamaño de las gotas de grasa (Chantrapornchai *et al.*, 1998; Chanamai & McClements, 2001).

Desde el punto de vista reológico, algunos licuados de soja exhiben cierto grado de carácter pseudoplástico (Fávaro Trindade *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001), este comportamiento aumenta con la intensidad del tratamiento térmico a causa de la desnaturalización de las proteínas, debido a que el calor modifica el estado de agregación de las mismas (Oguntunde & Akintoye, 1991). Este hecho, a la vez conlleva que, durante el tiempo de almacenamiento, pueda producirse la sedimentación de partículas y disminuir así la viscosidad del licuado de soja (Achouri *et al.*, 2007b).

El licuado de soja es un excelente medio de crecimiento para los microorganismos por su elevado contenido de humedad, un pH cercano a la neutralidad, por ser rico en componentes nitrogenados, grasa, azúcar, vitaminas y minerales (Achouri *et al.*, 2007a; Iwuoha & Ummunakwe, 1997; Oguntunde & Akintoye, 1991). Generalmente, la carga microbiana del licuado obtenido por tratamientos térmicos se encuentra por debajo de los límites de detección (menos de 10 UFC/ml) (Wang *et al.*, 2001; Achouri. *et al.*, 2007b). Bajo otros tratamientos térmicos, como la ebullición durante 1 min en un horno de microondas, la carga microbiana se reduce de $2,2 \times 10^3$ UFC/ml a 33 UFC/ml; aplicando vapor a 110°C durante 20 minutos, la carga microbiana se reduce a 25 UFC/ml y con un tratamiento a 121°C durante 15 minutos no se detectan microorganismos (Buono *et al.*, 1989). Sin embargo, los procesos diseñados para producir la destrucción total de bacteria termofílicas formadoras de esporas, pueden también tener como resultado un producto sobrecalentado y degradado en cualidades sensoriales y nutricionales (Kwok & Niranjana, 1995).

Todos estos cambios provocados por los tratamientos térmicos proporcionan las características sensoriales del licuado de soja, que comprende una serie de atributos relacionados entre sí, y se engloban como un leve flavor a soja, en donde se incluyen el sabor a hierba, a cocido, a astringente y amargo (Iwuoha & Ummunnakwe, 1997; Torres-Penaranda & Reitmeier, 2001). Diversos productos derivados del licuado de soja, como los obtenidos por fermentación láctica, han permitido disminuir aún más estas características sensoriales, produciendo atributos sensoriales con mayor aceptabilidad por parte de los consumidores (Donkor *et al.*, 2007b).

1.5. Licuado de soja fermentado con bacterias de yogur.

En los países orientales existen diversos productos tradicionales fermentados derivados de la soja, en los que intervienen mohos (tempeh), mohos, levaduras y bacterias ácido-lácticas (miso, salsa de soja) o bacterias del género *Bacillus* (natto). En los países occidentales, a finales del siglo pasado, creció el interés por fermentar el licuado de soja con bacterias ácido-lácticas, con el fin de, además de conservarlo, modificar o mejorar su flavor y textura y hacerlo más aceptable para el gusto occidental. A la vez, esta fermentación permite obtener nuevos productos, similares a los productos lácteos (Liu, 1999). Actualmente, después de haberse identificado las propiedades funcionales potenciales de los componentes de la soja (Liu, 1999), la combinación de éstas con los beneficios de los productos fermentados supone un valor añadido para los consumidores y una oportunidad de mercado para las industrias. Aunque, probablemente, la leche sea el primer alimento transformado gracias a una fermentación láctica, los alimentos de origen vegetal se han transformado y conservado tradicionalmente en todo el mundo con la ayuda de las bacterias ácido-lácticas (Steinkraus, 1997). Durante la fermentación ácido-láctica, los glúcidos fermentables son convertidos a ácido láctico por microorganismos como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus citrovorum*, etc (Steinkraus, 1997). Entre ellas, las que se utilizan para la elaboración de yogur son *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Tamime, 2002).

El **yogur, yoghurt o yoghourt** es el producto de la leche coagulada, obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Ministerio de la presidencia, 2002). Tradicionalmente se elabora con leche y sin otros ingredientes añadidos, pero para mejorar su textura, a la leche o leche descremada se le añade leche en polvo desnatada, concentrados de proteínas de suero, u otros ingredientes de origen lácteo o vegetal (Trachoo, 2002). Se han desarrollado muchas modificaciones para la elaboración del yogur con el fin de reducir el contenido de grasa y algunas de ellas incluyen ingredientes como las proteínas de soja o el licuado de soja (Drake *et al.*, 2000).

Un paso más en la utilización del licuado de soja ha sido su incorporación como sustrato principal o único de la fermentación ácido-láctica en las formulaciones. En este caso, el producto coagulado resultante no puede denominarse yogur y, en algunos casos, se utiliza el término *sogur* para referirse al licuado de soja fermentado con bacterias del yogur (Cheng *et al.*, 1990) o yogur de soja (Donkor *et al.*, 2007b). Con estas referencias, se utilizaran estos términos como equivalentes en el transcurso de la memoria. Inicialmente, a las formulaciones a base de licuado de soja se les adicionaba proteína de suero concentrado, leche en polvo desnatada, leche evaporada o lactosa en concentraciones similares a las del yogur, con el fin de reducir el aroma de la soja, evitar o eliminar los problemas de flatulencia, y elevar la intensidad del aroma de yogur (Buono *et al.*, 1990; Karleskind, 1991; Lee *et al.*, 1990). Posteriormente, la fermentación de los glúcidos del licuado de soja, específicamente, la estaquiosa y la rafinosa, por parte de las bacterias ácido-lácticas, ha sido examinada como medio para evitar los problemas de flatulencia y mejorar la aceptabilidad de estos sustratos (Garro *et al.*, 1999) y es usada, también, como un medio para reducir el aroma de soja y disminuir la actividad residual de los factores antinutricionales contenidos en el licuado de la soja (Donkor *et al.*, 2007b; Kanekar *et al.*, 1992). Hay mucho interés en el desarrollo del sogur sin necesidad de añadidos de origen lácteo, ya que ofrece ventajas nutricionales para el consumidor comparado con el yogur, como la reducción del contenido en colesterol, grasas saturadas y lactosa (Lee *et al.*, 1990). Todo ello está generando un interés considerable en un creciente segmento de consumidores preocupados por la dieta y a la salud (Donkor *et al.*, 2007b).

Durante el proceso en la elaboración del yogur de soja con bacterias de yogur las etapas que se incluyen son: el tratamiento térmico del licuado de soja, la inoculación de los cultivos iniciadores y la incubación. Estas tres etapas son, sin embargo, muy diversas, ya que el intervalo de temperaturas posibles durante el tratamiento térmico es muy amplio, la inoculación de los cultivos iniciadores puede realizarse entre el 0,3% y el 2%, y la temperatura de incubación puede variar entre 37 y 44°C (Tabla 5) (Lee *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1990; Omogbai *et al.*, 2005; Buono *et al.*, 1990a; Fávoro Trindade *et al.*, 1997; Garro *et al.*, 1999; Ashaye *et al.*, 2001). Los cultivos iniciadores que se utilizan en la producción del yogur determinan la producción de ácido y juegan un papel importante en el aroma del producto (Donkor *et al.*, 2007b). Estos microorganismos usan la sacarosa, la rafinosa y la estaquiosa para su crecimiento, lo que provoca la disminución del pH del producto (Garro *et al.*, 1998; Fávoro Trindade *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Omogbai *et al.*, 2005). La producción de ácido láctico depende de la habilidad de las bacterias para fermentar los glúcidos disponibles, que son hidrolizados por sus enzimas α - y β -galactosidasas. (Canganella *et al.*, 1999; Canganella *et al.*, 2000). En el caso de que se incluyan bifidobacterias en el cultivo iniciador también se produce ácido acético (Wang *et al.*, 2003).

Tabla 5. Condiciones de tratamiento y formulación en la elaboración de yogur de soja

Autor	Tratamiento del producto base	Formulación, inoculación e incubación	Cultivos iniciadores
(Fávaro Trindade <i>et al.</i> , 1997; Fávaro Trindade <i>et al.</i> , 2001)	Molienda de la soja durante 5 min hasta alcanzar 45-50°C	Licuado de soja con diferentes concentraciones de sólidos solubles (5, 7 y 9 °Brix) con una proporción de 1:1 de cultivos lácticos, con y sin homogenización después de la fermentación a 45°C / 4, 6 o 7 h.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .
(Nsofor & Chukwu, 1992a)	121°C / 25 min.	22% de sólidos de soja, 4% de sacarosa, 0,3% de citrato de sodio, 5% de cultivos lácticos, incubación a 42°C / 5 h.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .
(Garro <i>et al.</i> , 1999)	115°C / 20 min a pH 6,8-7,0.	1,5x10 ⁷ UFC/ml de cultivos iniciadores, incubación a 37°C / 6 h.	<i>Streptococcus thermophilus</i> CRL 813, <i>Lactobacillus casei</i> CRL 207, <i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 251 y <i>Bifidobacterium longum</i> .
(Lee <i>et al.</i> , 1990)	Blanqueado de habas en ebullición durante varios minutos.	Proteína de suero concentrada o leche desnatada en polvo, con 1% de cultivos lácticos e incubación a 37°C / 16 h.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .
(Buono <i>et al.</i> , 1990a)		Leche evaporada, 25% de fructosa, cultivos lácticos en proporción 1:1 incubación a 44°C / 3 h.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
(Cheng <i>et al.</i> , 1990)	121°C / 15 min.	0,5% gelatina, 2% lactosa, 0,15% acetato de calcio, 2% de inóculo, incubación 30°C / 18 h y 45°C / 16,5 h.	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC393) y <i>Streptococcus thermophilus</i> (ATCC 19987).
(Omogbai <i>et al.</i> , 2005)	121°C / 15 min.	5% de inóculo, incubación a 44°C / 8 h.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> .

Continúa.....

(Koca <i>et al.</i> , 2002)	60°C / 30 min.	Inóculo del 0,03% (w/w), incubación a 42°C hasta alcanzar pH 4,6.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
(Karleskind <i>et al.</i> , 1991)	85°C, homogenización durante 5 min a 12,000 rpm y filtración.	480 g de 2:1 (v/v) concentrado de licuado de soja, 15 g sacarosa, 26,5 g lactosa, 5 g aceite de maíz, 3,25 g estabilizante y 5,5 g emulsionante. Mezcla y pasteurización a 65°C / 30 min, 0,1% de inóculo e incubación a 40°C hasta alcanzar pH 4,5.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
(Yazici <i>et al.</i> , 1997)	80°C / 5 min.	85% agua, 10% harina de soja, 2,75% sacarosa y 2,25% aislado de proteína de soja, 2,75% sacarosa, 0, 0,35, 0,65, 1,00, 1,25 ó 1,50% (w/w) agente secuestrante, 1,55% (w/w) calcio, 0,03, 0,1 y 0,2% de inóculo, incubación a 39°C y 42°C hasta alcanzar pH 4,6.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> (YC-180) <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> sp (YC-085)
(Kovalenko & Briggs, 2002)	95°C / 15 min.	2% de inóculo, incubado durante 2-3 horas hasta alcanzar pH 4,6.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> (YC-180)
(Ashaye <i>et al.</i> , 2001)	Pasteurización durante 30 min.	20 y 30% de inóculo, incubación a 45°C / 7 h.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
(Donkor <i>et al.</i> , 2007b; Donkor <i>et al.</i> , 2007a)	Licuado de soja comercial.	2% inóculo, incubación a 42°C hasta alcanzar pH 4,5.	<i>Streptococcus thermophilus</i> St1342 y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb1466

Además, durante la fermentación del licuado de la soja se producen otros cambios en las propiedades del producto, que incluyen la viscosidad, la sinéresis, la textura y el color (Trachoo, 2002).

Por lo que respecta a la viscosidad, el sogur tiene un comportamiento no newtoniano y tipo gel, en el que el módulo G' que caracteriza el comportamiento elástico, es más alto que el módulo G'' , que caracteriza el comportamiento viscoso. La viscosidad del sogur puede variar dependiendo de la variedad de la soja, de la composición del licuado, del tratamiento térmico, del tipo de cultivos iniciadores y del uso de estabilizantes (Trachoo, 2002; Donkor *et al.*, 2007b). La concentración en sólidos solubles contenidos en el licuado de la soja es importante, ya que influye en la elasticidad del gel formado y la característica de textura final del producto (Fávaro Trindade *et al.*, 1997). Comparando el yogur con el yogur de soja, este último presenta mayor viscosidad y firmeza que el primero, lo que se atribuye a su alto contenido en proteínas (Lee *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1990). Un parámetro crítico en la elaboración de geles de coagulación ácida es la capacidad de retención de agua, relacionada con la sinéresis. Los geles de licuado de soja con alto contenido proteico desarrollan una mayor estructura, es decir, están formados por un mayor número de interacciones físico-químicas que mejoran su habilidad de atrapar el agua dentro de su red tridimensional y la resistencia a la sinéresis (Kovalenko & Briggs, 2002). Por lo que respecta al color, la blancura del yogur y del sogur, es debida a las propiedades de dispersión de la luz por la coagulación de las micelas de caseína y de las globulinas de la soja (Lee *et al.*, 1990) presentando coordenadas de luminosidad (L^*) de 81,97 y 68,58-80,80 respectivamente (Cheng *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990).

Los licuados de soja fermentados generalmente poseen propiedades sensoriales aceptables y aprobadas por los paneles de evaluación (Lee *et al.*, 1990; Liu, 1999; Donkor *et al.*, 2007b). Los atributos sensoriales más relevantes son: i) en textura visual: sinéresis; ii) en textura o consistencia en la boca: consistente, firme, cremoso, arenoso, grasoso y astringente; iii) en gusto: a soja, amargo, a aceite, ácido, dulce y a frutos secos (Fávaro Trindade *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 1990). Muchos estudios utilizan el yogur para compararlo con el yogur de soja (Drake & Gerard 2003; Nsofor & Chukwu 1992a; Lee *et al.*, 1990). Sin embargo, las respuestas de los integrantes de los paneles de análisis sensorial manifiestan que son productos diferentes, y por lo tanto, el yogur no puede ser usado como referencia (Fávaro Trindade *et al.*, 2001). Además, no siempre es

posible hacer la comparación directa entre yogur y el sogur, ya que existe una considerable variabilidad en el vocabulario usado por los catadores para describir las preferencias por los productos fermentados (Murti *et al.*, 1992).

1.6. Ultra alta presión de homogeneización (UHPH).

En la actualidad, los consumidores valoran positivamente aquellas características de los alimentos que les confieran mayor valor añadido, como son: i) la escasa manipulación del producto de partida; ii) la ausencia de aditivos o el empleo de aditivos naturales; iii) la conservación o potenciación de las propiedades nutricionales y de las cualidades beneficiosas para la salud. Todo ello conduce a los tecnólogos a investigar y desarrollar alimentos con un procesamiento mínimo, lo que consiste en la aplicación de una serie de tecnologías que, combinadas o no, garanticen la seguridad del alimento y aumenten su vida útil en términos microbiológicos, sensoriales y nutricionales a la vez que mantengan las características del producto final lo más cercanas posible a las del producto fresco. Durante las pasadas décadas han sido desarrolladas distintas alternativas a los métodos tradicionales de conservación. La alternativa más reciente a los tratamientos térmicos es la aplicación de la alta presión. Dentro del campo de las altas presiones existen dos procesos que tienen características comunes pero difieren entre ellos en lo referente a sus sistemas de aplicación y en muchos casos, en los mecanismos de destrucción de microorganismos que predominan durante el procesamiento. Estos procesos son las altas presiones hidrostáticas (HHP), aplicadas en sistemas discontinuos o semicontinuos, y la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) (Guamis *et al.*, 2006).

La UHPH es una tecnología basada en los mismos principios de diseño de la homogeneización convencional pero que permite alcanzar presiones muy superiores, de hasta 300-400 MPa. La homogeneización convencional (Figura 2 A) se utiliza desde hace muchos años en la industria láctea, con presiones entre 18 y 20 MPa, para reducir el tamaño del glóbulo graso, con el fin de evitar el desnatado y la coalescencia de la grasa durante el período de almacenamiento de la leche o la elaboración de yogur y, en los productos lácteos como natas y helados, obtener una emulsión fina con propiedades precisas de textura y un alto grado de estabilidad (Desrumaux & Marcand, 2002). Con

el paso del tiempo, la tecnología de homogenización ha evolucionado y la demanda de productos con mejor estabilidad ha generado avances tecnológicos como la UHPH, que utiliza presiones superiores a las de la homogenización convencional (Kielczewska *et al.*, 2003; Hayes & Kelly 2003a; Hayes & Kelly 2003b; Thiebaud *et al.*, 2003; Paquin, 1999).

El mecanismo de un homogenizador de UHPH consiste de un generador de alta presión, ensamblado a una válvula diseñada especialmente para resistir la aplicación de presiones muy altas (Figura 2 B). En cualquier tipo de válvula de homogenización, el fluido procesado pasa a través de una sección convergente llamada espacio de la válvula, que es el espacio comprendido entre el cabezal y el asiento de la válvula. Este espacio puede reducirse aplicando más fuerza al cabezal para aproximarlo al asiento de la válvula, lo que incrementa el nivel de presión (Floury *et al.*, 2004a). El fluido es bombeado por un estrecho espacio a través del asiento contra el cabezal de la válvula, produciéndose un choque contra éste y el anillo de impacto, con lo que sufre una ultrarrápida depresión. Consecuentemente, se producen una combinación de fuerzas de cizalla, cavitación, turbulencia y coalescencia en la superficie del fluido que, entre otros efectos, puede causar la ruptura de las células microbianas (Floury *et al.*, 2004b). Debido al incremento de la presión y a la fricción, se produce también un aumento de temperatura de, aproximadamente, 2-2,5°C por cada 10 MPa, de manera que el grado de destrucción microbiana dependerá no sólo de la presión aplicada sino, también, de la temperatura alcanzada. Es posible jugar con el efecto térmico, minimizándolo o potenciándolo al máximo, dependiendo de la sensibilidad de la matriz y del objetivo que se pretenda alcanzar. Esto puede hacerse introduciendo el producto a bajas temperaturas y controlando el calentamiento en la válvula (modalidad sin efecto térmico), o de forma que la temperatura alcanzada durante la homogenización sea la máxima posible, introduciendo el producto a temperaturas iniciales a partir de 40 °C (modalidad con efecto térmico), lo que permitirá alcanzar temperaturas muy superiores aunque durante un tiempo muy breve <0,7 s (Guamis *et al.*, 2006).

El primer equipo de alta presión de homogenización que se introdujo en la industria alimentaria, en 1987, fue el *Microfluidizer*, patentado en 1985. Inicialmente alcanzaba presiones de 100 MPa y más adelante, los nuevos equipos alcanzaron 300 MPa. Posteriormente se presentó otro diseño, el *Emulsiflex*, de la compañía *Avestin*, semejante a un homogenizador convencional pero con una válvula de diseño específico,

que permite alcanzar presiones de 220 MPa, y con prototipos en desarrollo para alcanzar hasta 500 MPa (Paquin, 1999). Esta compañía actualmente produce equipos a nivel industrial que alcanzan 200 MPa (<http://www.avestin.com/products.html>). El homogenizador *Stansted* (Figura 2 B) es un equipo que incorpora material cerámico en su válvula, que lo hace capaz de soportar presiones hasta 400 MPa. Lo interesante de este equipo es que la geometría de la válvula ha sido modificada respecto a la de válvula clásica APV-Gaulin (Figura 2 A) y el paso del fluido en el equipo *Stansted* se realiza de manera inversa. Esta nueva tecnología permite aumentar la presión de homogenización, debido a que el paso entre la válvula y el asiento en este diseño es mucho más estrecho (2-5 μm) que en la válvula APV-Gaulin (10-30 μm). Además, este homogenizador cuenta también con una segunda válvula neumática, localizada después de la primera válvula de cerámica, que tiene la capacidad de soportar presiones por encima de 50 MPa. Por lo tanto, se pueden realizar procesos utilizando la primera válvula de presión (primera etapa) o la segunda válvula de presión (segunda etapa) o una combinación de ambas. El uso y aplicaciones de los equipos que se han utilizado en estudios con investigación con alimentos se presentan en la tabla 6.

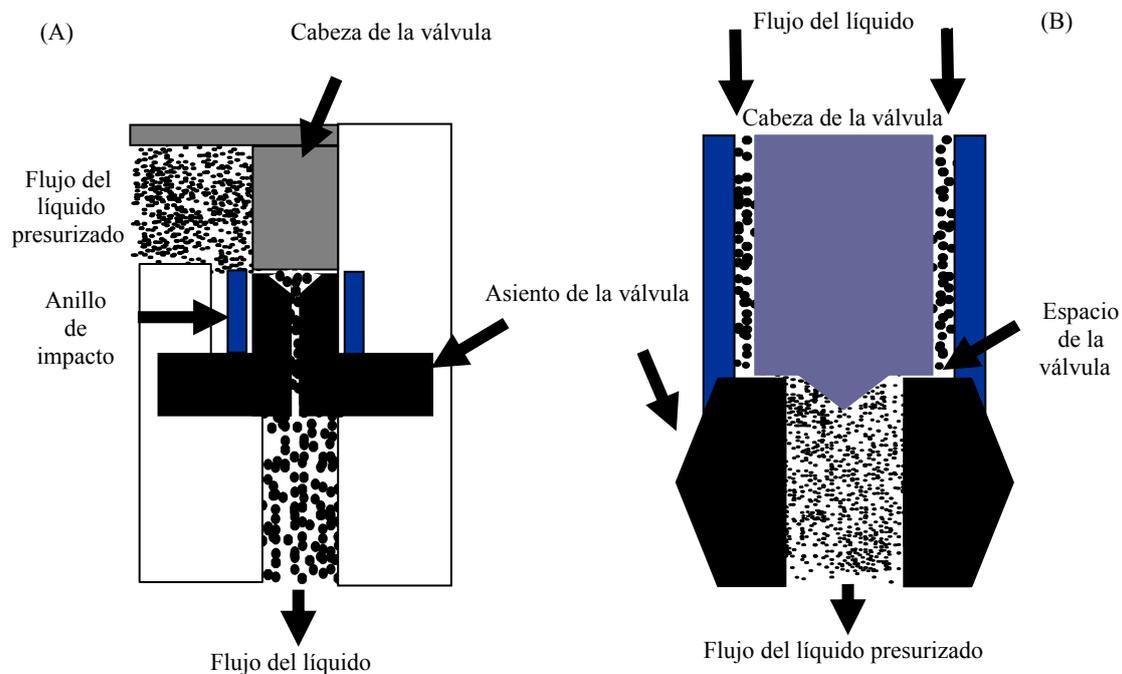


Figura 2. Representación esquemática de (A) una válvula convencional de homogenización (APV-Gaulin, Rannie) y (B) una válvula de un homogenizador de alta presión de homogeneización (Stansted model/DRG FPG74). Fuente: (Floury *et al.*, 2004b)

Tabla 6. Estudios realizados con equipos de ultra alta presión de homogeneización en alimentos.

Equipo	Producto	Presión (MPa)		Temperatura (°C)			Ciclos	Autores
		1ª etapa	2ª etapa	T ₀	T ₁	T ₂		
Microfluidizer®. Microfluidics International Corporation (MFIC), Newton, MA, USA.	Mezcla para helado inoculado con <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580.	50-200	—	33 - 50	—	—	—	(Feijoo <i>et al.</i> , 1997)
Microfluidizer®. Model 110-T, MFIC, Newton, MA, USA.	Almidón de harina de arroz al 22, 32 y 36 %.	62-100	—	—	—	—	2	(Guraya & James, 2002)
Microfluidizer®. M-140K, MFIC, Newton, MA, USA.	Emulsión de concentrado de proteínas séricas con aceite de girasol.	100 y 200	—	—	—	—	1,2,3 y 4	(Perrier-Cornet <i>et al.</i> , 2005)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Solución acuosa de β-lactoglobulina .	0-140	—	—	—	—	—	(Subirade <i>et al.</i> , 1998)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Leche cruda inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> LSD 105-1, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150, <i>Salmonella enterica</i> serotipo Enteritidis ATCC 13047 y <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090.	100, 200 y 300	—	25	—	—	1,3 y 5	(Vachon <i>et al.</i> , 2002)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Leche, tampón fosfato y permeado de suero inoculados con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LM0230.	100 y 200	—	—	—	—	1,3,5	(Moroni <i>et al.</i> , 2002)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato inoculado con <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria innocua</i> y <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium, <i>Shigella flexneri</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Escherichia coli</i> MG1655 y LMM1010	100 y 300	—	—	—	42	—	(Wuytack <i>et al.</i> , 2002)

Continúa.....

Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato inoculado con <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> .	100-200	—	—	—	—	—	(Wuytack <i>et al.</i> , 2003)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Emulsión de concentrado de proteína de soja con aceite de soja.	70	5	—	—	—	—	(Roesch & Corredig, 2003)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato inoculado con <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> .	100 y 300	—	5 - 50	—	18	—	(Diels <i>et al.</i> , 2003)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato inoculado con <i>Escherichia coli</i> MG 1655.	100 y 300	—	5 - 50	—	18	—	(Diels <i>et al.</i> , 2004)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Leche en polvo desnatada reconstituída.	41, 114 y 186	—	22	—	—	2, 4 y 6	(Sandra & Dalgleish, 2005)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato de potasio <i>Escherichia coli</i> K12 MG1655.	50-300	—	25	—	—	—	(Diels <i>et al.</i> , 2005)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Tampón fosfato y zumo de naranja inoculados con <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Penicillium</i> ssp.	100, 150 y 200	—	25	—	—	1, 3 y 5	(Tahiri <i>et al.</i> , 2006)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C5. Ottawa, Canada.	Leche cruda desnatada.	179	—	25	—	—	6	(Sandra & Dalgleish, 2007)
Avestin Inc. , Model Emulsi-Flex-C160. Ottawa, Canada.	Leche cruda inoculada con <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	200	—	28	—	—	5	(Kheadr <i>et al.</i> , 2002)
Model Emulsi-Flex-C50. Avestin Inc., Ottawa, Canada.	Zumo de naranja.	170	—	30	—	—	—	(Lacroix <i>et al.</i> , 2005)
GEA Niro Soavi. , Panda. Parma, Italia	Leche.	100	—	—	—	—	—	(Guerzoni <i>et al.</i> , 1999)
GEA Niro Soavi. , Panda. Parma, Italia.	Leche.	75	—	—	40	—	—	(Lanciotti <i>et al.</i> , 2004a)
GEA Niro Soavi. , Panda. Parma, Italia.	Leche cruda inoculada con <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactococcus spp lactis</i> .	100	—	—	—	—	—	(Lanciotti <i>et al.</i> , 2004b)
GEA Niro Soavi. , Panda. Parma, Italia.	Leche desnatada en polvo inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A,	75, 100 y 130	—	—	—	—	—	(Vannini <i>et al.</i> , 2004)

Continúa.....

	<i>Salmonella enteritidis</i> E4, <i>Salmonella typhimurium</i> T5, <i>Escherichia coli</i> 555, <i>Staphylococcus aureus</i> ST1, <i>Bacillus subtilis</i> A2, <i>Lactobacillus plantarum</i> E547, <i>Lactobacillus helveticus</i> 15009, <i>Pseudomonas putida</i> 754, <i>Proteus vulgaris</i> PV1.								
Rannie , Mini-Lab ŽAPV, Wilmington, MA, USA.	Productos lácteos inoculados con <i>Lactobacillus delbriekii</i> spp <i>bulgaricus</i> 11842.	135	—	—	—	—	3	(Bury <i>et al.</i> , 2001)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Emulsión de aceite de soja y solución acuosa de proteína sérica.	20, 150 y 300	—	4	—	—	—	(Floury <i>et al.</i> , 2000)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Emulsión de aceite de girasol y solución acuosa de proteína sérica.	50 - 350	—	5	—	40	-	(Desrumaux & Marcand, 2002)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Emulsión de aceite de girasol y solución acuosa de globulina de soja 11S.	50 - 350	—	—	—	—	—	(Floury <i>et al.</i> , 2002a)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Solución de metilcelulosa.	20 - 350	—	—	—	—	—	(Floury <i>et al.</i> , 2002b)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Emulsión de aceite y metilcelulosa.	20 - 350	—	5 y 20	—	—	—	(Floury <i>et al.</i> , 2003)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG7400 H., Essex, UK.	Leche.	100 - 300	—	4, 14 y 24	—	29,8 - 78,0	—	(Thiebaud <i>et al.</i> , 2003)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Model 'nm-GEN' 7400H. Essex, UK.	Leche estandarizada 0-10% de grasa.	50 - 200	3-20	6-10	—	26,4 - 53,6	—	(Hayes & Kelly, 2003a)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Emulsión aceite de girasol y Tween 20.	200 - 350	—	—	—	—	—	(Floury <i>et al.</i> , 2004b)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Essex, UK.	Leche entera.	200	—	10 - 55	—	56,4 - 80,0	—	(Datta <i>et al.</i> , 2005)	
Stansted Fluid Power Ltd. , Modelo FPG7400H. Essex, UK.	Leche entera.	100 - 300	—	4 y 24	30,2-75,8	13,5	1, 2 y 3	(Picart <i>et al.</i> , 2006)	

Continúa.....

Stansted Fluid Power Ltd. , Model DRGFPG7400H:350. Essex, UK.	Leche y zumo de naranja inoculados con <i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090).	300	30	6 y 20	—	16 - 18	—	(Brinez <i>et al.</i> , 2006a)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG7400H:350. Essex, UK.	Leche y zumo de naranja inoculados con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565 y <i>Staphylococcus carnosus</i> CECT 4491.	300	30	6 y 20	—	16 - 18	—	(Brinez <i>et al.</i> , 2006c)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG11300. Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% grasa.	200 - 300	—	30 y 40	—	—	—	(Pereda <i>et al.</i> , 2006)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG11300. Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% grasa.	100, 200 y 300	—	30 y 40	64,7-103,0	-	—	(Pereda <i>et al.</i> , 2007)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG 11300. Essex, UK.	Leche.	100, 200 y 300	- y 30	30 y 40	—	25 - 36	—	(Serra <i>et al.</i> , 2007)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG11300. Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% grasa.	100, 200 y 300	- y 30	30	33-41	40	—	(Zamora <i>et al.</i> , 2007)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG11300:400 Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% grasa.	200 - 300	—	30 y 40	78,5-101,5	21 - 27	—	(Pereda <i>et al.</i> , 2008a)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG11300, Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% grasa.	200 - 300	—	30 y 40	78,5-101,5	—	—	(Pereda <i>et al.</i> , 2008b)
Stansted Fluid Power Ltd. , Model FPG11300, Essex, UK.	Leche desnatada.	100 - 300	- y 30	30	—	23,4 - 33,2	—	(Serra <i>et al.</i> , 2008a)
Stansted Fluid Power Ltd. , FPG 11300:400. Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% de grasa.	200 - 300	—	40	—	—	—	(Serra <i>et al.</i> , 2008b)
Stansted Fluid Power Ltd. , FPG 11300:400. Essex, UK.	Leche estandarizada al 3,5% de grasa.	200 - 300	—	30 y 40	—	—	—	(Serra <i>et al.</i> , 2008c)

T₀ Temperatura de entrada de la muestra, T₁ Temperatura después de la primera válvula de presión, T₂ Temperatura de salida.

1.7. Aplicación de la UHPH en los alimentos.

La alta presión de homogenización (HPH) fue usada inicialmente en la industria química, cosmética y farmacéutica, aplicando presiones de entre 20 y 50 MPa, para preparar o estabilizar emulsiones y suspensiones y modificar sus propiedades reológicas (Roesch & Corredig, 2003; Flourey, 2002a; Flourey *et al.*, 2000; Paquin, 1999). Más tarde se introdujo la aplicación de estas presiones moderadas en los alimentos, para cambiar las propiedades de las emulsiones (Diels *et al.*, 2005). Posteriormente, se usaron presiones de 100 MPa para producir emulsiones de gotas muy finas (0,3-0,4 μm), recuperar proteínas y otros componentes de células microbianas (Popper & Knorr, 1990; Paquin, 1999; Thiebaud *et al.*, 2003) y, recientemente, se estudia la aplicación de presiones de 200 y 300 MPa (ultra alta presión de homogeneización) que permiten la inactivación de microorganismos y enzimas además de modificar las propiedades reológicas y, por supuesto, prevenir el cremado (Pereda *et al.*, 2006; Pereda *et al.*, 2007; Picart *et al.*, 2006; Zamora *et al.*, 2007; Diels *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2005; Hayes & Kelly, 2003a; Hayes & Kelly, 2003b; Kielczewska *et al.*, 2003). Otro enfoque en la aplicación de la UHPH es el efecto en los productos derivados de la leche, como son las propiedades de coagulación, la viscosidad, la estructura y la textura del gel, entre otras (Zamora *et al.*, 2007; Serra *et al.*, 2007a; Serra *et al.*, 2008b; Sandra & Dalglish, 2007). La inactivación de microorganismos inoculados en leche, batidos y zumo ha sido también investigada (Diels *et al.*, 2005; Briñez *et al.*, 2006a; Briñez *et al.*, 2006b; Briñez *et al.*, 2006c; Briñez *et al.*, 2007). Actualmente, se han diseñado equipos capaces de alcanzar presiones de hasta 400 MPa, con volúmenes máximos de 120 L h⁻¹, que están siendo utilizados en fase experimental.

1.7.1. Efecto de la UHPH sobre la grasa.

Glóbulos de grasa de la leche. La utilización de la homogenización para reducir el tamaño del glóbulo graso de la leche está ampliamente implantada en la industria desde hace tiempo y sus efectos son bien conocidos. Con las presiones convencionales, se consigue la formación de glóbulos de grasa de diámetros no superiores a 1 μm . Se han realizado estudios para comparar el efecto de la homogenización convencional y la HPH sobre el tamaño del glóbulo graso. Kielczewska *et al.* (2003) han estudiado el efecto de

presiones de homogeneización entre 20 y 140 MPa, observando que el tamaño del glóbulo graso disminuye a medida que aumenta la presión, si bien a presiones de 120 y 140 MPa disminuye ligeramente la eficacia del tratamiento. Hayes & Kelly (2003a), utilizaron presiones entre 50 y 200 MPa, aplicadas en dos etapas (90% de la presión aplicado en la válvula primaria y el resto en la secundaria) y han comprobado que el tamaño del glóbulo graso decrece a medida que aumenta la presión y que, aumentando la temperatura de entrada, pueden obtenerse glóbulos grasos significativamente menores que los obtenidos en la homogenización convencional (18 MPa). Además, el tamaño del glóbulo graso también se ve afectado por la temperatura de entrada de la leche al homogenizador HPH.

Thiebaud *et al.* (2003) han observado que, en leche entera, aplicando presiones de 200 MPa con temperaturas de entrada de 4, 14 y 24°C, el diámetro $d_{4,3}$ (presencia de pequeñas cantidades de partículas grandes) del glóbulo graso disminuye de 3,8 μm a 0,80 μm , 0,65 y 0,37 μm , respectivamente. La homogenización a 300 MPa genera la presencia de partículas aglomeradas de glóbulos de grasa, si bien en un estudio posterior, no observaron la presencia de aglomerados trabajando con las mismas condiciones de presión y temperatura en el mismo equipo, aunque si consiguieron el mismo efecto de reducción de tamaño del glóbulo graso (Picart *et al.*, 2006). Pereda *et al.* (2007) sí han detectado la formación de agregados de glóbulos grasos a 300 MPa y temperaturas de entrada de 30 y 40°C. A estas condiciones, los glóbulos de grasa de tamaño inferior a 0,6 μm representan un 95 y 90% del volumen total de la grasa, respectivamente, mientras que los agregados de tamaño superior a 1 μm constituyen el 5 y el 10%. Hayes *et al.* (2005) observaron que, a 250 MPa y a una temperatura de entrada de 45°C, el tamaño del glóbulo aumenta respecto al conseguido a presiones inferiores, indicando la formación de pequeños agregados. Según estos autores, su formación puede ser consecuencia de la exposición de una mayor superficie grasa y, al resultar la caseína disponible insuficiente para cubrirla, se producen aglomeraciones de grasa.

Thiebaud *et al.* (2003), además de la coalescencia de la grasa, apuntan a que la formación de agregados puede deberse a que se comparten constituyentes proteicos entre distintos glóbulos. Datta *et al.* (2005) observaron que, a presiones de 200 MPa, con una temperatura de entrada de 10°C y una temperatura de salida de 56°C, el

diámetro del glóbulo graso se reduce de 3,50 a 0,34 μm , observándose una disminución adicional (hasta 0,23 μm) al aumentar la temperatura de salida a 70°C, lo que indica que el estado de la grasa antes de la homogenización (líquida, sólida o semisólida/semilíquida) influye significativamente sobre la reducción del tamaño del glóbulo.

Emulsiones. Una posible aplicación de la UHPH es la estabilización de emulsiones de aceite en agua. Desrumaux & Marcand (2002) han observado que, aplicando presiones entre 50 y 350 MPa a una emulsión de 20% aceite de girasol en solución acuosa con un 1,5% proteínas séricas, la máxima estabilización se consigue alrededor de 100 MPa, ya que, a partir de 100 MPa, el tamaño de la gota de grasa vuelve a aumentar y presiones superiores a 200 MPa inducen cambios conformacionales en las proteínas que alteran sus propiedades emulsionantes. Flourey *et al.* (2003) consiguieron la máxima estabilidad y el mínimo tamaño de gota en una emulsión con 20% de aceite de girasol y 0,75% de metilcelulosa tratados por UHPH con una presión de tratamiento de 150 MPa. En cambio, los mismos autores (Flourey *et al.*, 2002a), utilizando proteína de soja como emulsionante, consiguieron emulsiones estables con comportamiento de gel utilizando presiones de hasta 350 MPa. En este estudio, el tamaño de la gota disminuye siempre a medida que aumenta la presión.

Todos los investigadores señalan que la estabilidad de las emulsiones depende, además del tamaño de la gota, de la cantidad y estado de las moléculas que ejercen de emulsificantes. En muchos casos, estas moléculas son proteínas que también se ven afectadas por el tratamiento UHPH.

1.7.2 Efecto de la UHPH sobre las proteínas.

Micelas de caseína. La UHPH disminuye el tamaño de las micelas de caseína, Kheadr *et al.* (2002) observaron que, aplicando 200 MPa a una temperatura de entrada de 28°C a leche cruda, se obtiene un tamaño de micela de 125-150 nm. Hayes & Kelly (2003a) observaron una disminución de 180,75 nm a 170,65 nm empleando presiones ≤ 150 MPa en leche desnatada. Sandra & Dalgleish (2005) demostraron también que el tamaño de la micela de caseína de leche en polvo desnatada reconstituida disminuye al

aplicar presión a 186 MPa y a medida que se incrementa el número de ciclos. La UHPH, a presiones superiores a 200 MPa, aumenta la solubilidad de la κ -caseína y las α_s -caseínas, debido a la ruptura de interacciones hidrofóbicas, y/o a los efectos mecánicos de cizallamiento sobre las proteínas más cercanas a la superficie de la micela.

Desnaturalización de proteínas de suero de la leche. Otro efecto que provoca la UHPH es la desnaturalización de las proteínas séricas. Como ya se ha comentado, Desrumaux & Marcand (2002) lo observaron en emulsiones de aceite en agua estabilizadas con proteínas suero de leches tratadas a presiones superiores a 200 MPa. Hayes & Kelly (2003a) comprobaron que, cuando la temperatura alcanzada durante el tratamiento supera los 45°C, a presiones de 250 MPa se produce la desnaturalización de las proteínas del suero de la leche, siendo más extensiva la de la β -lactoglobulina que la de la α -lactoalbúmina. La desnaturalización de la β -lactoglobulina aumenta en un 10,2, 42,5 y 56,1% a presiones de 150, 200 y 250 MPa, respectivamente. Sin embargo, a presiones por debajo de 200 MPa, la desnaturalización es mínima.

Proteínas de la soja. Flourey *et al.* (2002a) han estudiado el efecto de la UHPH en una solución al 3% de la fracción de la proteína de soja correspondiente a la globulina 11s. Esta proteína se desnaturaliza a presiones superiores a 150 MPa. Por encima de 200 MPa, las fuerzas mecánicas, que inducen fenómenos de turbulencia y cavitación, afectan en gran medida a la conformación de la macromolécula, mejorando la capacidad emulsificante. El proceso de emulsificación de la globulina 11S a través de la UHPH produce modificaciones en la estructura macromolecular que tiende al desdoblamiento y a la agregación, aumentando los efectos hidrofóbicos que conducen a las interacciones proteína-proteína. Estos cambios moleculares pueden inducir fenómenos como la floculación de la emulsión proteína-proteína, que produce un aumento sobre la viscosidad de la emulsión.

Enzimas. Hasta el momento, únicamente se ha estudiado el efecto de la UHPH sobre las enzimas de la leche y sobre la pectin metilesterasa en el caso del zumo de naranja. En estos estudios se ha intentado dilucidar en qué medida contribuyen a la inactivación los efectos térmico y mecánico inherentes al tratamiento UHPH.

La *fosfatasa alcalina (ALP)* está asociada a la membrana del glóbulo graso de la leche. La ALP se inactiva completamente bajo tratamiento a altas temperaturas durante corto tiempo (HTST) de 72°C, 15 s. Hayes *et al.* (2005) señalan que la inactivación de la ALP causada por la UHPH es debida al efecto térmico alcanzado durante el tratamiento, puesto que las temperaturas alcanzadas durante los tratamientos a 200 y 250 MPa (77 y 84°C, respectivamente, en un tiempo de 20 s) consiguen un tratamiento equivalente al de HTST, mientras que tratamientos a presiones inferiores a 200 MPa son insuficientes. Datta *et al.* (2005) también señalan únicamente al efecto térmico como responsable de la inactivación de la ALP durante el tratamiento UHPH, pues en leche cruda de vaca tratada a 200 MPa, sólo se presenta una completa inactivación cuando la temperatura de salida de la leche alcanza los 70°C. Sin embargo, Picart *et al.* (2006) sugieren que, a presiones entre 200 y 300 MPa la inactivación de la ALP es debida principalmente a la fuerza mecánica. Observan que a una temperatura de entrada de 24°C la actividad residual es del 20 y 6%, valores que corresponden a temperaturas de 70 y 77°C, respectivamente, inmediatamente después de la válvula de alta presión. Puesto que el tiempo de permanencia a esta temperatura es inferior a 1 s y la inactivación alcanzada es similar a la de tratamientos térmicos cortos de 15 s a la misma temperatura, atribuyen el efecto de la inactivación a la presión más que a la temperatura. Pereda *et al.* (2007) consiguen una inactivación total de la ALP con presiones de 200 y 300 MPa y temperaturas de salida entre 78 y 103°C, y sugieren que los posibles factores implicados en la inactivación de la ALP son: la reducción del tamaño del glóbulo graso de la leche, que implica la destrucción de su membrana; la temperatura alcanzada en la segunda válvula de presión y la alta fuerza de cizalla producida durante el tratamiento.

La *lactoperoxidasa (LP)* se inactiva totalmente con tratamientos térmicos de 80°C / 1 s. La UHPH, aplicada a presiones de 135, 180 y 225 MPa en leche cruda, disminuye su actividad hasta un 91, 34 y 0%, respectivamente, siendo atribuida la inactivación a la temperatura de salida de los tratamientos a 180 y 225 MPa, que fue de 77 y 84 °C (Hayes *et al.*, 2005). Datta *et al.* (2005) sugieren que las fuerzas mecánicas experimentadas por la leche a 200 MPa, además del calentamiento, son parcialmente responsables de la inactivación de la enzima. Pereda *et al.* (2007) consiguen la total inactivación a 300 MPa con temperaturas de salida de 97 y 103°C y, a 200 MPa con temperatura de salida de 84°C, consiguen una actividad residual menor de 1%, siendo el tiempo de permanencia a estas temperaturas de 0,7 s.

La *lipasa*, es una enzima constituyente de la micela de caseína de la leche que ocasiona lipólisis, provocando sabor rancio indeseable. La UHPH consigue la inactivación completa de la lipasa a 200 MPa cuando la temperatura de salida es superior a 71°C, lo que se consigue con una temperatura de entrada de 35°C (Datta *et al.*, 2005). A temperaturas inferiores, en cambio, se observa una activación de la enzima.

La *plasmina*, es la enzima proteolítica más importante en la leche cruda, que la contiene en niveles de 0,3 mg/l y está principalmente asociada a la micela de la caseína, pudiendo degradar las caseínas y ocasionar sabores amargos, antes o durante el almacenaje de los productos lácteos. El tratamiento UHPH puede disminuir la actividad de la plasmina, a presiones mayores o iguales a 150 MPa, comparado con la homogenización convencional. La inactivación conseguida depende de la temperatura de entrada y el número de ciclos realizados (Hayes & Kelly, 2003b). Con tratamientos de 150 y 250 MPa, a una temperatura de entrada de 45°C, la reducción de la actividad de la plasmina es de 85% y 95%, respectivamente (Hayes *et al.*, 2005). Datta *et al.* (2005) han comparado el efecto de la UHPH a 200 MPa con el del tratamiento térmico, a combinaciones similares de temperatura y tiempo, sobre la plasmina, constatando que el efecto de la UHPH es muy superior al de la temperatura, por lo que la inactivación durante la UHPH se puede atribuir, en gran medida, a efectos no térmicos.

La *pectin metilesterasa*, resistente al calor, es la responsable de la pérdida de opalescencia del zumo de naranja durante el almacenamiento. Lacroix *et al.* (2005) investigaron su inactivación en zumo de naranja tratado por UHPH, concluyendo que ésta se debe sobretodo al bajo pH, al precalentamiento y, en menor grado, a la aplicación de la UHPH, pues el precalentamiento del zumo de naranja a 50°C / 10 min a pH=3, tratado posteriormente a 170 MPa, provoca un 90% de inactivación de la enzima y las mismas condiciones a pH = 4, reducen únicamente un 30% su actividad.

1.7.3 Efecto de la UHPH sobre las propiedades físicas.

Color. La UHPH puede ocasionar cambios en los parámetros de color L^* , a^* y b^* . En leche se han observado, sobretodo, aumentos en la claridad (valor L^*) causados por los efectos sobre el glóbulo graso y las caseínas, al aplicar 100, 150 y 200 MPa Hayes & Kelly (2003a); Hayes *et al.* (2005); y Pereda *et al.* (2007) han publicado resultados similares.

Reología. Flourey *et al.* (2002a) han estudiado la viscosidad de emulsiones estabilizadas con la fracción globulina 11s de soja y tratadas por alta presión y observan que tratamientos de 350 MPa producen una emulsión estable, con alta viscosidad y comportamiento de gel, comparados con los tratamientos a 200 MPa. Señalan que la UHPH promueve el desplegamiento y la posterior agregación, mediada por interacciones hidrofóbicas, de la globulina 11s. En la leche, se ha observado que tratamientos a 300 MPa causan un aumento de la viscosidad, comparando con tratamientos a 200 MPa. La viscosidad de la leche puede estar influenciada por el tamaño de partícula, los agregados de las micelas de caseína y la desnaturalización de las proteínas del suero por el calor y, puesto que en la leche tratada a 300 MPa se forman agregados de grasa, estos pueden ser los causantes del aumento de la viscosidad respecto al tratamiento a 200 MPa (Pereda *et al.*, 2007)

Propiedades de coagulación. Otros investigadores se han dirigido al estudio de las propiedades de coagulación de leche tratada por UHPH para la elaboración de quesos y yogur, encontrando interesantes resultados en cuanto a firmeza del gel, velocidad de coagulación y textura. Hayes & Kelly (2003a) observan una mejora en las propiedades de gelificación al utilizar presiones de 200 MPa, ya que disminuye el tiempo de gelificación y aumentan la velocidad de agregación y la firmeza del gel, que incluso mejoran al realizar un tratamiento en dos etapas. Zamora *et al.* (2007) estudian las mismas propiedades en leche tratada a 200 y 300 MPa, observando que el tiempo de coagulación es menor o igual al de las leches pasteurizada y cruda, y que la firmeza de la cuajada, aumenta comparado con la leche cruda. Sin embargo, al utilizar el 10% de presión en la segunda etapa, la firmeza del la cuajada y la velocidad de la firmeza del gel disminuyen si se comparan con el tratamiento de una sola etapa. Gracias a la observación microscópica pueden observar que, al aplicar la segunda etapa, las

partículas de grasa coalescen dentro de la red proteica, dando lugar a una estructura más heterogénea, similar a la leche homogenizada y pasteurizada. Sin embargo, los geles obtenidos con una única etapa, muestran una matriz compacta y homogénea con pequeños glóbulos de grasa atrapados por fragmentos de caseína adheridos.

Por lo que respecta a la coagulación ácida durante la elaboración de yogur, Serra *et al.* (2007) han estudiado el efecto de los tratamientos con una (100, 200 y 300 MPa) y dos etapas (130, 230 y 330 MPa). La leche tratada con una sola etapa presenta mayor velocidad de agregación que la tratada con dos etapas, lo que se correlaciona con la observación de que ésta última presenta también mayor tamaño de partícula. Los tratamientos a 200 y 300 MPa, con temperaturas de entrada de 30 y 40°C son las condiciones más eficientes en cuanto a la reducción de la sinéresis y el aumento de la firmeza en el producto final. Las modificaciones que se producen en la leche a partir de 200 MPa, en las que probablemente están involucradas la desnaturalización de las proteínas del suero y las interacciones proteína-proteína y grasa-proteína, conducen a la eficiente interacción entre partículas y a la formación de una red de gel estable que retiene el agua fuertemente (Serra *et al.*, 2008a). Este comportamiento se mantiene a lo largo de la vida útil del yogur y se observa que cuando los yogures firmes se batan, siguen presentando una mayor consistencia y menor sinéresis que los elaborados de manera convencional (Serra *et al.*, 2008b).

1.7.4. Efecto de la UHPH sobre los microorganismos.

Estudios recientes sobre microorganismos tratados por UHPH en diferentes medios han demostrado que la UHPH reduce la carga microbiana, debido a los mecanismos de caída brusca de la presión, torsión, cizalla, cavitación, choque de ondas, impacto y aumento de la temperatura del líquido durante la UHPH. Estos mecanismos actúan, principalmente, sobre la pared celular de los microorganismos, produciendo la ruptura de la membrana celular y ocasionando lesiones y la muerte celular (Diels *et al.*, 2005; Lanciotti *et al.*, 1996; Lanciotti *et al.*, 1994; Popper & Knorr, 1990; Thiebaud *et al.*, 2003). El efecto causado por la UHPH depende del tipo de microorganismo. Por un lado, las levaduras son más sensibles que las bacterias Gram-negativas a presiones de homogenización de 100 MPa, presentando el doble de reducción (Lanciotti *et al.*, 1994).

Por otro lado, las bacterias Gram-positivas son más resistentes que las bacterias Gram-negativas al tratamiento UHPH. Presiones de 100 MPa, consiguen reducir 1 unidad logarítmica la población de *Streptococcus lactis*, mientras que la de *Escherichia coli* disminuye 3 unidades logarítmicas (Popper & Knorr, 1990). Aplicando tratamientos de 300 MPa, se ha observado que *Staphylococcus aureus* es más resistente que *Yersinia enterocolitica* (Diels *et al.*, 2005; Vachon *et al.*, 2002). También se ha demostrado que *S. lactis* es más resistente a la UHPH que *Bacillus subtilis*, indicando que la morfología de la bacteria (coco o bacilo) es otro factor que determina la resistencia al tratamiento UHPH (Popper & Knorr, 1990).

Como ya se ha mencionado, el efecto térmico asociado al tratamiento UHPH también influye en la reducción microbiana. Por ejemplo, cuando se aplican 300 MPa en leche cruda, a temperaturas de entrada de 4 y 24°C, se consiguen 1 y 3 unidades logarítmicas de reducción, respectivamente (Thiebaud *et al.*, 2003). Vachon *et al.* (2002) consiguieron una reducción de 9 unidades logarítmicas de *Salmonella enteritidis* con un tratamiento de 200 MPa a temperatura de entrada de 55°C. La aplicación de la UHPH en dos etapas aumenta el efecto del tratamiento respecto a la aplicación de una sola etapa (Hayes & Kelly, 2003a). Estos autores señalan que la mayoría del efecto inactivador se consigue, probablemente, debido a la rápida caída de presión y está asociado a las fuerzas experimentadas en la válvula primaria, en la que se alcanza un 90% de la presión aplicada. En la segunda válvula se produce un efecto sinérgico, debido a fuerzas similares pero significativamente inferiores, que puede acabar de inactivar las células dañadas durante el paso por la primera válvula. Otro parámetro del tratamiento que aumenta la inactivación microbiana es el número de pases o ciclos a una misma presión (Diels *et al.*, 2005; Picart *et al.*, 2006; Thiebaud *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2002).

El medio en el que está suspendido el microorganismo condiciona también el efecto de la UHPH. En un estudio que compara la inactivación en solución tampón y en leche, Vachon *et al.* (2002) han observado que *Listeria monocytogenes* en solución tampón se inactiva completamente con 3 ciclos de presión a 300 MPa y temperatura de entrada de 25°C, mientras que son necesarios 5 ciclos si el microorganismo está suspendido en leche. Por otro lado, Brinez *et al.* (2006a) observaron una mayor inactivación de *Listeria innocua* cuando está suspendida en leche que cuando está suspendida en zumo de naranja. Pereda *et al.* (2006); Pereda *et al.* (2007) han comparado el efecto de la

UHPH con la pasteurización (90°C / 15 s) sobre la microbiota de la leche. Aplicando presiones a 200 y 300 MPa, con temperaturas de entrada de 30 y 40°C, el recuento total se reduce entre 3 y 4 log UFC/ml y los coliformes, enterococos y lactobacilos son completamente inactivados. Con ello, la UHPH consigue un 99,99% de reducción microbiana y un aumento de la vida útil de hasta 14 y 18 días en leches tratadas a 200 y 300 MPa, respectivamente, similares a las proporcionadas por la alta pasteurización

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivos

El presente trabajo se realizó con la financiación obtenida del proyecto AGL2003-03494, titulado “Estudio comparativo del efecto de la Ultrahomogeneización en dos fluidos (leche de vaca y licuado de soja) para la obtención de derivados fermentados”

El **objetivo general** de esta tesis doctoral fue **estudiar los efectos de la ultra alta presión de homogeneización (UHPH) en el licuado de soja, en comparación con tratamientos térmicos convencionales, y su aptitud para el desarrollo de un producto fermentado, tipo yogur de soja.**

Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**;

- Estudiar las características fisicoquímicas, microbiológicas, microestructurales de licuado de soja tratado por UHPH, así como los parámetros específicos de calidad indicativos de la eficacia del tratamiento.
- Estudiar el comportamiento a la coagulación ácida del licuado de soja tratado por UHPH.
- Estudiar la evolución durante el almacenamiento en refrigeración de los yogures de soja obtenidos a partir de licuados tratados por UHPH.

2.2. Plan de trabajo.

Puesto que no existían estudios previos relativos a la aplicación de la tecnología de UHPH en licuado de soja y con el fin de obtener una información mínima que permitiera establecer los tratamientos a aplicar en el estudio general, se realizaron ensayos preliminares sobre su efecto en la microbiología, oxidación, actividad antitripsina y digestibilidad, aplicando tratamientos UHPH de 200 y 300 MPa con 4, 6 y 15 segundos de retención a una temperatura de entrada de 40°C. Por otra parte, se realizaron pruebas preliminares de elaboración de yogur de soja mediante la inoculación de diferentes proporciones de fermentos lácticos, con o sin la adición de calcio y de lactosa para establecer las condiciones y la formulación de la muestra a fermentar. El plan de trabajo general se fue estructurando de acuerdo a los resultados obtenidos en las etapas previas del estudio.

La **primera etapa** correspondió al estudio del licuado de soja tratado por UHPH (200 y 300 MPa 40°C) en comparación con un tratamiento térmico UHT, ambos obtenidos a partir de un producto base (PB) mínimamente procesado para obtener el licuado de soja a partir de las semillas.

Se realizaron análisis microbiológicos, fisicoquímicos y microestructurales de los licuados. Las muestras tratadas por UHPH se compararon con el producto base y el licuado UHT. Se realizaron análisis de composición química (contenido en cenizas, grasa, extracto seco, nitrógeno total, glúcidos), microbiológicos (recuento de mesófilos totales, enterobacterias y esporas), físicos (análisis de tamaño de partícula, viscosidad, color, estabilidad física), así como el estudio de la desnaturalización de proteínas, análisis de componentes volátiles y microscopía electrónica del licuado de soja.

Por otra parte, se determinaron una serie de factores de calidad de importancia en este producto, tales como la actividad lipoxigenasa, actividad antitripsina, oxidación lipídica y digestibilidad de los licuados de soja. De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio anterior y a las pruebas preliminares, se decidió añadir otra temperatura de entrada (50°C), así como un tratamiento combinando esta temperatura de entrada con 300 MPa y un tiempo de retención de 15 s (tiempo durante el cual se mantuvo la temperatura alcanzada en la válvula de alta presión). Esto dio lugar a un total de 8 tratamientos UHPH: 200 MPa, 300 MPa, 200 MPa, 15 s y 300 MPa, 15 s, todos ellos con dos temperaturas de entrada de 40 y 50°C. Asimismo se estudiaron el producto

base y el UHT como muestras de referencia para evaluar los cambios producidos por el tratamiento aplicado.

Para el desarrollo de la **segunda etapa del estudio** (estudio de la coagulación), a partir de los resultados obtenidos previamente, se seleccionaron los tratamientos de 200 y 300 MPa, ambos con temperatura de entrada de 40 y 50°C, y se estudió el comportamiento a la coagulación ácida (inoculación con bacterias lácticas). Las muestras tratadas por UHPH se compararon con dos muestras, una tratada UHT y otra tratada a 121°C durante 15 min (AC), y se determinaron los parámetros de coagulación, así como la cinética de acidificación y la acidez valorable durante el proceso de fermentación. Por otra parte, los yogures de soja se almacenaron en frío durante 24 h para la posterior evaluación de su microestructura, textura y capacidad de retención de agua. Asimismo, se llevó a cabo la evaluación sensorial (pruebas de aceptación) de los mismos utilizando tres diferentes tratamientos, dos elaborados con licuados de soja tratados por UHPH a 200 y 300 MPa temperatura de entrada de 40°C y otro elaborado con licuado de soja tratado por UHT.

En la segunda etapa de estudio, se obtuvo información importante acerca del proceso de coagulación ácida de los licuados de soja así como de las principales características en las propiedades del gel, lo que permitió establecer las condiciones de procesamiento UHPH para la **tercera etapa del estudio** (estudio del almacenamiento). Se demostró que los yogures de soja elaborados con licuado de soja bajo tratamiento térmico de esterilización (121°C/15 min, UHT), presentaban una textura débil. Con este resultado, se decidió utilizar un tratamiento intermedio con temperatura moderada, que es un tratamiento convencional utilizado también para la producción de yogur de soja. Se escogieron los tratamientos UHPH de 200, 300 MPa y 300 MPa con 15 min de retención, a una temperatura de entrada de 50°C; y un tratamiento de 95°C/15 min como muestra control. Se estudiaron los cambios producidos a lo largo de la vida útil de los yogures de soja, que fueron almacenados a una temperatura de 4°C durante 28 días. Las muestras fueron analizadas a los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento y se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: composición química, pH y acidez, microbiología, reología, microestructura, textura, capacidad de retención de agua, color, inhibidor de tripsina y oxidación de lípidos.

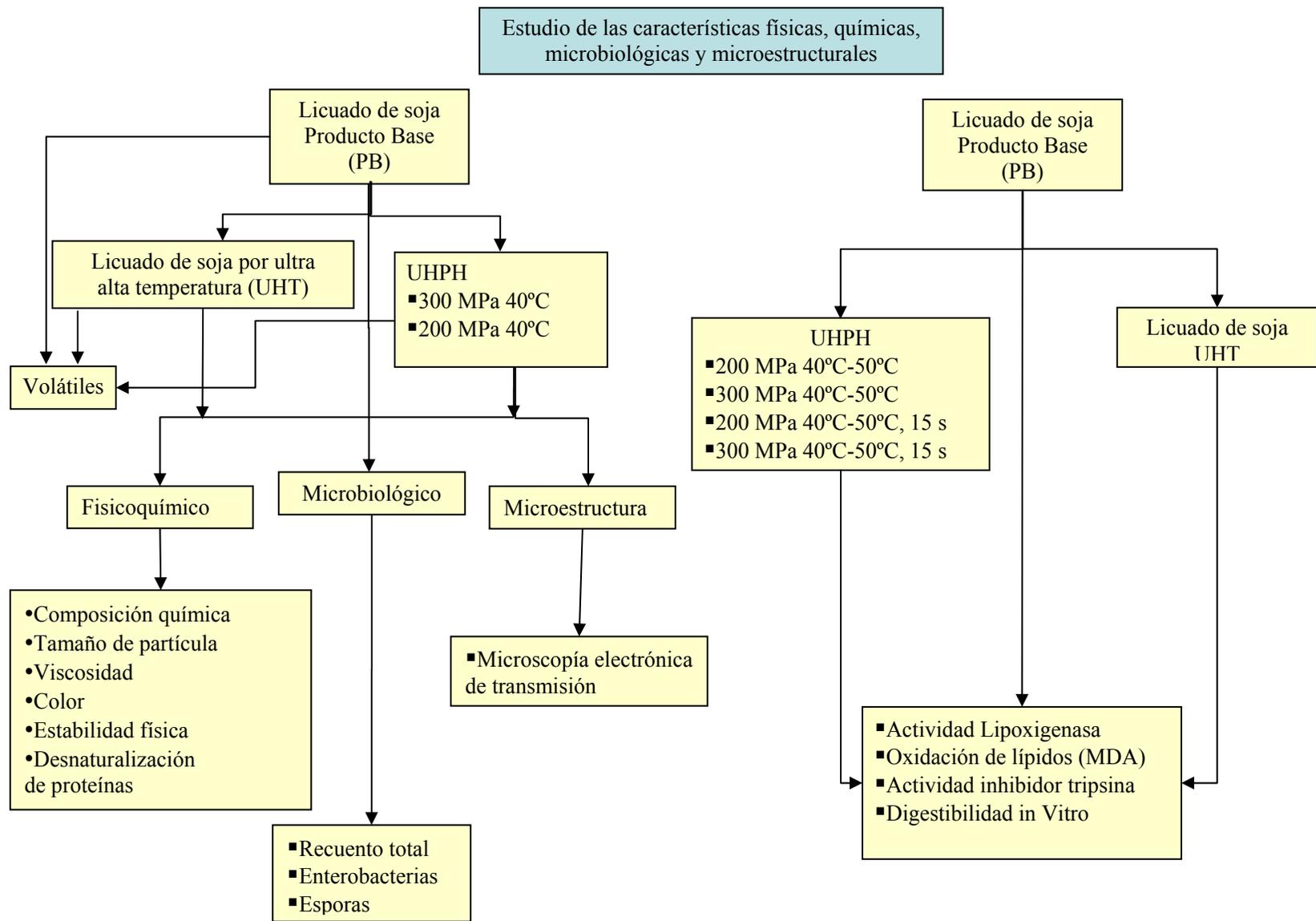
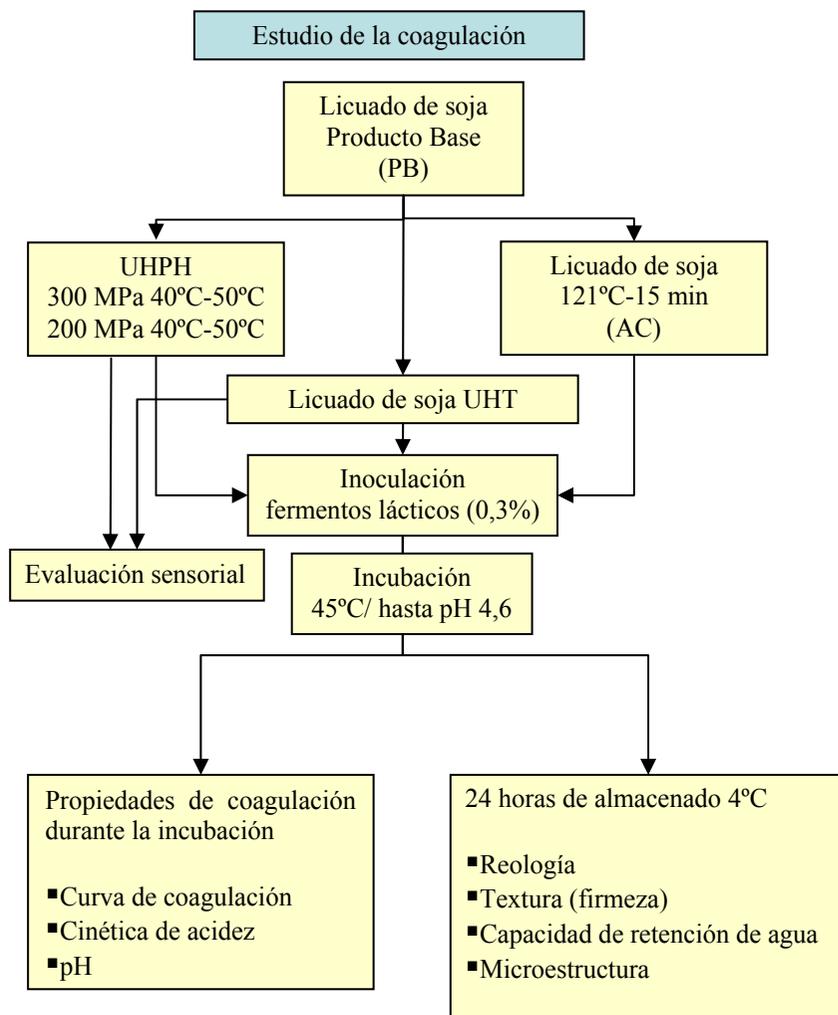


Figura 3. Esquema del plan de trabajo de la primera etapa de estudio.

Segunda etapa



Tercera etapa

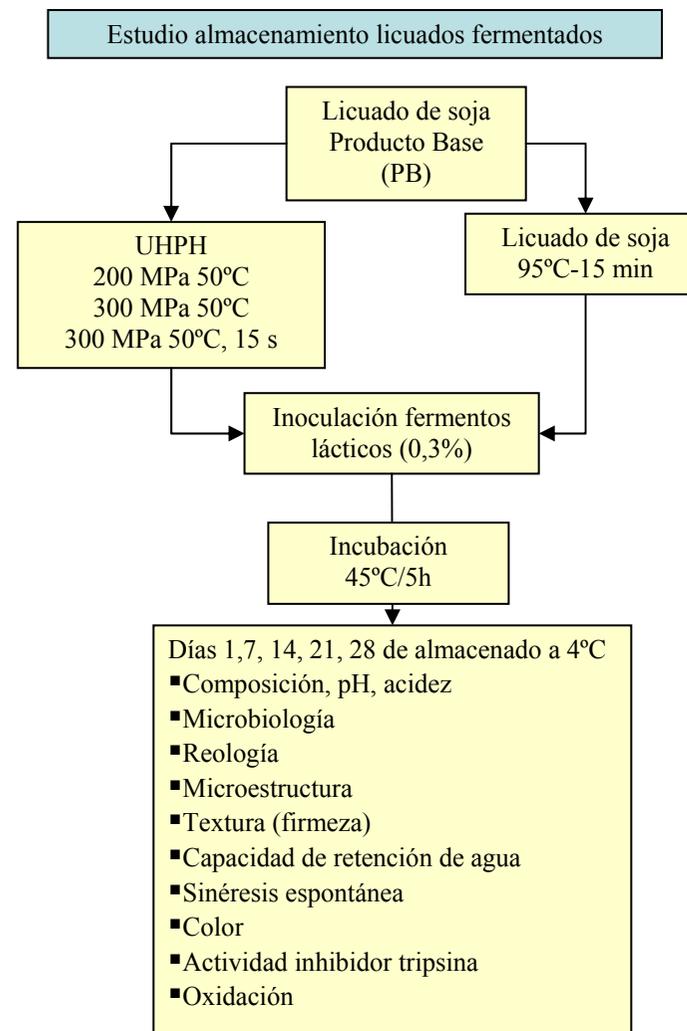


Figura 4. Esquema del plan de trabajo de la segunda y tercera etapas de estudio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de licuado de soja.

El licuado de soja utilizado fue proporcionado por la compañía Liquats Vegetals, S.A. (Girona, España). Para la elaboración se utilizó la variedad del haba *Majesta*. En el procedimiento para la obtención del licuado, la soja primeramente se hidrató en proporción 1:6 (agua:soja), posteriormente se descascarilló y se sometió a molienda a 80°C en un molino coloidal (E. Bachiller S.A., Parets del Vallès). Finalmente, la mezcla se centrifugó para separar y obtener la fase líquida. Este licuado de soja fue tomado como producto base (PB). Este producto, antes de ser comercializado por Liquats Vegetals, S.A., es sometido a una homogenización por alta presión convencional de doble etapa (20, 50 MPa a 80°C) (Stork Food & Dairy Systems, B. V., Amsterdam, Holanda), y, posteriormente, a un tratamiento UHT (142°C/2 s) en un equipo de sistema tubular indirecto (Sterideal 8000B-Spec, Stork Food & Dairy Systems Amsterdam, Holanda). Tanto el producto base como el UHT, además de otros dos tratamientos térmicos aplicados al PB (121°C/15min en autoclave y 95°C/15 min en baño), se utilizaron para compararlos con los tratados por UHPH.

3.2. Equipo de ultra alta presión de homogeneización.

Los tratamientos UHPH se realizaron mediante un homogenizador de ultra alta presión modelo FPG11300 (Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Reino Unido). Este equipo está formado por dos bombas hidráulicas intensificadoras (Stansted Series FPG 9085) que, actuando de manera sincronizada cíclicamente, permiten el paso del flujo constante a una primera válvula de cerámica hidráulica (capaz de alcanzar presiones de hasta 350 MPa) (Stansted Series FPG 9080) y posteriormente, a una segunda válvula neumática, que sostiene presiones de hasta 50 MPa. Estas válvulas proporcionan varias alternativas de aplicación, ya que se pueden utilizar presiones independientes con una o dos etapas, o combinaciones. El equipo cuenta con un adaptador ubicado después de la segunda válvula de presión donde se pueden realizar retenciones del fluido con periodos de 4, 6, 8 y 15 s.

El fluido pasa a través de una sección convergente (espacio de la válvula), comprendido entre el cabezal y el asiento de la válvula (Figura 5). Este espacio se reguló para reducir

la distancia entre éste y el asiento de la válvula, incrementando el nivel de presión de tratamiento. Las temperaturas de entrada y salida del licuado de soja fueron controladas por dos intercambiadores de calor (Garvía, Barcelona, España) que se localizan antes del equipo UHPH, y después de la segunda válvula de homogenización, respectivamente. La temperatura de entrada (T_0), la temperatura después de la primera válvula de homogenización (T_1) y la temperatura de salida alcanzada después del paso por el intercambiador (T_2), se monitorizaron durante todas las producciones.

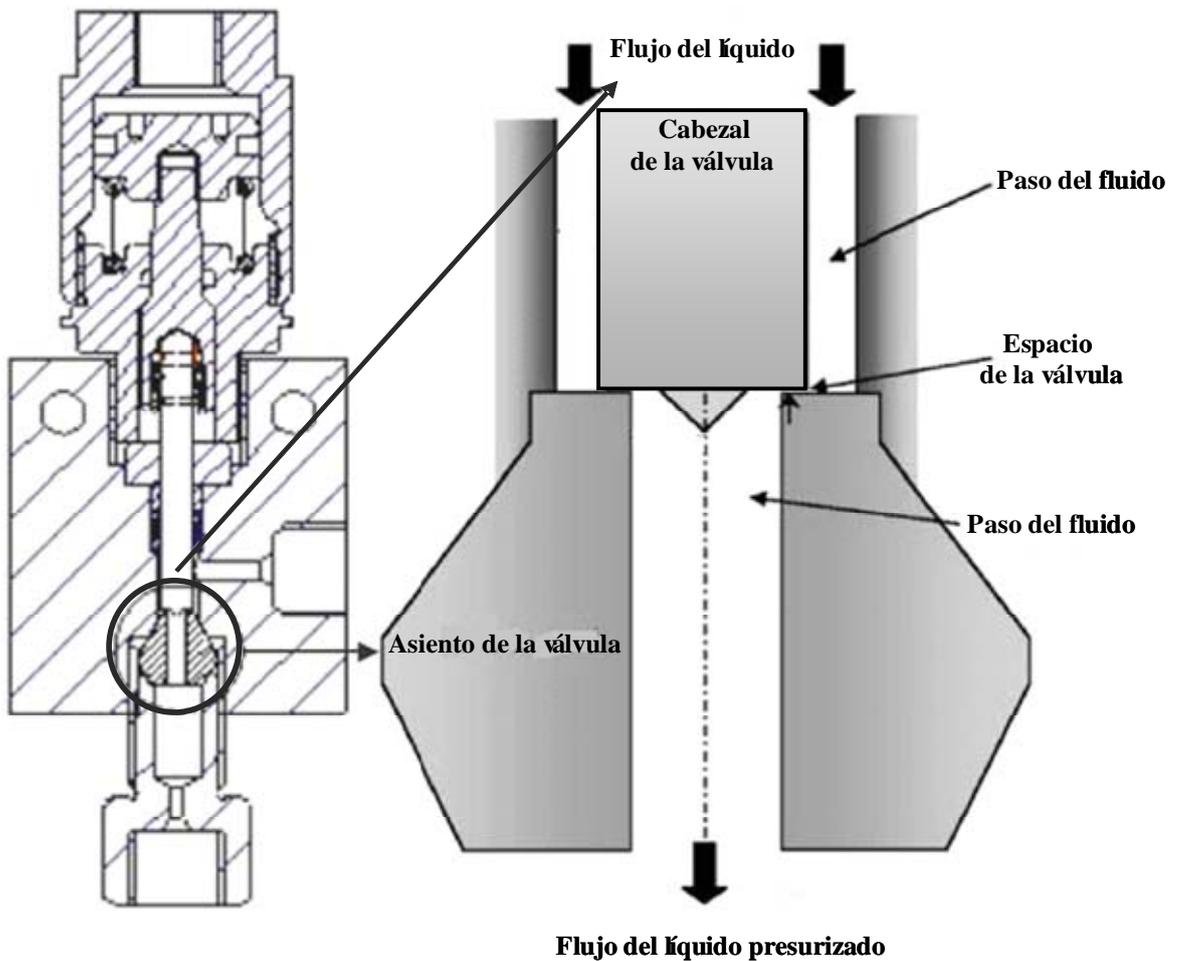


Figura 5. Representación esquemática de una válvula Stansted de un homogenizador de alta presión (Stansted model/DRG FPG74). Fuente (Floury *et al.*, 2004a).

3.3. Tratamientos aplicados.

Tratamientos de la primera etapa de estudio: efectos de la UHPH en el licuado de soja. Al producto base se le aplicaron dos tratamientos UHPH de 200 y 300 MPa, con una T_0 de 40°C. Las muestras fueron recogidas en botellas de vidrio estériles hasta su análisis. Para el estudio de los factores de calidad, se aplicaron 8 tratamientos: 200 MPa, 300 MPa, 200 MPa, 15 s y 300 MPa, 15 s todos ellos con dos temperaturas de entrada, 40 y 50°C. Las muestras se distribuyeron en recipientes de polipropileno estériles de 50 ml y se almacenaron a -60°C para su estudio posterior. En ambos casos, el producto base y el licuado de soja UHT se utilizaron para ser comparados con los licuados de soja tratados por UHPH.

Tratamientos de la segunda etapa de estudio: estudio de la coagulación. Al producto base se le aplicaron 4 tratamientos UHPH: 200 MPa, 300 MPa combinados con dos T_0 : 40 y 50°C. Por otro lado, al producto base se le aplicó un tratamiento térmico de 121°C/15 min; éste y el licuado UHT se utilizaron para ser comparados con los licuados de soja tratados por UHPH. Con los distintos licuados obtenidos se elaboró yogur de soja, que se almacenó a 4°C y se analizó al día siguiente de su obtención.

Tratamientos de la tercera etapa de estudio: estudio de almacenamiento. Se aplicaron 3 tratamientos UHPH: 200 MPa, 300 MPa y 300 MPa, 15 s. Todos ellos con una T_0 de 50°C. Asimismo, se realizó un tratamiento térmico de 95°C durante 15 minutos para su comparación con las muestras tratadas por UHPH. Con los distintos licuados obtenidos se elaboró yogur de soja, que se almacenó a 4°C y se analizó transcurridos 1, 7, 14, 21 y 28 días de su obtención. Se realizaron tres producciones individuales para cada etapa experimental.

3.4. Análisis químicos

Para el licuado de soja y el yogur de soja, el contenido de la humedad, cenizas y grasa se analizaron según la AOAC (2000), el contenido en nitrógeno total se determinó por el método de Dumas (IDF, 2002); y el pH se midió con un pHmetro Crison MicropH2001 (Crison S.A., Alella, España). Los análisis se realizaron por triplicado.

3.5. Análisis microbiológicos.

Se prepararon las diluciones decimales de las muestras a analizar en agua de peptona. La siembra se realizó por inclusión en doble capa. Todos los medios utilizados fueron Oxoid (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido).

Para el estudio del licuado de soja se analizó:

- recuento total de mesófilos aerobios en medio PCA, incubado a 30°C durante 48 h (IDF, 1991);
- recuento de *Enterobacteriaceae* en agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG), incubado a 37°C durante 24 h (IDF, 1991);
- recuento de esporas en medio PCA, 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 (Westhoff, 1981).

Para el estudio de almacenamiento se analizó:

En las muestras fermentadas y no fermentadas: recuento total y de *Enterobacteriaceae*. En las muestras fermentadas almacenadas, se analizó la evolución de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*, según norma IDF (1997). 10 g de muestra fueron diluidos en 90 ml de agua de peptona y sometidos a homogenización mecánica en un equipo Seward® 400 circulator (Seward Medical, Cambrigde, Reino Unido). Se realizaron diluciones decimales en agua de peptona previas a la siembra en agar en doble capa. Para *Streptococcus thermophilus* se utilizó el medio M17 a pH 7,1-7,2, incubando 72 h a 37°C y para *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*, el medio MRS a pH 5,4, incubado durante 48 h a 37°C. Los análisis microbiológicos se realizaron los días 1,7, 14, 21 y 28 de almacenamiento, por duplicado.

3.6. Microestructura del licuado de soja.

El estudio de la microestructura se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) con un microscopio Philips 201 (Philips, NL-5600. MD Eindhoven, Holanda) con un voltaje de aceleración de 60 KV. El licuado de soja se mezcló con glutaraldehído al 3% en un vial, se añadió 2% de agar de gelificación a baja temperatura en una proporción de 1:1, se dejó formar el gel y se cortó en cubos de 1mm³. Los cubos se lavaron durante 30 min con tampón cacodilato de sodio 0,1 M, pH 7,2, se realizó un segundo lavado durante una hora, se reemplazó y se mantuvo durante dos horas con 1 ml de una disolución conteniendo 50% de tetróxido de osmio (HOT) (disolución al 2%) y 50% de tampón cacodilado/HCl. Posteriormente, se reemplazó por 1 ml de acetato de uranilo al 1% durante 30 min. Los cubos se lavaron con agua y se deshidrataron. La deshidratación consistió en un lavado con gradiente creciente de etanol; 50, 70, 90 y 100% de etanol durante 5, 30, 30 y 180 min, respectivamente. El 100% de etanol se reemplazó a los 30 y 60 min y posteriormente se eliminó y se llenó con resina incompleta (20 ml de resina epoxi, 20 ml de dodecil anhídrido succínico (DDSA) y 1 gota de dibutil ftalato (DBP)). Las muestras se colocaron en un agitador de rotación durante toda la noche, después se reemplazó con resina completa (formulación incompleta con la adición de 0,6 ml de plastificador benzildimetilamina (BDMA)) y se agitó nuevamente durante 4 h. Se añadió un cubo de muestra a cada tres moldes que contenían resina completa fresca, se introdujeron en una estufa a 60°C durante toda la noche. Las muestras se cortaron (0,03-0,05 μm) usando un microtomo Reichert Ultracut, se montaron en rejillas de cobre con cuadrículas de 3 mm y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de observarse al microscopio.

3.7. Análisis de tamaño de partícula.

El tamaño de partícula se determinó por dispersión de luz láser usando un analizador Beckman LSTM 13 320 (Beckman Coulter, California, USA). El intervalo de este equipo permite detectar partículas o gotas cuyo diámetro esté comprendido entre 0,04 y 2000 μm .

El procedimiento de análisis consiste en añadir la muestra en un depósito externo, donde se diluye en el fluido de transporte, que puede ser agua de la red o destilada. Una

bomba centrífuga impulsa dicho fluido hacia el interior del módulo óptico. Allí, la muestra circula por el interior de la celda de medida, donde es iluminada por el haz láser que se difracta por el efecto de las partículas o gotas en suspensión. La luz difractada llega a los detectores dispuestos de forma que en varios grupos cubren los posibles ángulos. A continuación el fluido a analizar llega a la celda del sistema PIDS (generadores de luz monocromática polarizada) donde es iluminado por tres haces de luz monocromática (tres longitudes de onda diferentes) polarizada en el plano vertical y horizontal. Los datos de difracción láser y del sistema PIDS se analizan en conjunto para dar un resultado único y mediante el ordenador se convierten los datos que proporciona el equipo.

Previamente al análisis, las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos en un baño de agua y posteriormente, se diluyeron en una proporción 1:50 con agua desionizada para alcanzar un 43-47% de obscuración del láser. El índice de refracción para determinar las partículas de la fase dispersa fue 1,471 y para la fase continua, 1,33. La distribución del tamaño de partícula se caracterizó mediante diferentes parámetros: $D_v 0,5$, diámetro por debajo del cual se hallan el 50% de la fracción de volumen de las partículas; $d_{3,2}$, diámetro medio de la superficie total correspondiente a las partículas y $d_{4,3}$, parámetro relacionado con la presencia de pequeñas cantidades de agregados de partículas. Los resultados se expresaron como porcentaje en volumen de la distribución de tamaño de partícula y cada muestra se analizó por triplicado.

3.8. Evaluación reológica.

Se utilizó un reómetro Haake Rheo Stress 1 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania), acoplado a un baño termostático Thermo Haake Phoenix C25P (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Alemania) y conectado a un compresor CARAT 106/E (FIAC S. P. A., Bologna, Italia). Los datos fueron automáticamente controlados por el programa Rheowin 3 Job Manager, instalado en un ordenador PC conectado con el reómetro Haake.

3.8.1. Determinación de la viscosidad del licuado de soja.

Se realizó mediante curvas de flujo a 20°C, utilizando un sensor de cilindros concéntricos (Z34). El barrido de gradiente de velocidad se realizó entre 0,1 y 140 s⁻¹.

El análisis de las curvas de flujo se realizó ajustándolas a la de potencia ($\tau = K\gamma^n$) siendo: τ , el esfuerzo cortante (Pa); K , el índice de consistencia (Pa sⁿ); γ , la velocidad de deformación (s⁻¹); n , el índice de comportamiento al flujo, que en el caso de fluidos Newtonianos tiene un valor de 1, por lo que K coincide con el valor de viscosidad.

3.8.2. Análisis de la viscoelasticidad de los yogures de soja.

Para la evaluación de las propiedades viscoelásticas se realizaron ensayos oscilatorios. La preparación de la muestra para este propósito requiere la obtención de piezas de gel de pequeño espesor y diámetro similar al sensor utilizado. A este efecto, las muestras inoculadas se colocaron en jeringas de 50 ml (aproximadamente 20 mm de diámetro) que se incubaron a 45°C durante 5 h y se almacenaron a 4°C tras la fermentación. Se obtuvieron discos de 3 mm de espesor empujando el émbolo de la jeringa y cortando la muestra con una cuchilla afilada. La muestra se transfirió al reómetro y una vez que el sistema alcanzó la posición de medida (2,5 mm), se cortaron los bordes para ajustarla al diámetro del sensor. La muestra se mantuvo en reposo durante 5 minutos para permitir su relajación. El ensayo dinámico oscilatorio empleado fue un barrido de frecuencia. El análisis se realizó a una temperatura de 4°C usando platos paralelos rugosos de 20 mm para evitar el deslizamiento de la muestra. El barrido de frecuencias se realizó entre 0,1 y 1 Hz, aplicando una deformación del 1%. Esta deformación se encuentra dentro del intervalo lineal de viscoelasticidad, que se determinó previamente mediante un test de barrido de esfuerzo desde 0,001 a 1 Pa. Los parámetros viscoelásticos G' (módulo de almacenamiento), G'' (módulo de pérdida), $\tan \delta$ y G^* (módulo complejo) se obtuvieron mediante el software Rheowin Data Manager (ThermoHaake GmbH). El análisis de las muestras se realizó a los días 1, 7, 14, 21 y 28 (de almacenamiento), por triplicado.

3.9. Análisis de la desnaturalización de proteínas.

La desnaturalización de las proteínas se analizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro Mettler-Toledo 821 (Mettler-Toledo S. A. E., Barcelona), que mide la cantidad de calor absorbida o emitida por una muestra respecto a una referencia, al someterse a un gradiente de temperatura o tiempo que le provoca cambios físicos y/o químicos. Para el análisis, las muestras se liofilizaron (Telstar-Cryodo 50, Terrasa) y se reconstituyeron con agua destilada a un 20% (p/v). Se pesaron entre $20-25 \pm 0,01$ mg de muestra, que se calentaron de 25°C a 100°C a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en una cápsula de aluminio con un flujo de nitrógeno de 80 ml/min. Las muestras se analizaron por triplicado.

3.10. Determinación de estabilidad física del licuado de soja.

Para la determinación de la estabilidad física, las muestras se almacenaron a 4°C con un 0,04% de azida de sodio (NaN_3) con el fin de evitar la contaminación del producto. Se pesaron 30 g de muestra en tubos de plástico flexibles de polipropileno (32 mm de diámetro y 115 mm de longitud) que se centrifugaron (Centrífuga Sigma 4K15, Postfach, Alemania) a 3000 rpm durante 45 min a 20°C . El análisis se realizó los días 1, 30 y 60 después del tratamiento. Los resultados se expresaron como % (p/p) de sólidos depositados después de la centrifugación. El análisis se realizó por cuadruplicado.

3.11. Análisis de color.

Se realizó usando un colorímetro portátil Hunter Lab (MiniScan XETM Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, Virginia, USA). Las muestras se atemperaron a 20°C antes del análisis. El licuado se vertió directamente en el vaso de medida, mientras que el yogur de soja se homogenizó previamente con una espátula antes de ser introducido en el mismo, en ambos casos hasta que la muestra alcanzó una altura de 10 mm. Se utilizó el iluminante D_{65} con un ángulo de observación de 10° . Se obtuvieron los valores según la escala CIE $L^* a^* b^*$, donde L^* corresponde a la luminosidad que varía de 0 a 100; a^* a la contribución de rojo-verde (valores positivos se corresponden

con el rojo mientras que un valor negativo indica una contribución de verde); y b^* a la contribución de azul-amarillo (valores positivos se corresponden con el amarillo mientras que un valor negativo indica una contribución de azul). La diferencia de color (ΔE) de las muestras tratadas UHPH frente a la muestra control, así como la diferencia de color durante el almacenamiento para una misma muestra se calculó usando la fórmula $\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$. Para los yogures de soja el análisis se realizó los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento a 4°C por triplicado.

3.12. Determinación de volátiles.

Aislamiento de compuestos volátiles. Se realizó mediante microextracción en fase sólida (SMPE) utilizando una fibra de 85 μm CARD/PDMS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). 10 ml de muestra se encapsularon en viales de cristal de 20 ml (75,5 x 22,5 mm, Supelco Inc), introduciendo una barra de premovimiento y sellando con un casquillo de aluminio y tapa de silicona. El vial fue colocado en un baño durante 5 minutos a 45°C en agitación a 1000 rpm para alcanzar el equilibrio. Para la adsorción de los volátiles, la fibra fue insertada a una longitud de 1,5 cm en el vial atravesando la tapa de silicona y manteniéndola durante 60 min. Después de este tiempo la fibra fue contraída y se retiró del vial ajustándola a 3 cm para proceder a inyectar al cromatógrafo de gases. Después de cada inyección la fibra se limpió durante 10 min a 250°C.

Identificación de compuestos. El análisis de cromatografía de gases de los compuestos absorbidos de la fibra SMPE se realizó con una columna capilar DB-5 de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno con una capa de espesor de 1 μm (J & W Scientific, Folsom, USA). La masa espectral de los volátiles del licuado de soja se obtuvo utilizando un cromatógrafo de gases HP 9890 Series II equipado con un detector selectivo de masa HP 5973 (MDS, Helett-Packard Inc., Wilmington, DL, USA). La desorción fue a 250°C 2 min trabajando el inyector en modo *splitless*. Se utilizó helio como gas de transporte con una velocidad de 29 cm s^{-1} . La temperatura inicial del horno fue de 35°C durante 8 min, la primera rampa de 4°C/min hasta 150°C, la segunda rampa de 20°C/min hasta 280°C, manteniendo la temperatura final durante 5 min. El tiempo total fue de 48 min. La ionización de impacto electrónico se realizó con un voltaje de 70 eV, y la masa

espectral se obtuvo con un rango scan m/z :33-220 con una temperatura del detector de 280°C. La identificación de estos analitos se realizó por comparación de los espectros de masa de los picos en tiempo y retención con las bibliotecas Willey 275 y NITS 05. Los compuestos volátiles identificados fueron expresados en área absoluta alcanzada.

3.13. Determinación de lipoxigenasa (LOX).

Extracción de LOX. La extracción se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Van der Ven *et al.* (2005) con algunas modificaciones. 50 ml de muestra se vertieron en tubos de polipropileno (32 mm de diámetro y 115 mm de longitud) que se centrifugaron a 3000g en una centrífuga Sigma 4K15 (Sigma, Postfach, Alemania) durante 60 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para el análisis de la actividad enzimática.

Análisis de LOX. La determinación de actividad de LOX se realizó según el procedimiento descrito por Axelrod *et al.* (1981). La reacción se llevó a cabo a 25°C en una cubeta de cuarzo de 1,0 cm. La mezcla del ensayo contenía 2,945 ml tampón borato de sodio a pH 9, 25 μ l de linoleato de sodio y 30 μ l de sobrenadante procedente de la muestra centrifugada. Para la cubeta de referencia, el sobrenadante se calentó a ebullición durante 5 minutos para inactivar la enzima. El contenido de la cubeta se mezcló con cuidado para, inmediatamente después, realizar la lectura de la absorbancia a 234 nm en modo continuo, usando un espectrofotómetro CECIL 9000 (CECIL Instruments, Cambridge, Reino Unido). Para expresar la actividad de LOX de las muestras, una unidad de enzima se tomó como el equivalente a un aumento en la absorbancia de $0,01\text{min}^{-1}$. El análisis se realizó por triplicado.

3.14. Determinación de la oxidación.

Preparación de la curva patrón de malonaldehído (MDA). Se realizó según el procedimiento de Botsoglou *et al.* (1994). Se pesaron 73,2 mg de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), que se vertieron en un tubo de ensayo, se diluyeron con 10 ml de HCl 0,1 N. Se sumergió el tubo en agua en ebullición durante 5 minutos para hidrolizar el TEP. Para la preparación de la solución madre de MDA (239 μ g/ml), se

aforó el TEP hidrolizado con agua destilada a un volumen de 100 ml. Se transfirió 1 ml de solución madre de MDA a un matraz aforado de 100 ml y se enrasó con agua destilada, para obtener la solución de trabajo de MDA (2,39 µg/ml), con la que se realizaron las diluciones para la preparación de la curva patrón.

Para el estudio de licuado de soja, el análisis se efectuó después de haber llevado a cabo los tratamientos; en el estudio de almacenamiento de los yogures de soja, el análisis se efectuó los días 1 y 28 de almacenamiento. Los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis de oxidación. La preparación de la muestra se realizó siguiendo el procedimiento de Fenaille *et al.* (2001). 3 ml de muestra se transfirió a un tubo pirex de 10 ml y se les adicionó 2,4 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%, ácido tricloroacético (TCA) al 5% y 2,4 µl de butilhidroxitolueno (BHT) al 0,8% en etanol. La mezcla se homogenizó y se centrifugó (Centrifuga Sigma Model 4K 15, Postfach, Germany) a 2700g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos que se mantuvieron en baño de agua a 70°C durante 1 h. Se preparó un tubo al que se denominó blanco, adicionando agua en lugar de la muestra.

Después de enfriarse los tubos en agua, la absorbancia se midió usando un espectrofotómetro CECIL 9000 (CECIL Instruments, Cambridge, Reino Unido) a 521,5 nm. El espectro de la disolución de malonaldehído (MDA) se registró de 400 a 650 nm a una velocidad de absorbancia de 240nm min⁻¹ contra la reacción del blanco. La tercera derivada se obtuvo por diferenciación electrónica del espectro y se realizó la cuantificación usando la curva patrón de calibración.

3.15. Análisis de la actividad del inhibidor de tripsina (IT).

Extracción de IT. Se realizó según el procedimiento de Van der Ven *et al.* (2005). El licuado de soja se diluyó 5 veces en una solución de NaOH 0,015M y NaCl 0,5M. La solución se agitó durante 2h a temperatura ambiente y se centrifugó con una ultracentrífuga Beckman Modelo L8 60M (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA) a 19000 rpm y 20°C durante 20 min. El sobrenadante se utilizó para el análisis de la actividad del inhibidor de tripsina.

La determinación de la actividad del IT se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Hamerstrand *et al.* (1981). Para la obtención del tampón Tris, 1,21g de tris

hidroximetil aminometano y 0,59 g de cloruro de calcio dihidratado se disolvieron en 180 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 8,2 con HCl 1N y se aforó con agua destilada a un volumen de 200 ml. Para la formulación del BAPA, se disolvieron 0,080g de N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilina hidrocloreto (BAPA) en 2 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y se aforó a un volumen de 200 ml con tampón Tris previamente calentado a 37°C. Para preparar la solución de tripsina, se pesaron 0,004 g de tripsina y se enrasaron con HCl 0,001N a un volumen de 200 ml.

Preparación de las muestras. 30 μ l del extracto de IT se diluyeron en un matraz aforado de 10 ml y se enrasó con tampón Tris. Para cada muestra se utilizaron cuatro tubos de ensayo; primero, se adicionaron 2 ml del extracto de muestra diluido. Posteriormente, a 3 de los cuatro tubos se les adicionaron 2 ml de la solución tripsina, y se colocaron dentro de un baño de agua a temperatura de 37°C. A los cuatro tubos se adicionaron 5 ml de la solución BAPA. 10 min después se adicionó 1 ml de ácido acético al 30% para detener la reacción. Al cuarto tubo (el blanco de cada muestra) se adicionaron 2 ml de solución tripsina después de terminada la reacción. A cada paso en la adición de las soluciones, los tubos se homogenizaron rápidamente en un vórtex. Se prepararon dos tubos para la lectura del patrón de tripsina, al primero se agregó 2 ml de tripsina, al segundo 2 ml de agua destilada (blanco) y se repitió el procedimiento seguido con las muestras. Se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro CECIL 9000 Instruments (CECIL, Cambridge, Reino Unido) a 410 nm frente a su respectivo blanco. Los valores de cada muestra se restaron del valor del patrón de tripsina y la actividad residual del inhibidor de tripsina fue determinada con la fórmula siguiente:

$$\text{TI, mg g}^{-1} \text{ de muestra} = \frac{\text{Diferencia de absorbancia}}{0,019 \times 1,000} \times \text{factor de dilución}$$

En el estudio de licuado de soja el análisis se llevó a cabo después de haber realizado el tratamiento, en el estudio de almacenamiento de los yogures se realizó los días 1 y 28 de almacenamiento. Los resultados se expresaron en porcentaje de actividad residual del TI a partir de valor de la muestra control y los análisis se realizaron por triplicado.

3.16. Determinación de digestibilidad de proteína *in vitro*.

Las muestras se liofilizaron previamente en un liofilizador Modelo Telstar Cryodos 50 (Telstar®, Terrasa, España). El estudio de la digestibilidad *in vitro* se realizó según el procedimiento descrito por Hsu *et al.* (1977). 1,30 g de muestra liofilizada se suspendieron en 50 ml de agua destilada en un matraz, se ajustó a pH 8,0 con HCl 1,0N y/o NaOH 1,0N (de acuerdo al pH que presentaba de la muestra) y se mantuvo a temperatura constante a 37°C. Se preparó una solución multienzima con 1,6 mg/ml de tripsina, 3,1 mg/ml de quimotripsina y 1,3 mg/ml de peptidasa (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Se ajustó pH 8,0 con HCl 1,0N y/o NaOH 1,0 y se mantuvo en baño de hielo. Se añadieron 5 ml de la solución multienzima a las muestras, que fueron introducidas en un baño térmico de agitación Serie NE5-28 (Clifton., Newton Abbot, Devon) y se mantuvieron durante 10 min a una temperatura de 37°C. El pH se registró utilizando un pHmetro multicanal CINAC® Sistema (Ysebaert Dairy Division, Frepillon, Francia). El análisis se realizó por triplicado.

3.17. Fermentación del licuado de soja.

Para la elaboración de los yogures de soja se utilizó una mezcla comercial de cultivos de bacterias ácido-lácticas (DVS YF-3331, Chr. Hansen, Horsholm, Dinamarca), *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*, que se conservaba almacenadas a -70°C. Se descongeló y se diluyó a un volumen de 0,1% (v/v) en agua de peptona estéril (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Los licuados de soja fueron previamente calentados a una temperatura de 45°C en baño de agua. El cultivo diluido se inoculó al 0,03% (v/v) y las muestras se incubaron a 45°C (los recipientes y volumen dependieron de tipo de análisis). En el estudio de coagulación las muestras se mantuvieron en incubación hasta que alcanzaron pH 4,6; en el estudio de almacenamiento las muestras de incubaron durante 5 h y, posteriormente, se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta el momento de su análisis.

3.18. Cinética del proceso de acidificación del licuado de soja.

Las curvas de acidificación del licuado de soja se obtuvieron por monitorización continua del pH y la acidez mediante un pHmetro multicanal CINAC[®] (Ysebaert Dairy Division, Frepillon, Francia). El sistema controla la evolución de la variación del pH, la acidificación y la temperatura en tiempo real con múltiples electrodos. Cada electrodo es controlado de manera independiente y está conectado, a su vez, al módulo informático del sistema, dotado del programa específico para las diversas funciones del equipo y para analizar los resultados obtenidos. Las muestras se prepararon como se describió en el apartado 3.16 y se vertieron en matraces de 50 ml. Los electrodos se introdujeron en las muestras y, éstas, en un baño térmico de agitación Serie NE5-28, (Clifton., Newton Abbot, Devon), a 45°C. Las curvas de pH y temperatura se registraron hasta que las muestras alcanzaron pH 4,6.

3.19. Análisis de la acidez valorable.

Los licuados de soja (50 ml) inoculados se depositaron en vasos de polipropileno estériles que se incubaron a 45°C en estufa Selecta (Afora, S. A., Barcelona). La acidez se determinó mediante el procedimiento IDF (1991), utilizando un pHmetro MicropH Modelo 2001 (Crison, Barcelona, España). En el estudio de coagulación, la acidez se midió cada hora hasta que la muestra alcanzó pH 4,6 y en el estudio de almacenamiento, la acidez de los yogures almacenados a 4°C se analizó los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido láctico y se determinaron por duplicado.

3.20. Medida del pH.

Los licuados de soja (50 ml) inoculados se depositaron en vasos de polipropileno estériles que se incubaron a 45°C en estufa Selecta (Afora, S. A., Barcelona). El pH se midió usando un pHmetro MicropH Modelo 2001 (Crison, Barcelona, España). En el estudio de coagulación, el pH se midió cada hora hasta que la muestra alcanzó pH 4,6 y

en el estudio de almacenamiento, el pH de los yogures almacenados a 4°C se analizó los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento. Los análisis se realizaron por duplicado.

3.21. Evaluación del proceso de coagulación.

Las curvas de coagulación se obtuvieron con un coagulómetro Optigraph® (Ysebaert Dairy Division, Frepillon, Francia). El equipo está constituido por una pieza de aluminio que contiene 10 cubetas alineadas, de 1 x 3 cm de ancho y 5 cm de profundidad. Cada cubeta tiene dos ventanas de zafiro enfrentadas que permiten el paso de un haz de luz infrarroja. Esta pieza se introduce en un receptáculo del propio equipo, dotado de un elemento calefactor para lograr una temperatura constante dentro del intervalo entre 25 y 45°C, donde se localizan los diodos emisores y receptores a cada lado de las cubetas. El receptáculo se comunica con un módulo electrónico, que convierte las señales ópticas en eléctricas. El coagulómetro está conectado, a su vez, al módulo informático del sistema, dotado del programa específico para las diversas funciones del equipo y para analizar los resultados obtenidos. El principio de medición se basa en la atenuación de un haz de luz luminoso infrarrojo que atraviesa la muestra colocada en cubetas de 10 ml. El software explora las muestras de manera simultánea y en tiempo real. Las muestras se inocularon como se ha descrito previamente en el apartado 3.16. Inmediatamente después, se vertieron 10 ml en las cubetas del coagulómetro y se registraron las curvas durante 5 h, a una temperatura de 45°C. Se determinaron los parámetros de coagulación: tiempo de inicio de coagulación (TC), que viene determinado por el valor máximo de la primera derivada; velocidad o tasa de agregación (TA), que viene dada por la pendiente de la región lineal de la curva; y la densidad del entramado o red del gel (DG), relacionado con la firmeza alcanzada, y que se calcula restando el valor de la señal de voltaje final y el voltaje inicial en el comienzo de la coagulación.

3.22. Microestructura de los yogures de soja.

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Leica TCS4D (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) con objetivo de inmersión, a una longitud de onda

de 488 nm. Se mezclaron 5 ml de licuado inoculado con 3-4 gotas de isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la tinción de proteínas y con 4-5 gotas de rojo de Nilo para la tinción de las grasas, ambos previamente diluidos con etanol al 5%. Se introdujeron 4 gotas de muestra inoculada en un portaobjetos escavado, cubriéndolo con un cubreobjetos que se selló. Inmediatamente, se incubó a 45°C durante 5 h. Después, las muestras se mantuvieron en la cámara de frío a 4°C. Para el estudio de coagulación las muestras se observaron al cabo de 24 h. Para el estudio de almacenamiento se prepararon las muestras, se almacenaron a 4°C y se observaron los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento.

3.23. Análisis instrumental de textura de los yogures de soja.

Las muestras de licuado de soja (100 ml) se inocularon y se vertieron en un vasos de polipropileno (55mm de diámetro, 72 mm de altura) incubándose a 45°C en estufa hasta alcanzar pH 4,6. Inmediatamente después, se almacenaron a 4°C y se mantuvieron 24 h antes de realizar el análisis de textura.

Se realizó un ensayo de punción a 5°C con un texturómetro TA.TX2 Texture Analyzer (Stable Microsystems, Surrey, Reino Unido) provisto de una sonda cilíndrica de 25 mm de diámetro, a velocidad constante de punción de 2mm s^{-1} , hasta una profundidad de 25 mm. Se registraron curvas fuerza vs. distancia de las que se obtuvo la fuerza máxima, indicativa de la firmeza del gel. En el estudio del almacenamiento, los análisis se realizaron los días 1, 7, 14, 21 y 28. Se efectuaron cinco repeticiones del análisis para cada muestra.

3.24. Análisis de la capacidad de retención de agua (CRA) de los yogures de soja.

Los licuados de soja (30 g) inoculados se vertieron en tubos de plástico flexibles de polipropileno (32 mm de diámetro y 115 mm de longitud), las muestras se incubaron a 45°C en estufa. Para el estudio de coagulación, las muestras se incubaron hasta alcanzar pH 4,6 y para el estudio de almacenamiento las muestras fueron incubadas durante 5 h, realizando el análisis 24 h después de enfriarse a 4°C y a los días 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenaje a 4°C, respectivamente. La capacidad de retención de agua se realizó de

acuerdo al procedimiento de Remeuf *et al.* (2003). Los tubos se centrifugaron en una centrífuga Sigma 4K15 (Sigma, Postfach, Alemania) a 480g, 20°C durante 10 min. El agua expulsada fue pesada, y se expresó como porcentaje de agua retenida. El análisis se realizó por cuadruplicado.

3.25. Análisis de sinéresis espontánea.

Se vertieron 100g de licuado de soja inoculado en vasos cilíndricos (55 mm de diámetro, 72 mm de alto), se incubaron a 45°C durante 5 h y se almacenaron a 4°C. El suero expulsado espontáneamente se pesó los días 1, 7, 14, 21 y 28. La sinéresis espontánea se expresó como el peso de suero expulsado por g de muestra fermentada. El análisis se realizó por triplicado.

3.26. Evaluación sensorial del yogur de soja.

Se llevó a cabo una prueba de aceptación de los yogures de soja por un grupo de 35 panelistas pertenecientes al Departamento de Ciència Animal i dels Aliments. Tres yogures de soja se prepararon como se describió en el apartado anterior. Dos fueron elaborados a partir de licuado de soja tratado por UHPH a 200 y 300 MPa, ambos con una temperatura de entrada de 40°C y el tercero con licuado de soja tratado por UHT. Los yogures de soja presentados a los catadores fueron identificados por un número de tres dígitos asignado al azar y se les solicitó que indicaran su preferencia en una escala ordinal de 5 valores e impresión global acerca de los yogures de soja. Los resultados de preferencia fueron expresados en porcentajes.

3.27. Análisis estadístico.

Los datos se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante el Análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico SPSS versión 12.0.1, Sistema SPSS® para WINTM (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Se utilizó el test de Tukey para la comparación de datos tomando un nivel de significancia del 95%.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio del licuado de soja

4.1.1. Composición química.

Los valores medios de los componentes de los licuados de soja, expresados en porcentaje (\pm d.e.) fueron los siguientes: 3,82 (\pm 0,02) de proteína, 1,78 (\pm 0,016) de grasa, 1,86 (\pm 0,30) de glúcidos, 0,68 (\pm 0,15) de cenizas y 8,27 (\pm 0,40) de extracto seco. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores (Rosenthal *et al.*, 2003; Iwuoha & Umunnakwe, 1997) y parcialmente concuerdan con lo descrito por Achouri *et al.* (2007a); sin embargo, es importante mencionar que la composición química del licuado puede variar dependiendo de los diferentes métodos de extracción, de la variedad del grano y su periodo de almacenamiento (Iwuoha & Umunnakwe, 1997; Achouri *et al.*, 2007a).

4.1.2. Microbiología.

En la tabla 7 se observan los resultados del análisis microbiológico. Los licuados de soja tratados por UHPH mostraron una reducción de la carga microbiana respecto al producto base. Los tratados a 200 y 300 MPa a temperatura de entrada de 40°C, disminuyeron su recuento total en 2,42 y 4,24 log UFC/ml, respectivamente. En relación a las esporas, la reducción fue de alrededor de 2 log UFC/ml; mientras que en la población de enterobacterias no se detectó ningún superviviente. Estas reducciones se observaron en ambos tratamientos de UHPH. Los resultados encontrados fueron similares a los descritos por otros autores que realizaron estudios en leche. Pereda *et al.* (2006) demostraron que la aplicación de presiones de 200 y 300 MPa a temperatura de entrada de 30 y 40°C, provocan la reducción de la carga microbiana a niveles semejantes a los de la leche pasteurizada (90°C, 15s), obteniendo disminuciones de 3-4 log UFC/ml. De igual forma, Thiebaud *et al.* (2003), aplicando presiones de 200 y 300 MPa a temperatura de entrada de 24°C, encontraron una disminución del recuento total de entre 1 y 2,8 log UFC/ml, respectivamente, mientras que Smiddy *et al.* (2007), empleando presiones de 200 y 250 MPa, consiguieron una disminución de alrededor de 5 log UFC/ml en el recuento total y de 4 log UFC/ml en la población de coliformes. Es presumible que los microorganismos sean lesionados o inactivados a causa de la pérdida

repentina de la presión, la torsión, el roce o la cavitación durante la aplicación del tratamiento UHPH. Aparentemente, el principal daño es ocasionado en la pared celular, ya que el tratamiento provoca su ruptura y, por tanto, la descarga del contenido citoplasmático de la célula, que ocasiona la muerte celular (Kheadr *et al.*, 2002; Vachon *et al.*, 2002).

Tabla 7. Recuento de poblaciones bacterianas (log UFC/ml \pm d.e.) de los licuados de soja PB y UHPH.

Tratamientos	Recuento total	Esporas	Enterobacterias
PB	4,81 \pm 0,96	2,37 \pm 1,21	2,28 \pm 2,54
200 MPa 40°C ^a	2,39 \pm 1,25	0,36 \pm 0,32	ND ^b
300 MPa 40°C ^a	0,57 \pm 0,50	0,24 \pm 0,34	ND ^b

^a Temperatura de entrada en los tratamientos UHPH, ^b Indica que no se detectaron colonias.

4.1.3. Microestructura.

Para el estudio de la microestructura de los licuados de soja se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica, que permite la fijación de proteínas y grasa, y que se sirve de cortes ultrafinos, permite la observación a muy grandes aumentos de las estructuras coloidales que se encuentran dispersas en el licuado de soja. En las micrografías (Figura 6) se observó la esperada reducción del tamaño de las gotas producida por UHPH, las cuales presentaron forma esférica y bien protegidas por proteína, muchas de ellas en estado de agregación y unidas, a su vez, a través de agregados proteicos. Sin embargo, según se apreció en las imágenes a grandes aumentos, el establecimiento de puentes entre gotas parecen ser de carácter débil, por lo que cabe pensar que se trata de un fenómeno de floculación y, por lo tanto, reversible. Por otra parte, en ningún caso se detectaron estructuras que pongan de manifiesto la dinámica de fenómenos de coalescencia, aunque en algunos tratamientos UHPH es posible que se hayan producido, dando como resultado la presencia de gotas de tamaños mayores a los esperados. En las micrografías a pequeños aumentos, se detectaron diferencias de tamaño de los glóbulos de grasa dependiendo de los tratamientos

aplicados; apenas se hallaron diferencias entre los licuados PB y UHT. Sin embargo, el tratamiento UHPH dio lugar a una disminución en el tamaño de los glóbulos grasos, aunque no se revelaron diferencias entre las presiones de 200 y 300 MPa. Sin embargo, sí se pudo observar que al aumentar la presión de 200 a 300 MPa, aparecieron pequeñas formaciones de agregados de glóbulos de grasa, especialmente en una estructura (q) diferente (Figura 6, 300 MPa), que podría describirse como el resultado de la inclusión de glóbulos grasos muy pequeños en el interior de agregados de proteína. En las micrografías a mayores aumentos, se observa el aspecto de los agregados de proteína, los cuales aparecieron más dispersos en el PB, mientras que su densidad se acrecentó en los licuados tratados por UHPH y fue mayor en el UHT. Como se comenta más adelante, los resultados del análisis por calorimetría diferencial de barrido de los licuados tratados por UHT y a 300 MPa revelaron una total desnaturalización proteica, lo que concuerda con las imágenes de TEM, en las que fue evidente la presencia de agregados de proteína en la fase continua, así como también la formación de agregados de glóbulos grasos. Estas imágenes ayudan a confirmar la hipótesis de que la proteína desnaturalizada actúa como puente para mantener parte de los glóbulos de grasa en forma agregada.

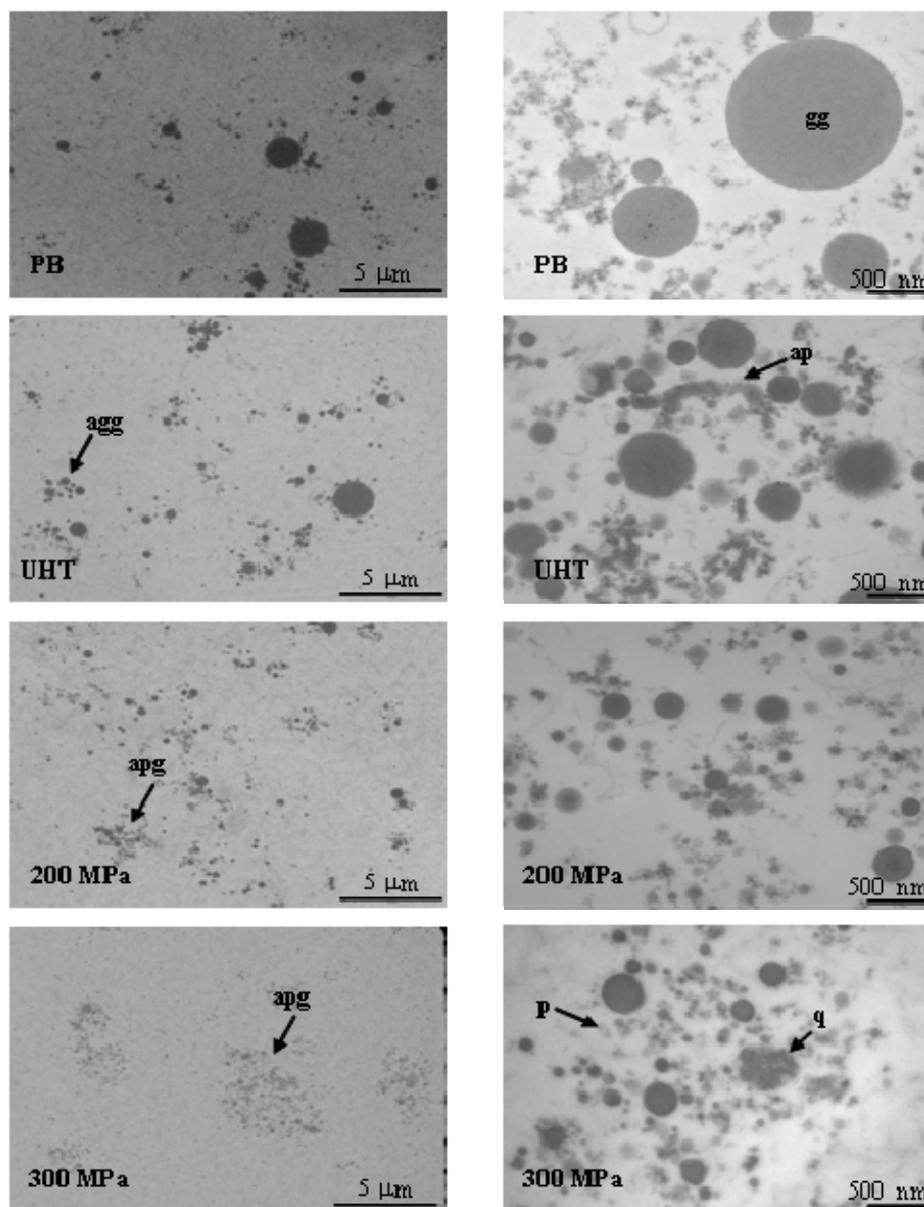


Figura 6. Micrografías TEM de los licuados de soja PB, UHT y UHPH. (gg) glóbulos de grasa, (ap) agregados de proteína, (agg) agregados de glóbulos de grasa, (apg) agregados de proteínas-glóbulos de grasa, (p) proteína (q) agregados de inclusión de microgotas de grasa en proteína.

4.1.4. Tamaño de partícula.

Los resultados de tamaño de partícula se describen a través de los parámetros $D_{v,0,5}$, $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ (Tabla 8), obtenidos mediante el análisis de las curvas de distribución, utilizando un equipo con una capacidad de detección de tamaños de partícula entre 0,04 y 2000 μm . Este amplio intervalo de tamaños de partícula no solo incluye glóbulos de grasa, sino también pequeñas partículas, agregados de proteína e incluso agregados mixtos. Las muestras que presentaron mayores valores de los parámetros $D_{v,0,5}$ y $d_{3,2}$ fueron el PB seguido por el licuado tratado por UHT. Esto indica que la homogenización convencional, aplicada a estos últimos, no produjo una reducción importante del tamaño de partícula en comparación con la molienda en molino coloidal aplicada al PB. Los licuados tratados por UHPH mostraron una reducción considerable de tamaño de partícula comparados con los del PB y UHT. Sin embargo, no se produjo una reducción adicional al aumentar la presión de 200 a 300 MPa, sino al contrario, pues al incrementar la presión, el licuado tratado a 300 MPa exhibió valores significativamente mayores de los diámetros medio $D_{v,0,5}$ y $d_{2,3}$, aunque estos siguieron siendo muy pequeños. El licuado de soja tratado a 300 MPa mostró los valores significativamente más altos del parámetro $d_{4,3}$ en comparación con los demás tratamientos. Este parámetro, que refleja la presencia de pequeñas cantidades de agregados, presentó una variabilidad muy alta (~51%) para el tratamiento a 300 MPa, aunque siempre fue el que tuvo valores más altos de este parámetro. Esto sugiere la presencia de fenómenos de coalescencia bajo estas condiciones de UHPH. Por otra parte, la curva de distribución de tamaños de partículas (Figura 7) correspondiente a los productos tratados a 300 MPa, mostró siempre en su distribución bimodal, la presencia de una cola en el intervalo de 10-170 μm , unos valores muy elevados para tratarse de glóbulos de grasa individuales, lo que hizo pensar que se trata de agregados que, a su vez, fueron observados mediante microscopía electrónica del licuado tratado a 300 MPa, además de la presencia de algunos glóbulos de gran tamaño. Los PB y UHT mostraron una pequeña cola alrededor de los valores de 1,5-2,5 y 1-6 μm respectivamente, lo que también apunta a una posible formación de agregados pero en un intervalo de tamaño mucho menor, reflejados por los valores del parámetro $d_{4,3}$ más bajos. Este comportamiento también fue observado por Hayes *et al.* (2005) en leche tratada por UHPH, mostrando un incremento del parámetro $d_{4,3}$ al incrementar la presión de 200 a 250 MPa, y sugiriendo que se debía a la formación de agregados parciales de glóbulos de grasa muy pequeños. Esta

referencia, así como la constatación de la presencia de estos agregados a través de la observación por TEM, pone de manifiesto que el tratamiento UHPH a 300 MPa provoca cambios sustanciales en el tipo de estructuras coloidales, que se obtienen como consecuencia de la magnitud de los tratamientos UHPH. Una hipótesis que ha sido apuntada por algunos autores para explicar estos cambios, es que, a partir de ciertas magnitudes de presión, no existiría la suficiente disponibilidad de proteína para dar una correcta protección a la superficie de la fracción de grasa incrementada por el tratamiento UHPH (Hayes & Kelly, 2003a; Hayes *et al.*, 2005). Sin embargo, según se desprende de las observaciones por TEM, el término disponibilidad no haría referencia tanto a la cantidad de proteína, que sí la hay, sino a cuestiones de reorganización de la proteína en la interfase aceite-agua inmediatamente después del paso del producto por la válvula de alta presión. En este sentido, hay que mencionar que el mayor grado de desnaturalización proteica producido en tratamientos UHPH más severos, como 300 MPa, puede dar lugar a una competencia entre la interacción proteína-proteína y proteína-grasa que apoyaría los fenómenos descritos. De manera particular, entre todos los tratamientos analizados, el tratamiento a 200 MPa fue el que presentó un intervalo más estrecho, y por tanto con una distribución más homogénea, con distribución monomodal en el tamaño de partículas.

Tabla 8. Valores promedio (\pm d.e) de los parámetros relacionados con el tamaño de partícula y temperatura de entrada y de salida de los licuados de soja PB UHT y UHPH.

Tratamientos	T_0 (°C) ¹	T_1 (°C) ²	Parámetros		
			$D_{v,0,5}$ (μm) ³	$d_{3,2}$ (μm) ⁴	$d_{4,3}$ (μm) ⁵
PB	-	-	$0,36 \pm 0,01^a$	$0,30 \pm 0,03^a$	$0,55 \pm 0,06^b$
UHT	-	-	$0,20 \pm 0,11^b$	$0,27 \pm 0,02^b$	$0,47 \pm 0,09^b$
200 MPa	40	87-88	$0,11 \pm 0,01^d$	$0,10 \pm 0,01^d$	$0,13 \pm 0,01^c$
300 MPa	40	99 - 108	$0,14 \pm 0,01^c$	$0,13 \pm 0,01^c$	$4,36 \pm 2,23^a$

^{a-d}. Distintos superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ¹Temperatura de entrada en los tratamientos UHPH; ²Temperatura alcanzada por los licuados en la válvula de alta presión; ³ $D_{v,0,5}$, es el diámetro por debajo del cual se hallan el 50% de la fracción de volumen de las partículas; ⁴ $d_{3,2}$, es el diámetro medio de la superficie total correspondiente a las partículas y ⁵ $d_{4,3}$, es un parámetro relacionado con la presencia de pequeñas cantidades de agregados de partículas.

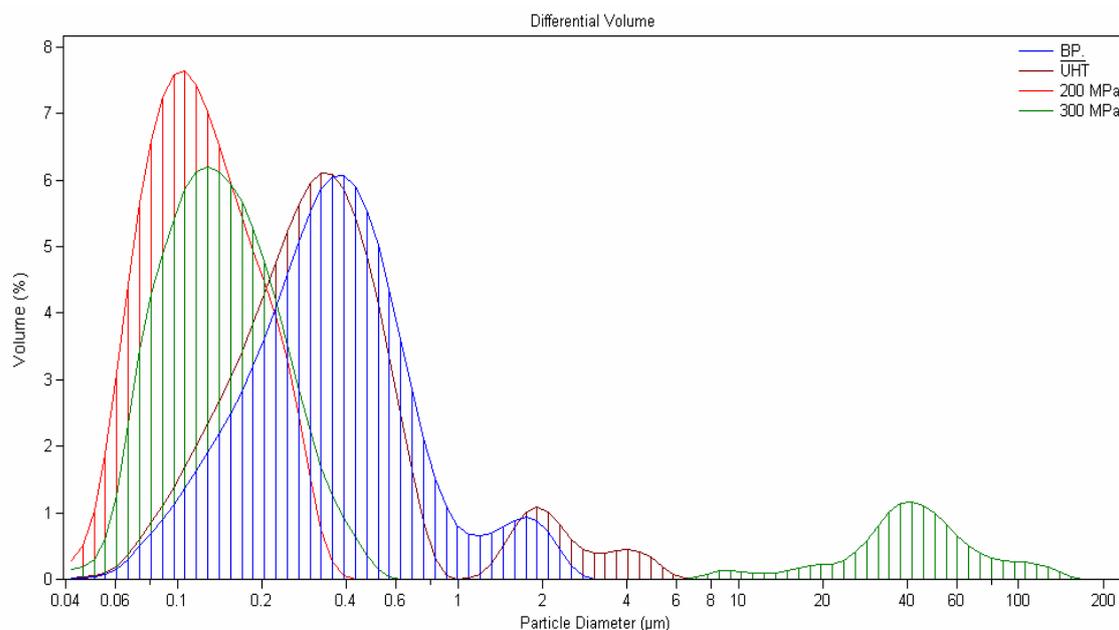


Figura 7. Distribución de tamaño de partículas de licuados de soja PB, UHT y UHPH ($T_0=40^\circ\text{C}$)

4.1.5. Viscosidad.

El análisis de las curvas de flujo de los licuados de soja, en general, mostró un comportamiento Newtoniano en el ajuste al modelo de la Ley de Potencia, reflejado por los índices de comportamiento (n) que fueron prácticamente 1, por lo que el índice de consistencia K , coincidió con el valor de viscosidad a la temperatura de medida. En la figura 8 se representan los valores de viscosidad de los licuados sometidos a los diferentes tratamientos. El PB presentó mayor viscosidad comparado con las muestras tratadas por UHT y UHPH. Este resultado, se debe a que el PB solamente fue sometido a una homogeneización en molino coloidal para obtener la emulsión de partida que, posteriormente, fue sometida a otra homogeneización por alta presión convencional previa al tratamiento UHT o UHPH. En el producto tratado por UHT se halló un valor significativamente más bajo de viscosidad ($p < 0,05$) al observado en los licuados de soja PB y UHPH. Posiblemente, el aumento de la relación entre superficie/volumen de la fase dispersa, debido a la disminución del tamaño de partícula en los tratamientos por UHPH, sea la causa principal del mayor valor de viscosidad de estos licuados con respecto a los licuados UHT, ya que el incremento de superficie de las gotas contribuye al aumento de la fricción interna entre partículas, que es uno de los fenómenos que influyen sobre la viscosidad.

Por otra parte, los tratamientos a 200 y 300 MPa presentaron valores similares de viscosidad, lo que indica que un incremento de la presión a partir de unas determinadas condiciones no conduce a una disminución adicional del tamaño de partícula, sino todo lo contrario, como se explicó previamente. No obstante, tanto las pequeñas diferencias en tamaño de gota entre los tratamientos a 200 y 300 MPa, como la presencia de pequeñas cantidades de agregados de partículas no produjeron diferencias en los valores de viscosidad de estos dos tratamientos UHPH.

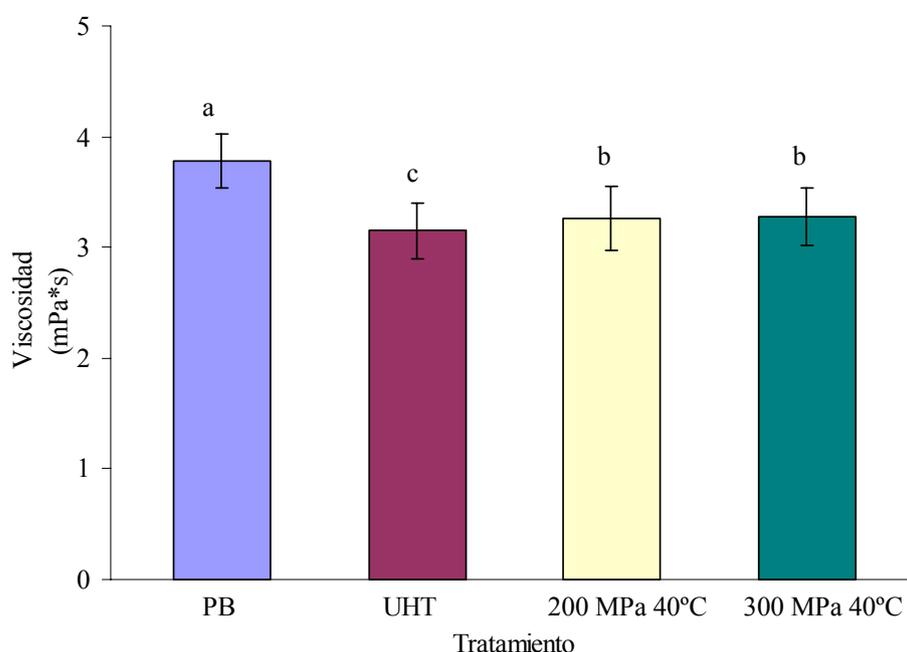


Figura 8. Valores medios de viscosidad (mPa*s \pm d.e.) de licuados de soja PB, UHT y UHPH. ^{a-c} Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.1.6. Desnaturalización de proteínas.

En la figura 9 pueden observarse los termogramas obtenidos por DSC para evaluar la desnaturalización de la proteína de los licuados de soja estudiados. Estos termogramas presentaron picos endotérmicos en donde se puede observar el fenómeno de desnaturalización, causado por el aumento de la temperatura de 20 a 100°C, y que va acompañado por una significativa absorción de calor. El licuado PB y el tratado a 200 MPa, mostraron un pico endotérmico a los $94,93 \pm 0,58^\circ\text{C}$, que corresponde a la

desnaturalización de la globulina 11S, mientras que el pico endotérmico de la globulina 7S no se percibió debido a que ésta se desnaturaliza alrededor de los 70°C (German *et al.*, 1982), siendo ésta temperatura inferior a la alcanzada en todos los tratamientos experimentales. El pico que se observa en el licuado de soja tratado a 200 MPa, generó una entalpía de calor de $0,12 \pm 0,03$ J/g. Esta entalpía endotérmica fue significativamente más pequeña que la del PB ($0,23 \pm 0,02$ J/g), lo que sugiere que la globulina 11S se encuentra parcialmente desnaturalizada. En los licuados tratados a 300 MPa y por UHT, no se hallaron picos endotérmicos, lo que indica una completa desnaturalización de las proteínas en ambos tratamientos. Flourey *et al.* (2002a) también encontraron un comportamiento similar de la globulina 11S en disoluciones acuosas de soja utilizando presiones de 250 y 350 MPa, apuntando que el efecto de la temperatura y de la presión sobre los cambios en la conformación de las proteínas no son similares. Las interacciones débiles como los puentes de hidrógeno, son más sensibles al calor y son estables o sólo ligeramente afectadas por la presión, mientras que los enlaces más sensibles a la presión (interacciones electrostáticas e hidrofóbicas), son mucho menos sensibles a la temperatura. Sin embargo, en presencia de oxígeno, el incremento de la presión y temperatura, favorecen el intercambio y/o formación de enlaces disulfuro.

En estudios sobre el comportamiento de las proteínas de soja tratadas por alta presión hidrostática, se manifiesta que la desnaturalización de la globulina 11S empieza a los 200 MPa durante 15 min y se completa a 400 MPa durante 10 min (Molina *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Estos autores y Kajiyama *et al.* (1995), mencionan que después de la disociación inducida por la presión, las nuevas cadenas estabilizadas por enlaces disulfuro y la exposición de grupos hidrofóbicos pueden causar la agregación.

La total desnaturalización de la globulina 11S durante el tratamiento a 300 MPa, puede ser debida principalmente al paso del flujo a través de la válvula de homogenización que induce fenómenos de cavitación, cizalla y turbulencia, que de manera simultánea afectaron grandemente la conformación macromolecular de la globulina; mientras que la desnaturalización de la globulina 11S en los licuados de soja tratados por UHT es provocada mayoritariamente por el tratamiento térmico.

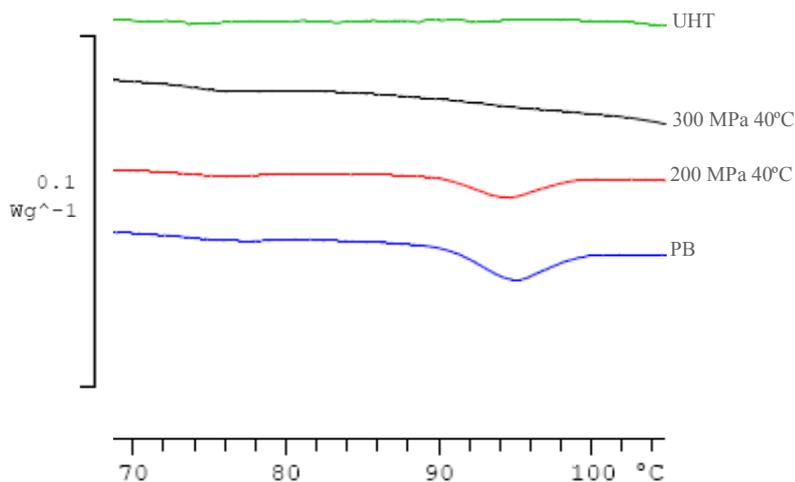


Figura 9. Termogramas de licuados de soja PB, UHT y UHPH.

4.1.7. Estabilidad física.

La evaluación de la estabilidad física de los licuados de soja se realizó los días 1, 30 y 60, manteniéndolos almacenados a 37°C en presencia de un agente conservador para evitar la coagulación del producto. El índice de estabilidad se valoró determinando el % p/p) de sólidos sedimentados después de la centrifugación. Un valor alto de este parámetro indica una baja estabilidad como consecuencia de la sedimentación de las partículas. A su vez, este parámetro también puede relacionarse con la percepción de granulosidad en la boca. Adicionalmente, se llevó a cabo la observación visual de la presencia de sedimento en el fondo del envase durante el almacenamiento.

En el licuado tratado por UHT se observó, después de 7 días de almacenamiento, una capa delgada de precipitado en fondo de la botella, mientras que en los UHPH no se percibió ningún tipo de sedimentación durante el almacenamiento. Esta observación visual coincide con los índices de estabilidad, que se muestran en la tabla 9. El licuado tratado por UHT, en general presentó valores que prácticamente duplicaron el índice de estabilidad respecto a los tratados por UHPH en los tres días analizados. Sin embargo, a los 30 y 60 días se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del índice de estabilidad (mayor % de partículas sedimentadas) de las muestras tratadas a 300 MPa. Nik *et al.* (2008); y Ono *et al.* (1991) mencionan que, al obtener el licuado de soja por extracción y filtración, las partículas grandes se encuentran compuestas de globulina 11S que se pueden sedimentar fácilmente por centrifugación; mientras que cuando son

posteriormente esterilizados por el método convencional o por UHT, el tratamiento térmico causa la desnaturalización de las proteínas provocando su precipitación (Ang & Kwik, 1985). En el PB, la presencia de partículas proteicas relativamente grandes procedentes de la molienda facilitaría la sedimentación por centrifugación. En los licuados UHT, la mayor inestabilidad puede atribuirse a dos aspectos: por una parte, a que la previa homogenización no redujo en mayor grado el tamaño de partícula, ya que éstas mostraron valores mínimos de diferencia respecto al PB, y por otra, a que la desnaturalización completa de las proteínas conlleva una disminución de su solubilidad, resultando más fácilmente sedimentables, incluso sin necesidad de la aplicación de la fuerza centrífuga. En los licuados tratados por UHPH, la mayor estabilidad puede atribuirse a la reducción del tamaño de partícula. No obstante, el incremento del índice de estabilidad del producto tratado a 300 MPa durante el almacenamiento en comparación con el de 200 MPa, puede estar relacionado con la ya descrita presencia a esta presión de grandes partículas o agregados, que pudieron actuar como núcleo de agregaciones para las partículas más pequeñas durante la sedimentación forzada por centrifugación.

Tabla 9. Índice de estabilidad durante el almacenamiento de los licuados de soja PB, UHT y UHPH¹.

Tratamientos	BP	UHT	200 MPa 40°C ²	300 MPa 40°C ²
Día 1	4,34 ± 0,76 ^{ax}	6,52 ± 1,54 ^{aw}	2,62 ± 0,41 ^{cy}	2,55 ± 0,47 ^{by}
Día 30	3,94 ± 0,16 ^{bx}	5,18 ± 1,57 ^{cw}	2,73 ± 0,49 ^{bz}	3,44 ± 0,99 ^{ay}
Día 60	4,56 ± 0,27 ^{ax}	5,31 ± 1,58 ^{bw}	2,90 ± 0,47 ^{az}	3,27 ± 0,34 ^{ay}

¹Valores expresados en % ± d.e. (p/p) de partículas sedimentadas por centrifugación. ²Temperatura de entrada en los tratamientos UHPH. ^{a-c}Distintos superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ^{w-z}Distintos superíndices entre filas indican diferencias significativas.

4.1.8. Color.

El color es un importante atributo de calidad del licuado de soja, ya que puede condicionar la aceptabilidad del producto por el consumidor. La evaluación del color se realizó con un colorímetro portátil Hunter Lab, obteniendo los valores de las

coordenadas L^* , a^* y b^* , las cuales, además de aportar la información relativa a los parámetros del color permitieron calcular la diferencia total de color (ΔE) entre los licuados UHPH y UHT, así como entre estos y los licuados PB. Los resultados que aparecen en la tabla 10 muestran que los licuados PB y UHT presentaron resultados similares, mostrando mayores valores de L^* que los tratados por UHPH, lo que indica que estos últimos presentaron una apariencia ligeramente más oscura. A su vez, el licuado tratado a 300 MPa presentó una disminución adicional de la luminosidad comparado con el tratado a 200 MPa. En relación al valor de las coordenadas a^* y b^* , a pesar de que los licuados mostraron diferencias en sus valores ($p < 0,05$) todos ellos se encontraron en el cuadrante verde-amarillo. Respecto a la coordenada $-a^*$ (verde) los tratamientos UHPH presentaron una variación creciente de la intensidad del verde, que se intensificó con el incremento de la presión. Por otra parte, la coordenada $+b^*$ (amarillo) mostró un descenso de su magnitud en los tratamientos UHPH respecto al PB y al UHT, disminuyendo con la presión aplicada. Al observar los parámetros ΔE^{UHT} y ΔE^{PB} se evidencia que el licuado tratado a 300 MPa presentó la mayor diferencia total de color con ambos productos.

Los valores de las coordenadas de color del PB fueron similares a los descritos en otros estudios realizados con licuados de soja (Achouri *et al.*, 2007a; Saito *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 1989); a su vez, el licuado UHT estuvo dentro de los valores normales presentados por otros productos comerciales analizados por Achouri *et al.* (2007a). Por otra parte, hay que mencionar que los parámetros de color varían dependiendo de la variedad del grano, de las condiciones de almacenamiento, la región del cultivo y el método de obtención del licuado (Achouri *et al.*, 2007a; Saito *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 1989). De los resultados se desprende que el tratamiento UHPH fue responsable de las variaciones observadas en el color de los licuados, probablemente asociadas, sobretudo, a la modificación del tamaño de partícula y no tanto a la intensidad del tratamiento térmico, como podría ocurrir a causa de la formación de pigmentos pardos, productos de las reacciones de Maillard (Kwok *et al.*, 1999). La composición y estructura de una emulsión, esto es, la concentración y tipo de cromóforos, y el tamaño, concentración, estado de agregación y naturaleza de las partículas, determinan el color de las mismas (Chantrapornchai *et al.*, 1998; Chanamai & McClements, 2001). En una emulsión con mayor número de gotas predominan los efectos de dispersión, incrementándose la reflexión de la luz y por lo tanto la emulsión posee una apariencia

más clara (Chantrapornchai *et al.*, 1998). De acuerdo a esto, cabría esperar que la reducción del tamaño de partícula debida a la UHPH diera lugar a un incremento de la luminosidad, especialmente en el licuado tratado a 200 MPa, que es el que posee un tamaño medio de partículas menor y más uniforme. Sin embargo, éste presentó un valor de L^* ligeramente menor que los licuados PB y UHT, probablemente debido a otros cambios fisicoquímicos que influyen sobre la luminosidad. Respecto a los licuados tratados a 300 MPa, los agregados de proteína y proteína-grasa pudieron ser los causantes del descenso de la luminosidad, debido a que su presencia provoca una disminución de la reflexión de luz.

Tabla 10. Valores (promedio \pm d.e.) de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y diferencia de color (ΔE) en licuados de soja PB, UHT y UHPH¹.

Tratamientos	L^*	a^*	b^*	ΔE^{UHT}	ΔE^{PB}
PB	84,15 \pm 0,25 ^a	-1,06 \pm 0,18 ^b	21,21 \pm 1,30 ^a	3,35 \pm 1,78 ^b	—
UHT	84,31 \pm 1,77 ^a	-0,28 \pm 0,68 ^a	18,37 \pm 0,76 ^b	—	3,35 \pm 1,78 ^c
200 MPa 40°C ²	82,24 \pm 0,53 ^b	-2,00 \pm 0,17 ^c	16,57 \pm 1,01 ^c	3,89 \pm 0,57 ^b	5,12 \pm 0,50 ^b
300 MPa 40°C ²	79,68 \pm 0,58 ^c	-2,66 \pm 0,17 ^d	16,01 \pm 1,03 ^d	5,83 \pm 1,90 ^a	7,05 \pm 0,58 ^a

¹Distintos superíndices en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$), ²Temperatura de entrada en los tratamientos UHPH.

4.1.9. Componentes volátiles.

El flavor de licuado de soja juega un rol crítico en la calidad global del producto ya que, en ocasiones, es un factor limitante para la aceptación del consumidor, debido al sabor amargo y a los aromas a haba verde y a rancio, que se manifiestan dependiendo de los métodos de obtención del licuado (Liu, 1999).

Mediante el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-CG-MS) se obtuvieron las áreas absolutas de los compuestos volátiles responsables del aroma de los licuados de soja en sus diferentes tratamientos.

Se identificaron 63 compuestos aromáticos (Tabla 11), que se agruparon atendiendo a su estructura química en aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, compuestos con núcleo aromático, ésteres, furanos y otros de diferentes grupos químicos detectados en menor cantidad. Otros autores (Min *et al.*, 2005b; Wilkens & Lin, 1970) encontraron similares resultados, aunque los principales grupos químicos de las sustancias aromáticas fueron los aldehídos, alcoholes, hidrocarburos y cetonas. A algunos de estos grupos pertenecen a compuestos volátiles que son extremadamente importantes en el perfil aromático del licuado de soja porque proporcionan olores desagradables, los cuales proceden de reacciones enzimáticas o transformaciones causadas por la alta temperatura a partir de aminoácidos, proteínas, glúcidos y lípidos (MacLeod & Ames, 1988). Además, algunos compuestos volátiles de importancia como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas y furanos proceden de la oxidación de los lípidos, específicamente de la oxidación de radicales libres de los ácidos linoleico y linolénico del aceite de la soja (Min *et al.*, 2005b).

En general, entre los licuados de soja estudiados, el más diferente en compuestos volátiles fue el tratado por UHT. Éste contuvo tiofeno, acetona, butirato de etilo y una serie de compuestos derivados del trimetil; sin embargo, no se detectaron propanal, 2,3-pentanodiona, t-2-hexenal, 2,4-hexadienal y 3-octeno-2-ona.

En cuanto al PB y los licuados tratados por UHPH, dentro del grupo de los aldehídos, principalmente el hexanal, se observaron altos valores absolutos comparados con el licuado tratado por UHT. El hexanal es un compuesto presente en la fracción volátil de los productos de la soja y algunos autores mencionan que es probablemente uno de los principales compuestos que contribuye al aroma desagradable (*off-flavor*) en el licuado de soja (Achouri *et al.*, 2006; Achouri *et al.*, 2007a; MacLeod & Ames, 1988; Wilkens *et al.*, 1967). Se ha mencionado que el desarrollo del *off-flavor* es consecuencia de los productos procedentes de la rancidez oxidativa promovida por la actividad LOX sobre los ácidos grasos insaturados. Estos productos son muy difíciles de eliminar por su alta afinidad con las proteínas de la soja (Liu, 1999). En nuestro estudio, no se detectó actividad de la LOX en los licuados de soja tratados por UHPH y UHT, por lo que únicamente una pequeña parte del hexanal detectado en estos licuados tendría su origen en la actividad LOX desarrollada durante la manipulación inicial del producto, mientras que mayoritariamente sería consecuencia de los fenómenos de la oxidación

autocatalítica, como producto secundario durante el procesamiento y almacenamiento de los productos (Fenaille *et al.*, 2003; Matoba *et al.*, 1985; Sanches-Silva *et al.*, 2004). Desde este punto de vista, los contenidos de hexanal observados concuerdan con los resultados de la oxidación analizados por TBA en los licuados de soja estudiados. Es presumible que esta situación se produjera por el cambio de presión ultra rápido que tiene lugar al paso del líquido por la válvula UHPH, favoreciendo la formación de burbujas de aire (Thiebaud *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2002). Esto pudo facilitar el contacto con el oxígeno y la consiguiente iniciación de la oxidación mediante la formación de hidroperóxidos (Robinson *et al.*, 1995).

Otro aldehído presente fue el 2-heptenal, que se encontró más abundantemente en el PB y en los licuados tratados por UHPH, principalmente en el tratado a 300 MPa 40°C; este volátil se forma por la acción de la excitación de la riboflavina, contenida en el licuado de soja en contacto con el oxígeno y la luz, la cual promueve el desencadenamiento de las reacciones de oxidación que dan lugar a la formación del 2-heptenal. Por ello, es importante preservar al máximo la producción del licuado de soja de la exposición a la luz y aire para minimizar la formación de olor y gusto a haba (Min *et al.*, 2005b).

Del grupo de los alcoholes volátiles, los productos tratados por UHT, presentaron mayores valores en área absoluta comparados con los tratados por UHPH y el PB. Se encontraron 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, heptano, 1-hexanol, 3-octanol y 1-octeno-3-ol. Este último tiene un olor mohoso y se forma durante el remojo de la soja en agua como pretratamiento para la preparación de la soja (Wilkens & Lin, 1970).

Respecto al grupo de las cetonas, los licuados de soja tratados por UHPH presentaron más compuestos de este grupo en comparación con los licuados tratados por UHT. Por el contrario, del grupo de los hidrocarburos, los licuados tratados por UHT presentaron compuestos con áreas absolutas elevadas como el hexano, pentano y 2-metil-1,3 pentadieno; este grupo de volátiles procede de la β -oxidación catalizada por la LOX, de la oxidación del radical a ión carbonilo y de la descarboxilación a partir de ácidos grasos insaturados (Belitz & Grosch, 1997). Teniendo en cuenta que el licuado UHT no poseía actividad LOX, es probable que estos compuestos procedieran de los otros dos mecanismos antes mencionados, quizás favorecidos por las temperaturas mayores alcanzadas en dicho tratamiento.

En referencia a los compuestos con núcleo aromático, sus áreas absolutas fueron menores en los licuados tratados por UHPH respecto a los de UHT y el PB, y únicamente se observó la presencia del tiofeno en el licuado de soja tratado por UHT, el cual es un componente volátil que se forma por la hidrólisis de la tiamina y proporciona el aroma a carne cocida (Belitz & Grosch, 1997).

En el grupo de los furanos se encontraron el 2-etilfurano, 2-metilfurano y 2-pentilfurano; estos aparecieron mayoritariamente en el licuado tratado por UHT mientras que el tratamiento a 300 MPa, 40°C fue el que mostró el menor valor de área absoluta. Los furanos y sus derivados son comúnmente productos de reacciones de Maillard (Achouri *et al.*, 2007b; Fisher & Scott, 1997). El mecanismo de la formación del 2-pentilfurano se produce mediante un oxígeno monoatómico activado por la riboflavina del licuado de soja; este componente también contribuye al aroma a haba verde o hierba, que probablemente hace que sea inaceptable o desagradable para el consumidor (Min *et al.*, 2005b). Achouri *et al.* (2007b) mencionan que la esterilización (142°C, 4s) de productos formulados con licuado de soja, así como el envasado puede dar lugar al desarrollo adicional de compuestos volátiles, por ejemplo el 2-etil furano y octanal.

El dimetilsulfuro fue el único componente con azufre que se encontró en los licuados de soja; su formación es promovida por los radicales libres en presencia de rivo flavina. El área más pronunciada apareció en el licuado UHT seguido por el PB y el producto tratado a 200 MPa 40°C, mientras que en el de 300MPa 40°C, este componente no se detectó. A este compuesto se le atribuye el olor desagradable a pienso en la leche (Belitz & Grosch, 1997).

También se observó la presencia de triclorometano. Este volátil es un componente tóxico que aparece por la contaminación residual de pesticidas aplicado en el cultivo de la soja (Min *et al.*, 2005b) y presentó mayor área absoluta el licuado de soja tratado por UHT, seguido por el PB y UHPH.

Wolf (1975) menciona que el aroma típico de los productos de la soja no es causado por un número limitado de compuestos, es decir, que un sólo pico del cromatograma no puede abarcar todo el *off-flavor* (Wilkens & Lin, 1970; Wolf, 1975), ya que otros compuestos responsables del mismo incluyen también el hexanol, 2-nonenal, 1-onten-3-

ol, 4-decadienal y dimetilsulfuro (Yuan & Chang, 2005), aunque también depende mucho del umbral de detección de cada compuesto (Fisher & Scott, 1997).

Por otra parte, algunos de ellos quizás queden enmascarados debido a otros compuestos que no poseen olores desagradables; por ejemplo, algunos aldehídos que también son responsables de muchos aromas a fruta, como el benzaldehído que proporciona un aroma a almendras y se asocia con el aroma de las cerezas (Wilkins & Lin, 1970; Fisher & Scott, 1997); el octanol, que tiene un olor evocador a rosas, y la mayoría de las cetonas, que poseen aroma a frutas. Estos compuestos ocupan una muy pequeña porción del total de los compuestos volátiles del licuado de soja; sin embargo, la interacción entre todos ellos, cuando se mezclan entre sí, proporciona el peculiar aroma del licuado de soja (Wilkins & Lin, 1970).

Es posible que la reducción o la ausencia de algunos compuestos volátiles, los cuales sí se encontraron en los licuados de soja tratados por UHT, produjeran menor *off-flavor* en los licuados tratados por UHPH, ya que en estudios preliminares de evaluación sensorial (datos no mostrados), los catadores participantes indicaron que en los licuados de soja tratados por UHPH, principalmente el de 300 MPa 40°C, la percepción del aroma característico a haba fue menor comparado con el tratado por UHT.

Tabla 11. Compuestos volátiles de licuados de soja PB, UHT y UHPH*

Compuestos	Tratamientos			
	PB	UHT	200 MPa 40°C	300 MPa 40°C
Aldehídos				
<i>Acetaldehído</i>	++	+	+++	+++
<i>Propanal</i>	++	ND	+	+
<i>Hexanal</i>	+++	+	++	++
<i>2-heptenal</i>	++	+	+++	++
<i>Heptanal</i>	+	+	+++	++
<i>Pentanal</i>	++	+	++	+++
<i>2,4-hexadienal</i>	+	ND	+++	++
<i>Nonanal</i>	++	+	+++	++
<i>Isovaleraldehído</i>	+++	++	+	++++
<i>2,4-heptadienal</i>	+++	+	++	+
<i>c-2-octenal</i>	++	+	+++	++
<i>t-2-octenal</i>	++	+	+++	++
<i>2-butenal</i>	+++	+	++	++
Alcoholes				
<i>1-penteno-3-ol</i>	+	+	+++	++
<i>t-2-hexenal</i>	+	ND	++	++
<i>1-pentanol</i>	+++	+	+++	++
<i>2-penteno-1-ol</i>	+++	++	++	+
<i>3-metil-1-butanol</i>	++	+++	+	+
<i>2-metil-1-butanol</i>	++	+++	+	+
<i>Heptanol</i>	++	+++	+	+
<i>1-hexanol</i>	+++	++++	++	+
<i>1-octeno-3-ol</i>	+	++++	+++	++
<i>3-octanol</i>	+++	++++	++	+
Cetonas				
<i>2-pentanona</i>	+	+++	+	++
<i>2-3-pentanodiona</i>	+	ND	+++	++
<i>3-octanona</i>	++	+++	+	+
<i>2-heptanona</i>	+++	++++	+	++
<i>2,3-octadienona</i>	++	+	++++	+++
<i>2-octanona</i>	+++	++++	++	+
<i>3-octeno-2-ona</i>	+	ND	++	+++
<i>3,5-octadieno-2-ona</i>	++	+	+++	+++
<i>Propanona (acetona)</i>	ND	+	ND	ND
Hidrocarburos				
<i>Hexano</i>	++	+++	+	+
<i>Pentano</i>	+++	++++	++	+
<i>4-metil-1-hepteno</i>	ND	+	ND	ND
<i>2-metil-1,3 pentadieno</i>	+++	++++	++	+
<i>2,3,4-trimetilpentano</i>	ND	+	ND	ND
<i>2,2,5-trimetilhexano</i>	ND	+	ND	ND

Continúa....

<i>2,3,5-trimetilhexano</i>	ND	+	ND	ND
<i>1-penteno</i>	ND	ND	+	ND
<i>3-metileno-heptano</i>	ND	+	ND	ND
<i>2,2,4-trimetilheptano</i>	ND	+	ND	ND
Compuestos con núcleo aromático				
<i>Benzaldehído</i>	++	+++	++	+
<i>1,3,5-trimetilbenzeno</i>	++	+++	+	++
<i>Metilbenceno (tolueno)</i>	+++	++++	+	++
<i>1,2-dimetilbenceno (o-xileno)</i>	++	+++	+	+
<i>1,4-dimetilbenceno (p-xileno)</i>	+++	++++	+	++
<i>Etilbenceno</i>	++	+++	+	ND
<i>Tiofeno</i>	ND	+	ND	ND
Ésteres				
<i>Acetato de isoamilo</i>	+++	++++	+	++
<i>Acetato de isobutilo</i>	+++	++++	+	++
<i>Acetato de butilo</i>	+++	++++	+	++
<i>Acetato de metilo</i>	++	+	ND	ND
<i>Butirato de etilo</i>	ND	+	ND	ND
Furanos				
<i>2-pentil-furano</i>	+++	++++	++	+
<i>2-metil-furano</i>	+++	++++	++	+
<i>2-etilfurano</i>	+++	++++	++	+
Sulfuros				
<i>Dimetil sulfuro (DMS)</i>	++	+++	+	ND
Cloruros				
<i>Triclorometano (cloroformo)</i>	+++	++++	++	+
Éter				
<i>Éter etílico</i>	+++	+	++++	++
Otros				
<i>(C1-butanol, 2-metil, acetato)</i>	+++	++++	+	++

*Más signos positivos indican mayor valor de área absoluta.

4.1.10. Lipoxigenasa

Para valorar los resultados del análisis de la enzima LOX, se estableció una unidad de actividad como el equivalente a la cantidad de enzima que generó un aumento en la absorbancia de 0,01 unidades por minuto a 234 nm. En el PB se hallaron valores de 10 unidades de esta enzima; y después de aplicar los tratamientos UHT y UHPH esta enzima no fue detectada, indicando con ello que se produjo una total inactivación.

En algunos estudios sobre alta presión hidrostática, se ha observado una completa inactivación de la enzima LOX en licuados de soja cuando son sometidos a presiones de 800 MPa, o en combinaciones con temperatura moderada de 60°C a 600 MPa (Van der Ven *et al.*, 2005); de igual forma, ha sido posible conseguir una inactivación irreversible de la enzima con combinaciones de temperatura entre 5-60°C y presiones entre 250-650 MPa (Wang *et al.*, 2008), observando que la velocidad de inactivación aumenta con el incremento de la presión a temperatura constante. En base a estos resultados, parece evidente que la inactivación de la LOX de los productos tratados por UHPH se debe al efecto combinado de la temperatura y presión durante el tratamiento, ya que los licuados alcanzaron temperaturas de entre 92 y 118°C (Tabla 12), dependiendo de las condiciones UHPH aplicadas. Los resultados demuestran que el tiempo de paso del fluido a través de la válvula de alta presión (~0,7 s) fue suficiente para inactivar la LOX cuando la temperatura fue de 90°C, que fue la menor alcanzada por los licuados en este estudio. La inactivación de la enzima en tan corto tiempo fue favorecida por la presión aplicada, que aceleró la inactivación; pues es sabido que se requieren tratamientos térmicos a temperaturas entre 80-100°C durante 10 min para inactivarla (Kwok & Niranjana, 1995), mientras que, con el tratamiento UHPH a 200 MPa a temperatura de entrada de 40°C y sin aplicación de tiempo de retención se consiguió la total inactivación. Posiblemente, y tal como apuntan otros autores que han estudiado la inactivación de diversas enzimas de la leche tratada por UHPH (Datta *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2005; Pereda *et al.*, 2007; Picart *et al.*, 2006), los fenómenos físicos que intervienen en la UHPH como la alta fuerza de cizalla, cavitación e impacto contribuyan, junto con la temperatura, a la modificación de la estructura nativa de la LOX causando pérdida de actividad enzimática.

Tabla 12. Valores medios (\pm d.e.) de temperaturas de tratamiento UHPH, actividad lipoxigenasa (LOX), sustancias reactivas al TBA (TBARS) y actividad residual de los inhibidores de tripsina (IT) de licuados de soja.

Tratamientos	T ₀ ¹ (°C)	Retención (s)	T ₁ ² (°C)	T ₂ ³ (°C)	LOX (Unidades)	TBARS (mg/L)	IT (%)
PB	–	–	–	–	10	0,41 (0,18) ^b	100
UHT	–	–	–	–	n.d.	0,39 (0,10) ^b	8,76 (2,5) ^c
200 MPa	40 (0,5)	–	92 (0,5)	28,86 (1,6)	n.d.	0,64 (0,21) ^a	78,89 (11,8) ^{ab}
300 MPa	40 (0,6)	–	108 (2,0)	30,20 (1,3)	n.d.	0,60 (0,07) ^a	79,10 (18,5) ^{ab}
200 MPa	50 (0,7)	–	95 (2,5)	29,87 (1,0)	n.d.	0,65 (0,10) ^a	78,23 (10,8) ^{ab}
300 MPa	50 (0,3)	–	109 (3,0)	29,90 (1,5)	n.d.	0,57 (0,09) ^a	74,04 (18,5) ^{ab}
200 MPa	40 (0,5)	15	91 (0,5)	29,40 (1,2)	n.d.	0,62 (0,07) ^a	84,15 (20,8) ^a
300 MPa	40 (0,6)	15	114 (2,0)	30,60 (0,3)	n.d.	0,66 (0,17) ^a	77,48 (24,2) ^{ab}
200 MPa	50 (0,9)	15	95 (0,5)	29,40 (1,0)	n.d.	0,66 (0,05) ^a	82,44 (10,0) ^{ab}
300 MPa	50 (0,7)	15	118 (0,2)	29,90 (1,8)	n.d.	0,56 (0,06) ^a	66,88 (15,2) ^b

¹Temperatura de entrada; ²Temperatura después de la válvula de alta presión; ³Temperatura de salida; n.d.: no detectado. ^{a-c}distintos superíndices en los valores de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En referencia a los productos tratados por UHT, los resultados de este estudio fueron similares a los ya mencionados por otros autores (Kwok & Niranjana, 1995); quienes pusieron de manifiesto que la inactivación de la LOX es dependiente principalmente de la temperatura, y que el tratamiento UHT da lugar a un producto comercialmente estéril con una satisfactoria inactivación de la enzima; sin embargo, el elevado tratamiento térmico puede tener desventajas, como la pérdida de nutrientes, la excesiva desnaturalización de proteínas y consecuentemente, la modificación de sus propiedades funcionales (Robinson *et al.*, 1995), entre ellas, la capacidad emulsionante, de espumado y de formación de geles.

4.1.11. Análisis de sustancias reactivas al TBA (TBARS).

Los lípidos presentes en el licuado de soja contienen ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y linolénico fundamentalmente) susceptibles a la oxidación, que pueden generar como producto de degradación malonaldehído (MDA), cuantificable mediante el ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA). Su principio se basa en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA con una de malonaldehído, en la que se produce un compuesto cromógeno de color rojo cuya concentración se determina por espectrofotometría. Puesto que otras sustancias (alcanos, alquenos y alcadienos) pueden reaccionar con el TBA proporcionando un espectro idéntico al que se forma con el MDA, los resultados del análisis se expresan en ppm de equivalentes de MDA o sustancias reactivas al TBA (TBARS) (Beltran *et al.*, 2003; Grau *et al.*, 2000).

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 12), los licuados de soja tratados por UHPH presentaron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) que los licuados PB y UHT. Por una parte, la actividad de la LOX está directamente relacionada con la oxidación de los lípidos. Sin embargo, en este trabajo, aunque los licuados de soja en sus diferentes tratamientos no mostraron actividad de la LOX excepto en el PB, sí se observó la presencia de TBARS en todos ellos. Según Wilkens *et al.* (1967), la peroxidación lipídica catalizada por la LOX en el licuado de soja, ocurre principalmente durante el proceso de molienda. Esta observación concuerda parcialmente con lo descrito por Wang *et al.* (2001) que señalan que, durante la elaboración del licuado de soja, si el grano es molido después de un blanqueado durante 10 min en ebullición, se

forman muy bajas cantidades de TBARS. Sin embargo, observan que después de la pasteurización (82°C/1 min) de este licuado, el contenido de TBARS aumenta ligeramente, sugiriendo que los lípidos son oxidados lentamente aunque que la LOX haya sido inactivada por el blanqueado, atribuyéndolo a que, durante el tratamiento térmico, la peroxidación lipídica es promovida por otros factores que catalizan su desarrollo, tales como el incremento de la temperatura, dando como resultado, la formación de TBARS.

Por otra parte, durante el tratamiento UHPH, la ruptura y significativa reducción de tamaño de las gotas de grasa, debida a los fenómenos de turbulencia, cizalla y cavitación, junto con el aumento de temperatura, puede hacer más susceptibles a los ácidos grasos a la autooxidación y promover la aparición de hidroperóxidos.

Un estudio sobre la UHPH en leche cruda estandarizada al 3,5% de grasa (Pereda *et al.*, 2008c) en el que se aplicaron presiones de 200 y 300 MPa, permitió observar leves aumentos de MDA, indicando que la reducción de tamaño y la modificación de la membrana de los glóbulos de grasa tuvieron influencia sobre la oxidación lipídica. Por otra parte, Pereda *et al.* (2008a) estudiando la composición de volátiles en particular hexanal, en leche cruda de vaca tratada por UHPH, también indicaron que la mayor exposición de los ácidos grasos y el aumento de temperatura durante el tratamiento pueden promover la formación de hidroperóxidos.

En el caso del licuado de soja, no existen referencias que indiquen los niveles de percepción o máximos permitidos de MDA. Si nos basamos en estudios realizados en otros alimentos, los valores de aceptación son muy diversos, dependiendo de la matriz. Por ejemplo, en salchichas secas fermentadas, jamones secos salados, chorizo y quesos, el índice aceptable de oxidación lipídica es de 0,1-0,3 mg MDA/Kg (Chizzolini *et al.*, 1998); en carnes de cerdo (chuletas de cerdo, hígado, salchichas y bacon) se puede detectar la rancidez a partir de niveles de 0,50 mg MDA/Kg (Sheard *et al.*, 2000); mientras que si nos fijamos en alimentos con una tendencia extrema a la oxidación, como el pescado, éste no debe superar los 4 mg MDA/Kg para poder ser aceptado (Bello & Gil Rivas, 1992). Considerando que el perfil de composición de ácidos grasos del licuado de soja se podría aproximar al del pescado por su alto contenido de ácidos grasos insaturados, los valores obtenidos de equivalentes de MDA en el licuado (0,66

mg/L, el más elevado) parecen bastante reducidos. En principio, cabría esperar que estos niveles fueran aceptables y no perceptibles por el consumidor, ya que en la evaluación sensorial del licuado de soja tratado por UHPH (datos no mostrados), los participantes en el panel de cata no manifestaron la percepción de aromas relacionados con procesos de oxidación, más allá del típico flavor de soja. Incluso, manifestaron que en comparación con el licuado UHT de referencia, los tratados por UHPH resultaron más agradables al paladar, en términos de flavor.

4.1.12. Determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina.

Los inhibidores de tripsina (IT) son polipéptidos que forman complejos estables con la tripsina, obstruyendo sus enlaces y distorsionando sus acciones enzimáticas. La actividad residual de los IT se expresó en porcentaje a partir del valor de actividad obtenido en el PB. La evaluación del efecto de los distintos tratamientos sobre la reducción de la actividad de los IT mostró que los licuados de soja tratados por UHPH se comportaron, en general, de manera muy semejante, no observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos (Tabla 12). Sin embargo, el tratamiento más intenso, 300 MPa, 50°C, 15 s mostró una actividad residual algo inferior al resto de los tratamientos UHPH (66,88%), lo que apuntaría a que el incremento de la intensidad del tratamiento térmico fue el factor que afectó principalmente a la inactivación de los IT y no tanto la acción mecánica de la alta presión. Es sabido que los IT son estables a temperaturas por debajo de los 80°C (Griffiths, 1984) y, además, es difícil eliminar al 100% su actividad residual, debido a que se requiere de tiempos muy prolongados (Kwok *et al.*, 2002). El tratamiento UHT es el proceso mayoritariamente utilizado para lograr una elevada inactivación, consiguiéndose alcanzar un 90-93% de inactivación (Kwok *et al.*, 1995; Kwok *et al.*, 2002), valores que fueron similares a los obtenidos en este estudio.

No existe literatura disponible acerca de la reducción de la actividad de los IT en licuados de soja tratados por UHPH, aunque se ha observado que a altas presiones isostáticas se puede alcanzar un 90% de inactivación de los IT con temperaturas de entre 77 y 90°C, utilizando presiones de entre 750 y 525 MPa, durante un tiempo de menos de 2 minutos. Con presiones de 600 MPa a 60°C, se alcanza una actividad residual del 60-

70%, sin embargo al elevar la presión a 800 MPa, la inactivación no aumenta, por lo que los autores del estudio señalan que la temperatura es un factor determinante para la inactivación de los IT (Van der Ven *et al.*, 2005). Esta referencia, como base, aunque no sea completamente comparable con nuestro estudio, puede servir de orientación para comparar el efecto de una tecnología en la que también se combina el efecto de la alta presión con el de la temperatura. Así, los resultados de inactivación fueron parecidos a los obtenidos en los productos tratados a 300 MPa, 50°C, 15 s, es decir, en el tratamiento en que se mantuvo durante más tiempo una mayor temperatura, gracias a la combinación de temperatura de entrada y la presión aplicada y temperatura retenida durante 15 s. Aumentando la presión o la temperatura de entrada, es posible que se pudiera conseguir un mayor porcentaje de inactivación de los IT, por supuesto, bajo condiciones de retención.

4.1.13. Estimación de digestibilidad de proteína *in vitro*.

Las curvas de digestibilidad *in vitro* de los licuados de soja tratados aparecen en la figura 10. Éstas se obtuvieron mediante la incubación de los licuados de soja a 37°C durante 10 min en presencia de diferentes enzimas digestivas. Todos los productos revelaron un comportamiento semejante frente a la acción de las enzimas utilizadas en el ensayo, manifestando una elevada digestibilidad, a excepción del PB, en el que fue inferior ($p < 0,05$) comparada con la del resto de los licuados. Los productos tratados por UHT y los obtenidos por UHPH a presiones de 300 MPa 50°C, 15 s manifestaron un comportamiento semejante, alcanzando los valores finales de pH más bajos. En general, los licuados tratados a 300 MPa, presentaron valores ligeramente más bajos de pH que los tratados a 200 MPa, lo que indicaría una mayor digestibilidad de los primeros.

Se sabe que uno de los principales efectos del tratamiento UHT en el licuado de soja es la destrucción de los factores antinutricionales con la consiguiente mejora de la digestibilidad de la proteína (Kwok & Niranjana, 1995), situación que también se observó en el licuado tratado por UHT de nuestro estudio, con una baja actividad residual de los IT y, por tanto, una buena actividad de la tripsina, que se traduce en una elevada digestibilidad. Sin embargo, la elevada digestibilidad de los licuados de soja sometidos a UHPH no se correlaciona con la mayor actividad residual de los IT de los

licuados UHT. De hecho, el estudio realizado por Ikeda *et al.* (1995) en habas de soja, demostró que no existe correlación significativa entre la digestibilidad de la proteína estimada *in vitro* y sus niveles de actividad inhibitoria contra la tripsina y α -quimotripsina. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el tratamiento térmico *per se* ya aumenta la digestibilidad, gracias a la desnaturalización y la apertura de la estructura de las moléculas de proteína, que aumenta la accesibilidad de la enzima proteolítica (Kwok & Niranjana, 1995; Liu, 1999). En estudios sobre proteínas de soja tratadas por UHPH, se ha observado que, a diferentes niveles de presión, se produce un desdoblamiento parcial o una total desnaturalización, provocados por el efecto combinado de la alta velocidad de cizalla en la válvula de presión y el aumento de la temperatura (Desrumaux & Marcand, 2002; Flourey *et al.*, 2002a). En el presente trabajo también se observó desnaturalización parcial y total de las proteínas al aplicar presiones de 200 y 300 MPa, respectivamente, lo que explicaría la elevada digestibilidad de los licuados UHPH a pesar de la actividad residual de los IT.

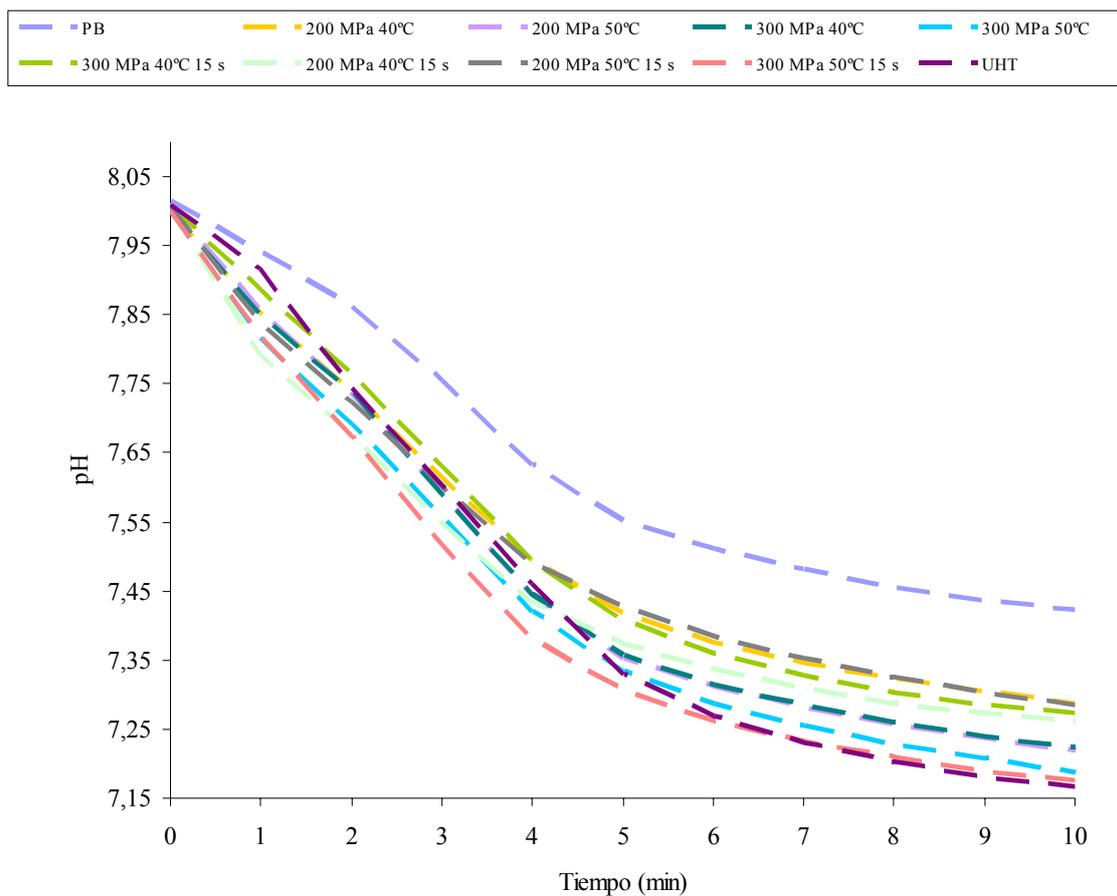


Figura 10. Curvas de digestibilidad *in vitro* (variación de pH vs tiempo) de licuados de soja PB, UHT y UHPH.

4.2. Estudio de la coagulación.

4.2.1. Evolución del pH y de la acidez durante la fermentación.

La fermentación del licuado de soja por parte de las bacterias ácido lácticas es efectiva para reducir el flavor típico de la soja y se han utilizado diferentes microorganismos y métodos para obtener un buen producto gelificado de características semejantes al yogur (Cheng *et al.*, 1990; Chou & Hou, 2000; Karleskind *et al.*, 1991). La principal función de las bacterias ácido lácticas en el licuado de soja es la de producir acidificación gracias a la producción de ácido láctico a partir de los glúcidos. Durante la fermentación, también se produce hidrólisis de las proteínas por parte de los lactobacilos, lo que favorece el crecimiento de los estreptococos. (Garro *et al.*, 1998; Fávoro Trindade *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Omogbai *et al.*, 2005; Donkor *et al.*, 2007a). Por lo tanto, los parámetros que describen el proceso fermentativo son fundamentalmente la acidez valorable y el pH, que proporcionarán una descripción del proceso de fermentación a lo largo del tiempo hasta alcanzar pH 4,6.

Esta evolución se presenta en forma de curvas en la figura 11, donde se puede observar que el producto AC (licuado tratado en autoclave a 121°C 15 min) fue el que presentó un desarrollo más marcado de la acidez y descenso del pH, en contraste con los licuados de soja tratados por UHT y UHPH. Después de aproximadamente 5 h de fermentación, los productos AC y UHT alcanzaron pH 4,6, presentando valores de acidez de 0,59 y 0,50%, respectivamente, mientras que los productos tratados por UHPH alcanzaron este valor de pH 2 h después, mostrando entre 0,44-0,51% de acidez. El intenso tratamiento térmico (121°C 15 min) en el producto AC y, en menor grado, en el UHT contribuyeron al desarrollo rápido de la acidez, debido a que el tratamiento por autoclave reduce la presencia de oligosacáridos (estaquiosa y rafinosa) presentes en la soja, causando su hidrólisis parcial (Jood *et al.*, 1985) y, a la vez, una mayor desnaturalización proteica, facilitando el desdoblamiento y disociación de las globulinas que dan lugar a subunidades más pequeñas de las mismas (Kwok *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 1991). Por ello, es posible que se obtuvieran glúcidos y péptidos más pequeños, que al estar más disponibles para los cultivos iniciadores, produjeran un desarrollo más rápido de la acidez. Sin embargo, en los productos tratados por UHPH las condiciones de tratamiento térmico fueron mucho más suaves (Tabla 13), siendo el tratamiento a 300

MPa con 50°C el que alcanzó la máxima temperatura, alrededor de 109°C, a su paso por la válvula de alta presión. Además, el tiempo de residencia que alcanzaron todos los productos tratados por UHPH después del paso de la válvula de alta presión, fue de alrededor de 0,07 s, un tiempo muy inferior al de los tratamientos AC y UHT. Por lo tanto, los cultivos iniciadores requirieron de más tiempo para hidrolizar los oligosacáridos presentes en los licuados de soja tratados por UHPH.

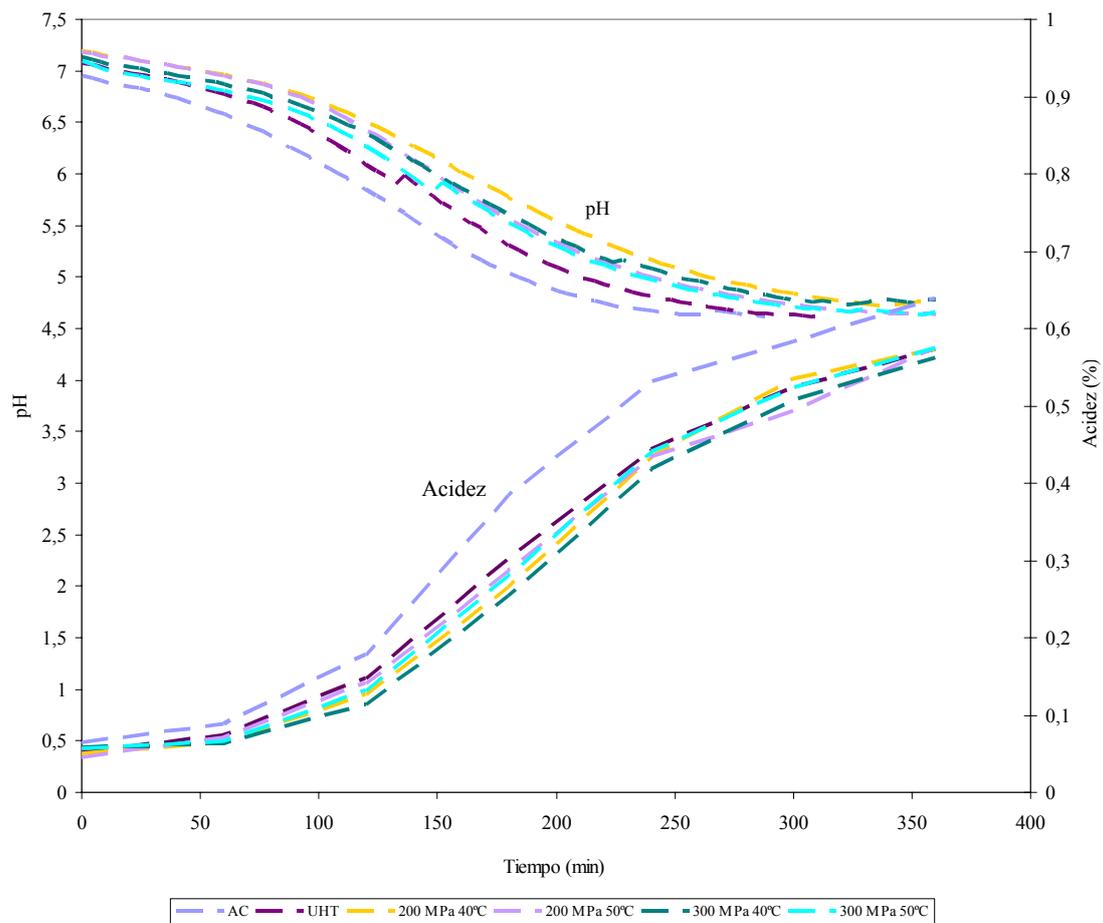


Figura 11. Curvas de acidez y pH durante la fermentación de licuados de soja AC, UHT y UHPH

Tabla 13. Valores medios (\pm d.e.) de temperatura de los licuados de soja tratados por UHPH.

Tratamientos	T ₀ (°C) ^a	T ₁ (°C) ^b	T ₂ (°C) ^c
200 MPa	40 (0,5)	89 (0,5)	26,86 (1,6)
200 MPa	50 (0,7)	95 (2,5)	29,87 (1,0)
300 MPa	40 (0,6)	108 (2,0)	28,20 (1,3)
300 MPa	50 (0,7)	109 (3,0)	30,60 (0,5)

^a Temperatura de entrada del producto en el equipo UHPH, ^b Temperatura del licuado a la salida de la válvula UHPH, ^c Temperatura de salida de licuado tratado por UHPH.

4.2.2. Propiedades de coagulación.

Para conocer el comportamiento de la coagulación de los licuados de soja se utilizó un coagulómetro (Optigraph[®]). Este equipo se basa en la atenuación de la señal NIR emitida de forma continua durante la coagulación a su paso a través de la muestra. Los parámetros de coagulación se calcularon a partir de las curvas (Figura 12) obtenidas con el coagulómetro, siendo los siguientes: inicio de coagulación (TC), que se obtiene por el valor máximo de la primera derivada; velocidad o tasa de agregación (TA) que fue determinada por la pendiente de la región lineal de la curva; y densidad del entramado o red del gel, que vino dada por la diferencia del valor de la señal de voltaje final (S₁) y el voltaje inicial (S₀) en el comienzo de la coagulación. Los valores obtenidos aparecen en la tabla 14.

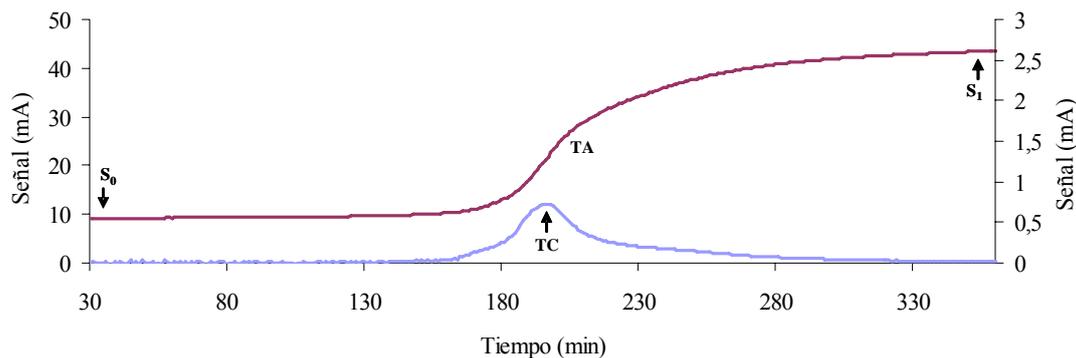


Figura 12. Representación general de curvas de coagulación expresadas como señal de atenuación en función del tiempo.

De manera general, el comportamiento de los productos AC, UHT y UHPH en cuanto a las propiedades de coagulación, fue significativamente diferente ($p < 0,05$). El tiempo de coagulación del licuado AC se detectó alrededor de tres horas después del inicio de la incubación, teniendo en ese momento un pH de 4,99; mientras que los licuados de soja obtenidos por UHT y UHPH presentaron menores tiempos de coagulación y cifras significativamente mayores de pH. En cuanto al parámetro de velocidad de agregación, se observó que los valores de los licuados tratados por UHPH fueron menores en comparación con los licuados tratados por AC y por UHT. Esta misma tendencia se manifestó para el índice de densidad del gel al finalizar la gelificación. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tratamientos UHPH aplicados.

Para que comience el proceso de gelificación, es necesario que se produzca desnaturalización y desdoblamiento de la proteína, como pasos previos a la agregación y desarrollo de la red proteica (Boutin *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2005). Algunos principios básicos pueden explicar el comportamiento observado sobre las propiedades de coagulación en los tratamientos aplicados; por un lado, el calentamiento del licuado de soja provoca la desnaturalización, seguida de agregación y polimerización de las proteínas, en las que la reacción de intercambio sulfidrilo-disulfuro juegan un importante papel (Saio, 1979); por otro lado, dado que la proteína desnaturalizada por el calor posee un exceso de carga negativa (Kohyama & Nishinari, 1993), los hidrogeniones procedentes de la fermentación ácida neutralizan la carga neta de la

proteína, promoviendo el desarrollo del gel, mediado mayoritariamente por interacciones hidrofóbicas y dando lugar a agregados proteicos de manera desordenada.

Según un estudio realizado sobre la aplicación de la UHPH en relación con las propiedades de coagulación ácida a partir de leches desnatadas, la velocidad de agregación de las leches tratadas por UHPH mostró valores superiores respecto a la leche desnatada control, y valores semejantes en el tiempo de coagulación e índice densidad del gel (Serra *et al.*, 2008a). Los autores señalaron que el comportamiento de las propiedades de gelificación depende principalmente del número potencial de interacciones proteína-proteína durante la formación del gel y, que al mismo tiempo, estas interacciones podrían depender de los cambios en las partículas y las moléculas dispersas, inducidos por el tratamiento aplicado al producto antes de la elaboración del yogur.

Considerando esto, es posible que antes de iniciarse la coagulación, el licuado de soja AC ya contara con la presencia de agregados, ya que las altas temperaturas inducen la disociación, desnaturalización y, subsecuentemente, la agregación de las proteínas de la soja (Sorgentini *et al.*, 1995), presentando así una elevada carga negativa que favorece la repulsión entre proteínas y, por tanto, haciendo más lento el proceso de gelificación. Únicamente cuando una cantidad suficiente de protones procedentes de la fermentación neutralizan el exceso de carga negativa comienza el desarrollo de la red proteica mediante interacciones hidrofóbicas. Por el contrario, en los licuados de soja tratados por UHPH y en un grado menor, los tratados por UHT, la superficie activa para la formación del gel fue considerablemente más alta. Esto es debido a que cada pequeña gota de grasa generada en el proceso de homogeneización presentó un buen recubrimiento proteico, con lo que actuaron, a efectos prácticos, como si se tratara de partículas proteicas, a las que hubo que sumar además las proteínas dispersas en la fase continua. Por otra parte, el grado de desnaturalización de los licuados UHPH y UHT fue más bajo que el de los AC, por lo cual la carga negativa se encontró disminuida en los primeros, lo que permitió que con una menor concentración de hidrogeniones, se produjera la formación de los geles y se iniciara con anterioridad a los licuados AC.

Tabla 14. Parámetros de coagulación y valores de pH y acidez titulable (%) al tiempo de coagulación (TC) de licuados de soja tratados por AC, UHT y UHPH (promedio \pm d.e).

Tratamientos	Propiedades de coagulación			pH a TC	Acidez a TC (% ácido láctico)
	TC (min)	Tasa de agregación (mA min ⁻¹)	Red de Gel Índice de densidad (mA)		
AC	183,26 ^a (0,34)	1,25 ^a (0,30)	46,07 ^a (4,31)	4,99 ^d (0,17)	0,41 ^a (0,03)
UHT	170,26 ^{abc} (0,31)	0,80 ^b (0,09)	44,56 ^a (3,03)	5,40 ^c (0,09)	0,29 ^b (0,01)
200 MPa 40°C ¹	160,35 ^{bcd} (0,21)	0,55 ^c (0,13)	31,85 ^b (4,16)	6,00 ^a (0,35)	0,24 ^c (0,02)
300 MPa 40°C ¹	175,03 ^{ab} (0,31)	0,57 ^c (0,12)	30,84 ^b (5,36)	5,65 ^{bc} (0,33)	0,24 ^c (0,01)
200 MPa 50°C ¹	153,79 ^{cd} (0,10)	0,57 ^c (0,12)	32,67 ^b (5,08)	5,94 ^{ab} (0,20)	0,26 ^{bc} (0,02)
300 MPa 50°C ¹	153,24 ^d (0,13)	0,50 ^c (0,09)	27,69 ^b (2,94)	5,92 ^{ab} (0,20)	0,26 ^{bc} (0,02)

^{a-d} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$), ¹ Temperatura de entrada en los tratamientos UHPH.

En relación a la tasa de agregación, los licuados AC y UHT presentaron valores mayores que los UHPH. Esto podría ser debido principalmente a que en los primeros, que presentaron mayor desnaturalización proteica, hubiera una mayor tendencia a la interacción de tipo hidrofóbico, aunque pudieron intervenir también otras fuerzas diferentes (Van der Waals, electrostáticas) actuando sobre el rápido desarrollo del gel (Kulmyrzaev *et al.*, 2000); asimismo, la temperatura de incubación (45°C) que se aplicó también pudo contribuir a la velocidad de agregación, y al mismo tiempo, a la estabilización de las fuerzas, especialmente las hidrofóbicas que se ven favorecidas a las temperaturas utilizadas durante la fermentación. Por el contrario, los menores valores de velocidad de agregación encontrados en los geles de los productos tratados por UHPH, se podrían atribuir a una alta contribución de puentes de hidrógeno para formar el gel, ya que en estos la desnaturalización proteica fue menor. De este modo, la temperatura de incubación no favoreció la formación de este tipo de interacciones, que como es sabido, requiere temperaturas bajas para su estabilización. Estos geles además, mostraron un índice de densidad del gel más bajos comparados con los licuados obtenidos por AC y por UHT. A pesar de esto, cuando los geles fermentados alcanzaron pH 4,6 y se almacenaron en la cámara de refrigeración a 4°C durante 24 horas, las interacciones puente de hidrógeno, estabilizadas en estas condiciones, proporcionaron geles fuertes comparados con los geles de los productos AC y UHT, detalle que se comentará más adelante.

4.2.3. Determinación de microestructura.

Mediante microscopía confocal se obtuvieron imágenes de la estructura de los geles de los yogures de soja tras 24 horas en refrigeración. En la figura 13 se puede ver la tinción diferencial de los glóbulos de grasa frente al fondo verde que constituyó la red proteica. En los yogures de soja provenientes del licuado AC, se pudieron distinguir muchos glóbulos grasos de diversos diámetros distribuidos heterogéneamente, mientras que en los UHT, se observaron glóbulos grasos de menor diámetro, y a la vez, huecos de diferentes tamaños y con formas irregulares, dispersos en la matriz proteica. Por otro lado, en los yogures de soja obtenidos a partir del producto tratado por UHPH, se aprecian escasos glóbulos de grasa de diversos diámetros, y existe una predominancia de superficie proteica en la que se ocultan pequeñas microgotas retenidas en la red. A la

vez, se pudo observar algunos glóbulos grasos aislados y/o unidos de gran tamaño, posiblemente, resultado de la coalescencia de dos o más gotas de grasa.

Los huecos que se aprecian en el yogur de soja elaborado con el licuado tratado por UHT, están constituidos por agua atrapada entre la red proteica. Al parecer, el gran tamaño de los glóbulos grasos de los yogures de soja AC no permitió que quedaran estos huecos ya que, posiblemente sirvieron de relleno de los mismos proporcionando por tanto, una matriz más compacta que la observada en el producto UHT. En los yogures de soja elaborados con el producto tratado por UHPH, la agregación de las proteínas y los glóbulos de grasa dio lugar a una matriz más homogénea y compacta.

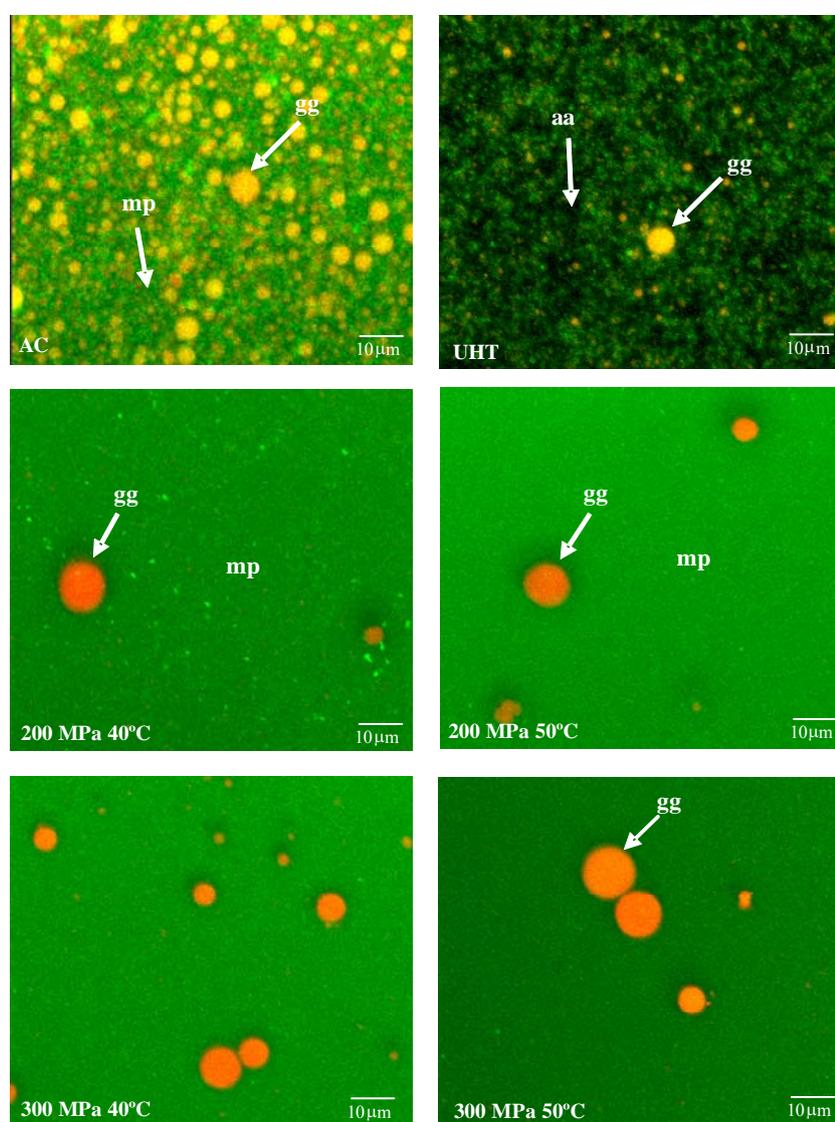


Figura 13. Microestructuras de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH. Las diferentes estructuras marcadas corresponden a la matriz proteica (mp), glóbulo graso (gg) y agua atrapada (aa.).

4.2.4. Determinación de textura.

La textura juega un papel importante en la aceptación global del alimento, y se puede evaluar por métodos sensoriales o instrumentales. En este estudio, se realizó el análisis de la textura mediante un ensayo de punción en los yogures de soja, los cuales se analizaron inmediatamente después de sacarlos de la cámara de refrigeración. En esta parte del estudio, se pretendió conocer como afectaba el tratamiento aplicado al licuado de soja posteriormente al estudio de la coagulación, ya que ésta se produce en incubación a 45°C, unas condiciones muy distintas de temperatura a las que el producto es consumido tras la estabilización del gel en refrigeración. Por ello, los geles obtenidos fueron almacenados en refrigeración durante 24 h antes de realizar la evaluación de la textura. En la figura 14 aparecen las curvas fuerza-distancia, que muestran el comportamiento mecánico a la rotura macroscópica cuando se aplica una fuerza de punción con un sensor cilíndrico sobre la superficie de los yogures. Los resultados obtenidos mostraron que los geles elaborados con el producto UHT, seguidos por los AC, presentaron muy baja capacidad de deformación y una escasa fuerza del gel, es decir, mostraron una gran debilidad de la estructura interna. Sin embargo, los tratados por UHPH presentaron unas excelentes propiedades de textura, con una deformabilidad marcada y elevada fuerza del gel, yendo estas propiedades en aumento con el incremento de la presión aplicada.

Las diferencias de textura entre los yogures obtenidos a partir del licuado de soja tratado por UHPH y UHT, coinciden con las imágenes de microestructura mostradas anteriormente, en donde los primeros presentaron una red extremadamente homogénea, con las pequeñas gotas de grasa integradas en la matriz proteica, lo que hizo posible la deformación de la red pero, al mismo tiempo, permitió experimentar una alta fuerza del gel. Sin embargo, en los yogures UHT, el agua atrapada en la matriz proteica contribuyó en gran parte a la debilidad del gel, ya que la presencia de grandes espacios con agua en el seno de la red fue posiblemente responsable de la escasa resistencia a la penetración de la sonda en el gel. A pesar de que el yogur de soja del producto tratado por AC también mostrara una matriz proteica compacta a causa de las interacciones hidrofóbicas, los grandes glóbulos de grasa presentes en la estructura posiblemente participaron obstaculizando la continuidad de la red proteica responsable en gran medida de las características de firmeza y por lo tanto, pudieron influir

considerablemente en la deformación, dando un gel más firme que el UHT pero débil en definitiva; además, retomando los resultados de la tasa de agregación relativamente alta observada durante el estudio de las propiedades de coagulación, es posible que en este tipo de sogue se desarrollara la formación de grandes agregados, dando lugar a una estructura proteica más grosera y desordenada que la obtenida en los sogures UHPH.

Por otro lado, los yogures de soja UHPH a 300 MPa, a ambas temperaturas de entrada, presentaron mayor firmeza y deformabilidad que los de 200 MPa. Cabe resaltar que en el estudio del licuado de soja, al aplicar presiones de 300 MPa, se presentaron microgotas de grasa dentro de agregados de proteínas; es posible, que al estar íntimamente ligados, este fenómeno de agregación proporcionara un elevado número de interacciones, generando así la extrema homogeneidad de la matriz proteica y alta fuerza del gel. En un estudio análogo realizado en yogur obtenido a partir de leche tratada por UHPH, Serra *et al.* (2007) observaron un comportamiento similar; los autores indicaron que los agregados de proteína-grasa que se formaron en la leche al aplicar la presión a 300 MPa, pudieron actuar como puntos de unión proporcionando fortaleza a la red, dado que estos se hallaron integrados en ella con un alto grado de interacción. Además, es sabido que las temperaturas bajas propician la dureza de la grasa, por lo tanto, al refrigerar los yogures de soja a 4°C, los pequeños glóbulos grasos que se encontraban distribuidos homogéneamente en la matriz proteica, estaban en un estado altamente sólido, contribuyendo a las mencionadas características de textura.

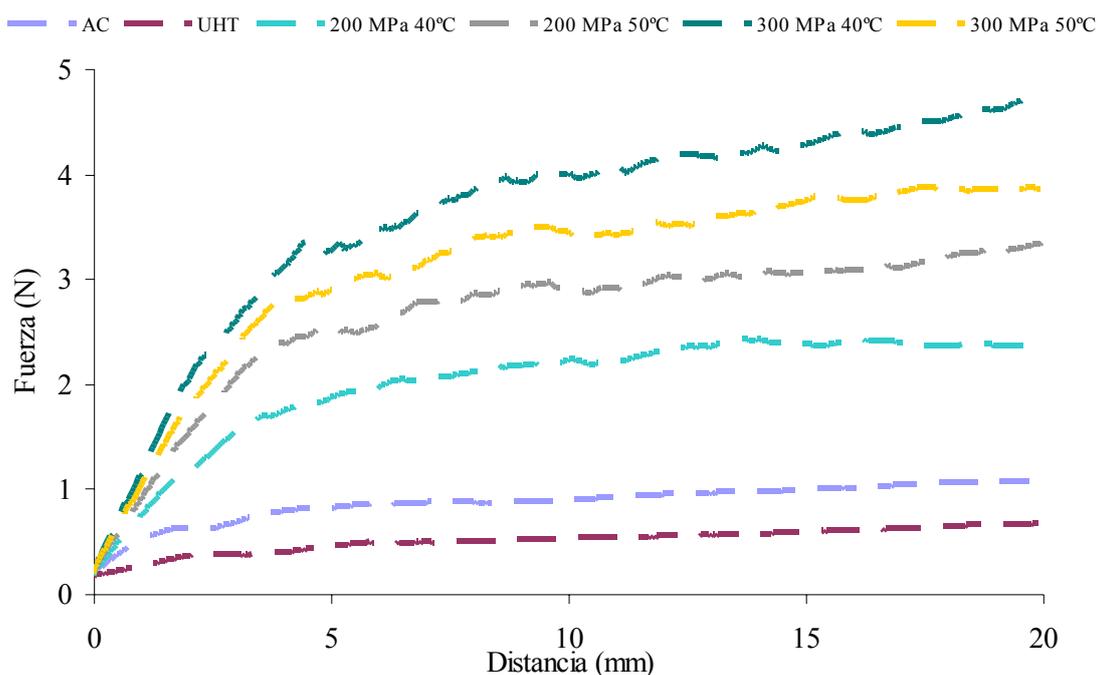


Figura 14. Curvas de fuerza-distancia de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH, después de 24 horas de almacenamiento en refrigeración a 4°C.

La firmeza de los geles vino dada por la fuerza máxima alcanzada en las curvas fuerza-distancia, y permitió valorar la magnitud de las diferencias entre los yogures. En la figura 15 se muestra que todos los yogures de soja elaborados con el licuado en sus distintos tratamientos se comportaron de forma diferente, y se corrobora con la tendencia a la deformación en las curvas de fuerza-distancia mostradas anteriormente. En los yogures obtenidos a partir del producto tratado por UHPH, se observa una tendencia al aumento de la firmeza del gel en proporción directa con el aumento de la presión-temperatura aplicadas, a excepción del tratamiento más severo de UHPH (300 MPa 50°C), en el que esta tendencia se interrumpe. En este caso, hubo un mayor grado de desnaturalización de las proteínas que en el tratamiento 300 MPa, 40°C y, por lo tanto, tuvo lugar mayor grado de interacciones hidrofóbicas durante la coagulación, que influyó en la consolidación de la red gelificada. Sin embargo, como se mencionó en el apartado de coagulación, la mayor proporción de puentes de hidrógeno en los yogures UHPH, jugó un papel importante en la estabilidad y fortaleza de la red del gel una vez formada ya que, durante el enfriamiento, los contactos hidrofóbicos llegan a ser más

débiles y los puentes de hidrógeno más fuertes progresivamente (Bryant & McClements, 1998; Haque *et al.*, 2001)

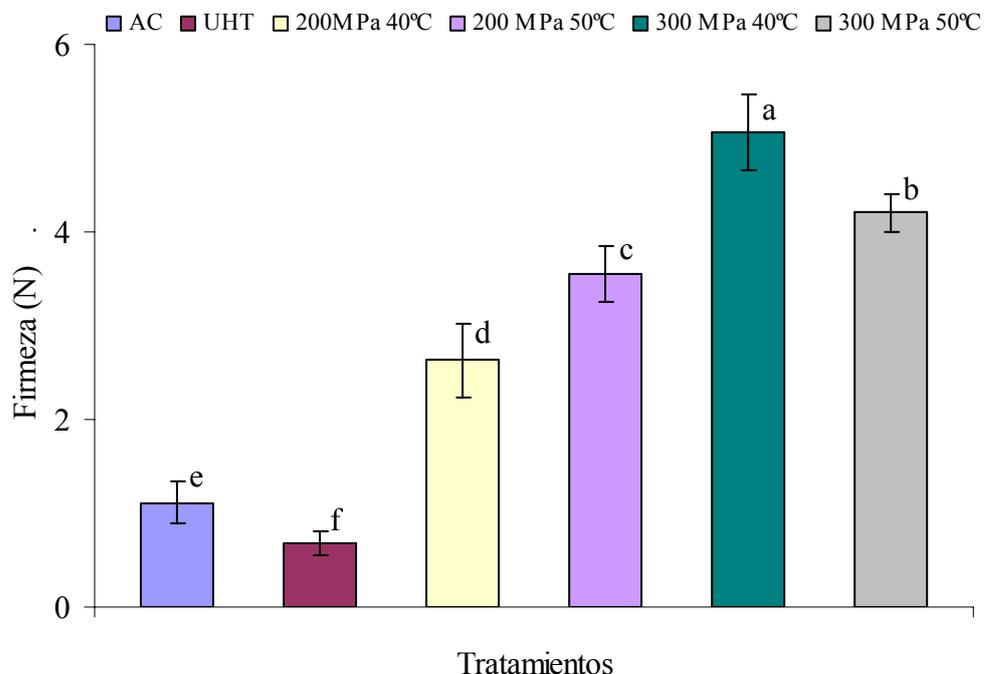


Figura 15. Firmeza de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH, analizada 24 horas después del almacenamiento en refrigeración. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

4.2.5. Capacidad de retención de agua.

Un parámetro de calidad importante del yogur es la capacidad de retención de agua (CRA), ya que está relacionado con la sinéresis o expulsión de la fase acuosa por retracción del gel durante el enfriamiento, fenómeno indeseable en este tipo de productos. La sinéresis es un reflejo de inestabilidad intrínseco de los geles y puede producirse después de un periodo largo de almacenamiento, a consecuencia de la difusión pasiva (Sanderson, 1990). La CRA fue valorada como el % de agua retenida después de la centrifugación de los yogures de soja y se presenta en la figura 16. Se aprecia que todos los yogures de soja presentaron una sinéresis baja, con un intervalo entre 2 y 7% de suero expulsado, salvo en el yogur elaborado con el licuado de soja

tratado por UHT, que presentó porcentajes mayores, de entre 13 y 19% de suero expulsado. A modo orientativo, los valores proporcionados por la bibliografía en referencia a la CRA de yogures de soja, muestran valores de entre 4 y 16% de suero expulsado en yogures de soja elaborados con licuado tratado a 95°C, 15 minutos (Kovalenko & Briggs, 2002). Por otra parte, Yazici *et al.* (1997) encontraron cantidades de suero expulsado de 9,75 a 13,5% en yogures preparados con licuado de soja tratado con temperaturas de entre 85-90°C, 15 min y que fue pasteurizado posteriormente a 65°C durante 30 min.

Kovalenko & Briggs (2002) mencionan que los geles de proteína de soja con elevado número de cadenas (o estructuras más desarrolladas), tienen más habilidad para atrapar el agua dentro de su red tridimensional; también indicaron que el tratamiento térmico provoca mayor grado de desplegamiento y uniones disulfuro, lo que facilita la interacción para producir una red fina con espacios pequeños, en la que se encuentra el agua atrapada. Es probable que en los yogures de soja AC se produjera una situación parecida, con un alto número de interacciones por el mayor grado de desnaturalización de la proteína. En relación a los yogures de soja elaborados con el licuado tratado por UHT, que mostraron una red débil, seguramente el agua atrapada más débilmente en el gel fue expulsada con más facilidad, pues los yogures que presentan un gel débil, son más sensibles a la sinéresis por el potencial aumento de reorganizaciones de la red (Lee & Lucey, 2003).

Respecto a los yogures UHPH, Serra *et al.* (2007) observaron que la aplicación previa del tratamiento UHPH a la leche, dio lugar a yogures que tienden a retener más agua en contraste con los yogures elaborados con leche homogenizada y pasteurizada convencionalmente (90°C, 90s) y con leche fortificada con un 3% de leche en polvo desnatada. En este sentido, el tratamiento UHPH produjo, en comparación con los tratamientos térmicos convencionales una desnaturalización moderada que junto a la elevada reducción de tamaño de partículas, permitieron la formación de una fina red homogénea con alta capacidad de retención de agua.

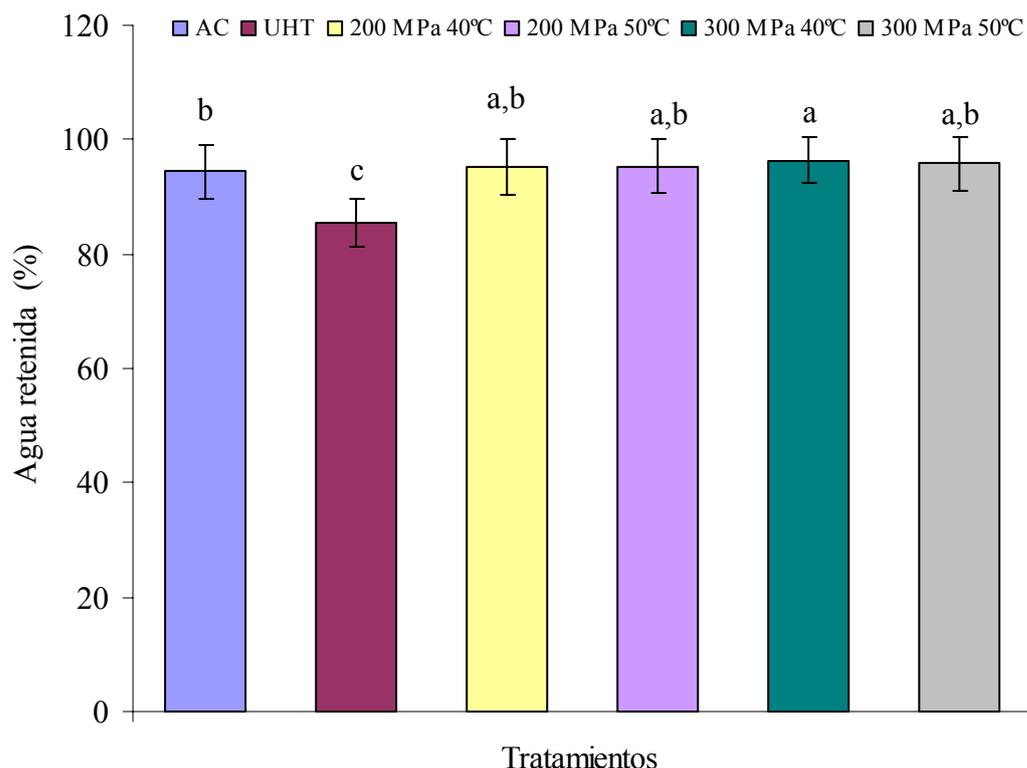


Figura 16. Porcentaje de agua retenida de yogures de soja elaborados con licuados AC, UHT y UHPH, tras 24 h de almacenamiento en refrigeración. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

4.2.6. Evaluación sensorial del yogur de soja

La evaluación sensorial es la identificación, análisis e interpretación de las propiedades (atributos) de un producto que se perciben a través de los sentidos (Fisher & Scott, 1997). Con el fin de conocer posibles diferencias y aprobación de los yogures de soja elaborados con licuados tratados por UHPH, se llevó a cabo una prueba de aceptación. Se presentaron a los catadores 3 yogures de soja, de los cuales uno fue elaborado con licuado tratado por UHT y los otros dos con licuados UHPH, a presiones de 200 y 300 MPa a una temperatura de entrada de 40°C. Intervinieron 35 catadores, los cuales indicaron el grado de preferencia en una escala de 5 intervalos. El análisis de frecuencias mostró que el 38,57% de los catadores prefirieron el yogur de soja tratado por UHPH a 200 MPa; el 37,14 %, el de 300 MPa; y el 24,29%, el UHT (Figura 17). Aparentemente, los participantes prefirieron el yogur de soja tratado por UHPH a 200

MPa. Sin embargo el análisis estadístico indicó que los niveles de preferencia entre los tratamientos UHPH no fueron diferentes significativamente, mientras que el yogur de soja elaborado con el licuado UHT fue significativamente distinto ($p < 0,05$) siendo, por lo tanto, el de menor preferencia.

Cabe mencionar que casi el 50% de los catadores respondieron que no estaban familiarizados con el licuado de soja y sólo el 36% de ellos respondieron que les agradaba este producto. Asimismo, estos catadores proporcionaron información general, en donde mencionaron que los yogures de soja elaborados con el producto tratado por UHPH presentaron una agradable textura, mayor firmeza, mayor acidez y eran más amarillos; así como una menor intensidad en astringencia, sabor y olor a soja.

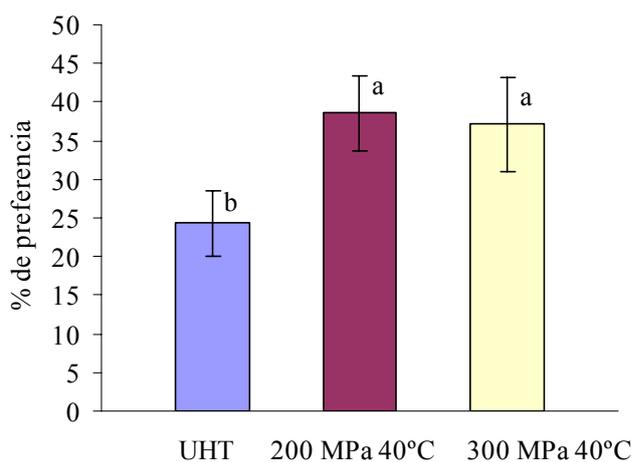


Figura 17. Porcentaje de preferencia de yogures de soja elaborados con licuados de soja UHT y UHPH. ^{a-b}Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

4.3. Estudio de almacenamiento del yogur de soja.

4.3.1. Composición química.

Los valores promedios de composición de los yogures de soja correspondientes al día 1 de almacenamiento fueron: $4,11\% \pm 0,33$ de proteína; $0,98\% \pm 0,15$ de grasa; $2,31\% \pm 0,60$ de glúcidos; $0,44\% \pm 0,10$ de cenizas y $7,83\% \pm 0,40$ de extracto seco. Estudios realizados por Fávaro Trindade *et al.* (2001) mostraron resultados similares en sogures elaborados con licuado de soja homogenizado a 17 MPa y fermentado en las mismas condiciones, obteniendo un contenido en grasa ligeramente y un menor contenido de glúcidos.

4.3.2. Evolución de pH y acidez del yogur de soja durante el almacenamiento.

Uno de los principales problemas de calidad del yogur es que durante el periodo de distribución y venta, el producto puede desarrollar una acidez excesiva, por lo que se estudió la evolución de los parámetros de pH y acidez a lo largo de su vida útil. Los resultados se presentan en la tabla 15. El intervalo de pH durante la evolución de los yogures a lo largo del almacenamiento se situó entre 4,62-4,67, el día 1, y 4,58-4,61, el día 28. No se encontraron diferencias entre los distintos tipos de yogur de soja a lo largo del almacenamiento, excepto en el de licuado tratado a 200 MPa, 50°C, que mostró un pH ligeramente superior un día después de la elaboración, aunque no llegó a traducirse en diferencias en la acidez. A los 28 días, todos los sogures, excepto el de licuado tratado a 300 MPa 50°C, mostraron una muy ligera disminución de pH pues, aunque significativa, no superó las 0,06 unidades y sólo en los sogures de licuado tratado a 200 MPa 50°C se tradujo en un aumento de la acidez.

En general, los distintos tratamientos no causaron diferencias de acidez entre muestras, hallándose ésta entre 0,42-0,44%, el primer día y entre 0,44-0,47 % el día 28. Sí se observó un ligero aumento de la acidez a lo largo del almacenamiento en los yogures de licuados de soja tratados a 200 MPa 50°C y 300 MPa 50°C. La post-acidificación es un fenómeno causado por la actividad metabólica de *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, a temperatura de refrigeración, sobre los azúcares residuales (Zourari *et al.*, 1992;

Weinbrenner *et al.*, 1997), y puede dar lugar a una disminución del pH hasta valores de 3,5. Estos valores en ningún caso se alcanzaron en nuestro estudio, ya que el pH nunca fue inferior a 4,58, y estos son más aceptable para su consumo. En este sentido, Weinbrenner *et al.* (1997) señalan que los yogures con pH 4,2 - 4,3, son todavía de alta calidad para consumirse, manteniendo una elevada viscosidad, sabor y aroma apropiados.

Tabla 15. Evolución de pH y acidez titulable (%) de yogur de soja elaborado con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH.

Tratamientos	Días de almacenamiento a 4°C									
	1		7		14		21		28	
	pH	AT	pH	AT	pH	AT	pH	AT	pH	AT
95°C 15 min	4,62 ± 0,06 ^{bx}	0,44 ± 0,01 ^{ax}	4,61 ± 0,06 ^{axy}	0,48 ± 0,03 ^{ax}	4,60 ± 0,09 ^{axy}	0,47 ± 0,05 ^{ax}	4,59 ± 0,06 ^{axy}	0,47 ± 0,05 ^{ax}	4,58 ± 0,04 ^{ay}	0,47 ± 0,04 ^{ax}
200 MPa 50°C	4,67 ± 0,01 ^{ax}	0,42 ± 0,01 ^{ay}	4,65 ± 0,01 ^{ay}	0,45 ± 0,05 ^{abx}	4,63 ± 0,03 ^{ayz}	0,44 ± 0,04 ^{axy}	4,61 ± 0,02 ^{az}	0,47 ± 0,05 ^{ax}	4,61 ± 0,02 ^{az}	0,47 ± 0,04 ^{ax}
300 MPa 50°C	4,64 ± 0,03 ^{abx}	0,42 ± 0,02 ^{ay}	4,62 ± 0,05 ^{ax}	0,45 ± 0,04 ^{abxy}	4,62 ± 0,05 ^{ax}	0,45 ± 0,04 ^{axy}	4,60 ± 0,02 ^{ax}	0,47 ± 0,04 ^{ax}	4,61 ± 0,02 ^{ax}	0,47 ± 0,04 ^{ax}
300 MPa 50°C, 15 s	4,63 ± 0,07 ^{bx}	0,42 ± 0,01 ^{ax}	4,62 ± 0,09 ^{ax}	0,43 ± 0,02 ^{bx}	4,61 ± 0,09 ^{ax}	0,44 ± 0,03 ^{ax}	4,58 ± 0,09 ^{ay}	0,43 ± 0,04 ^{ax}	4,60 ± 0,06 ^{ax}	0,44 ± 0,03 ^{ax}

^{a-b}Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos de un mismo día ($p < 0,05$).; ^{x-z} distintos superíndices en la misma línea indican diferencias significativa en un mismo tratamiento a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$).

4.3.3. Comportamiento de los microorganismos durante el almacenamiento.

Antes de elaborar los yogures de soja, se realizó el análisis microbiológico del licuado PB, para el que se obtuvieron valores de recuento total de $4,90 \pm 0,36$ log UFC/ml y $1,93 \pm 0,80$ log UFC/ml de enterobacterias. Después de aplicar los tratamientos de ésta etapa del estudio, los resultados de recuento total fueron de: $1,50 \pm 0,40$; $1,97 \pm 0,15$; $1,66 \pm 0,60$ y $1,70 \pm 0,10$ log UFC/ml, correspondientes a los tratamientos de 95°C, 15 min; 200 MPa 50°C; 300 MPa 50°C y 300 MPa 50°C, 15 s, respectivamente, alcanzándose reducciones cercanas o ligeramente superiores a las 3 unidades logarítmicas. En ninguno de los licuados tratados se detectó la presencia de enterobacterias.

En los yogures de soja del día 1 no hubo diferencias significativas entre los recuentos alcanzados en las distintas muestras para cada especie, aunque se constató que *S. thermophilus* alcanzó un recuento superior al de *L. bulgaricus* (Figura 18). Este comportamiento tiene sentido, ya que, en la mezcla comercial de los cultivos iniciadores la proporción del *S. thermophilus* es ligeramente mayor, con el fin de prevenir la producción excesiva de acidez en el yogurt (Weinbrenner *et al.*, 1997). Como está ampliamente descrito, la interacción de los cultivos iniciadores en el yogur es compleja, describiéndose su comportamiento como simbiótico, ya que se favorecen mutuamente. El crecimiento de *S. thermophilus* se beneficia de los aminoácidos y péptidos de las proteínas hidrolizadas por *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, y el crecimiento de éste es estimulado a la vez por el ácido fórmico y CO₂, entre otros compuestos, producidos por *S. thermophilus*. Algunos autores han observado que *S. thermophilus* crece mejor en el licuado de soja que el *L. bulgaricus* (Farnworth *et al.*, 2007; Karleskind *et al.*, 1991), como sucede en nuestro estudio, aunque en nuestro caso el crecimiento fue suficiente para obtener un pH de 4,6 en un tiempo de 5 h, muy inferior al descrito por Farnworth *et al.* (2007) que requirió hasta 10 h de incubación para alcanzar pH 4,6.

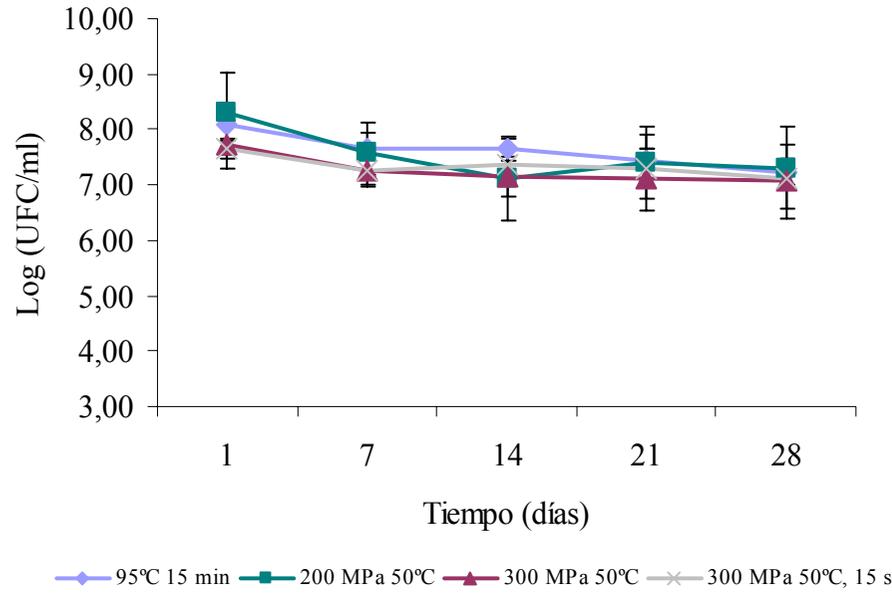
Durante el almacenamiento, el recuento de ambos microorganismos fue disminuyendo progresivamente. En el caso de *S. thermophilus*, el descenso fue muy gradual, inferior a 1 unidad logarítmica y muy similar en todas las muestras. A los 28 días de almacenamiento a 4°C no se detectaron diferencias entre los recuentos de los 4 tipos de sogur.

En cambio, la disminución de los recuentos de *L. delbrueckii* spp *bulgaricus* fue más acentuada, sobre todo a partir de los 21 días de almacenamiento y, en el caso de los yogures de licuado tratado a 95°C 15 min, superó las 2,5 unidades logarítmicas. Al final del estudio se observaron diferencias significativas entre este último y el procedente de licuado tratado a 300 MPa 50°C 15 s, que mostró el recuento final más elevado, probablemente debido al extraño comportamiento que se detectó el día 21 de análisis, en que el recuento aumentó de forma significativa para volver a disminuir después.

Distintos autores han observado pérdidas de viabilidad de *L. bulgaricus* durante el almacenamiento. En yogur Lanciotti *et al.* (2004a) señalan una reducción de 1 unidad logarítmica y Damin *et al.* (2008); y Gueimonde *et al.* (2003) señalan disminuciones similares a las observadas en nuestro estudio. Uno de los factores que puede afectar a la viabilidad de *L. bulgaricus* es la presencia de oxígeno disuelto (Damin *et al.*, 2008; Rochat *et al.*, 2006) ya que no dispone de las enzimas necesarias (catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa) para eliminar el peróxido de hidrógeno u otros compuestos causantes de estrés oxidativo que la misma bacteria puede producir, causando la detención del crecimiento (Rochat *et al.*, 2006; Van de Guchte *et al.*, 2001). En cualquier caso, los recuentos finales de bacterias vivas en nuestro producto fermentado superan las 7 unidades logarítmicas, uno de los requisitos establecidos en la norma de calidad del yogur tradicional.

La disminución de la población de *L. bulgaricus* explicaría la casi nula post-acidificación que se observa al final de la vida útil del producto.

Streptococcus thermophilus



Lactobacillus delbrueckii spp *bulgaricus*

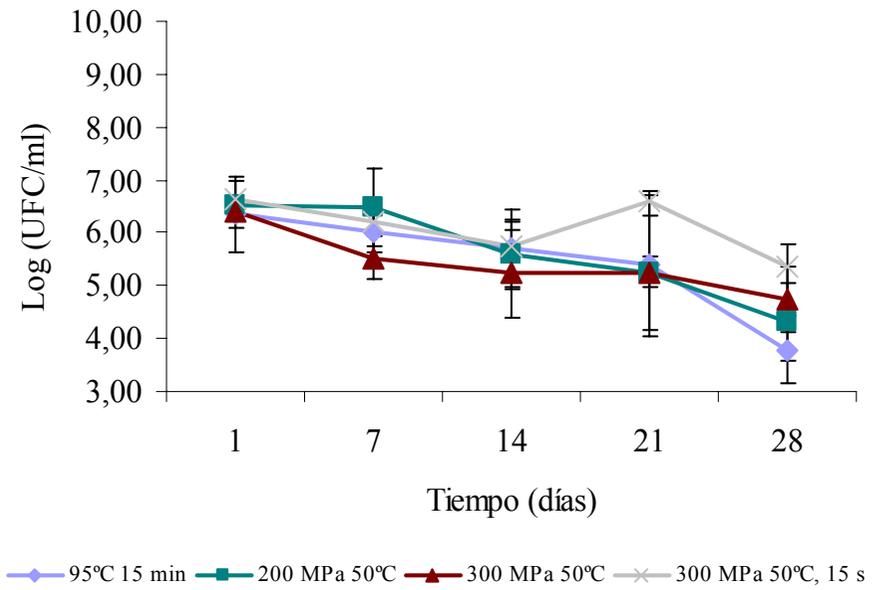


Figura 18. Supervivencia de los cultivos iniciadores en el yogur de soja elaborados con licuados tratados a 95°C 15 min y por UHPH

4.3.4. Microestructura de los yogures de soja.

Se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal de los yogures de soja, que revelaron el grado de interacción entre la grasa y la proteína y las fracciones proteína-proteína a los días de estudio 1, 7, 14, 21 y 28. Se seleccionaron las de los días 1 y 28, que se muestran en la figura 19. En estas micrografías se muestra la matriz proteica de los geles con tinción fluorescente que, como contribuyente mayoritario a la formación de la red del gel, es la fracción que proporciona información más detallada sobre su estructura. En las imágenes del día 1, en los yogures de soja elaborados con licuado tratado a 95°C, 15 min, se pudo observar fácilmente la grasa a pesar de no haberse utilizado tinción específica para ella, pues migró a la superficie del gel durante el proceso de fermentación. En este tratamiento se pudieron observar el gran número y elevado tamaño de los glóbulos grasos. Por el contrario, estos no fueron fácilmente visibles en los yogures UHPH, pues permanecieron dentro de la red proteica. En general, el tratamiento UHPH proporcionó una red proteica densa y homogénea aunque algo distinta entre tratamientos. Las muestras procedentes de licuados tratados a 300 MPa 50°C, tuvieron una estructura más compacta, comparadas con las de licuado tratado a 200 MPa 50°C. El tratamiento a 300 MPa 50°C, 15 s mostró un aspecto similar pero con una estructura ligeramente más abierta, en la que se pueden observar pequeños espacios, en negro, donde el agua está atrapada. El comportamiento de estos geles fue muy similar a los obtenidos en el estudio de coagulación y el tratamiento a 95°C 15 min dio lugar a un yogur comparable al obtenido con el tratamiento AC aplicado en aquel estudio.

El día 28 se observó, en todos los casos, una compactación de la estructura, probablemente debida al efecto de la sinéresis.

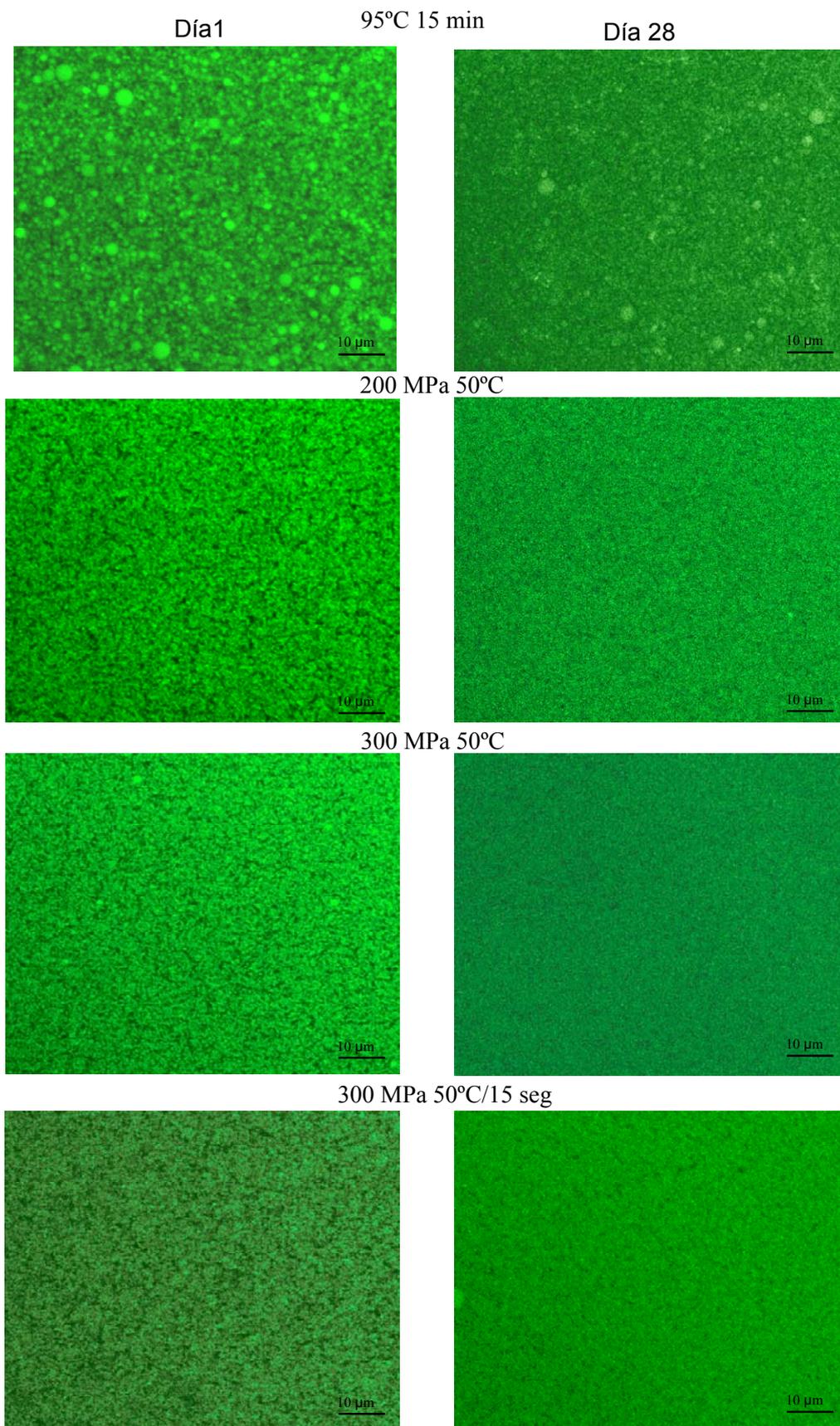


Figura. 19. Micrografías de la matriz proteica de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 y por UHPH, correspondientes a los días 1 y 28 de almacenamiento a 4°C.

4.3.5. Propiedades viscoelásticas.

Las características de viscoelasticidad de los geles tales como los yogures pueden describirse mediante los parámetros G' (módulo de almacenamiento), relacionado con los fenómenos moleculares de naturaleza elástica; G'' (módulo de pérdida) relacionado con el carácter viscoso; $\tan \delta$, que corresponde a G''/G' , en el que los valores cercanos a 0 indican un comportamiento más sólido y G^* (módulo complejo), que corresponde a $(G'^2 + G''^2)^{1/2}$. En la figura 20 se muestran las curvas de barrido de frecuencia de los yogures de soja, correspondientes a los días 1 y 28 de almacenamiento en refrigeración. Los valores de G' fueron siempre más altos que los de G'' , indicando el carácter predominantemente sólido de los yogures de soja. El comportamiento de G' y G'' está relacionado con el número y la fuerza de las interacciones responsables de la red del gel (Lucey & Singh, 1998). Se observó que los yogures de soja elaborados con el producto tratado a 95°C, 15 min mostraron menores valores de G' respecto a los tratados por UHPH, esto es debido a que estos últimos presentaron más interacciones proteína-proteína y proteína-grasa, mientras que los de 95°C 15 min, presentaron una red desordenada, debido a los glóbulos de grasa dispersos en la red proteica. Además, los tratados a 300 MPa 50°C, 15 s presentaron un incremento adicional del valor G' .

Los valores de $\tan \delta$ resultaron similares para todos los tratamientos (Tabla 16). A lo largo del almacenamiento este valor sufrió una pequeña disminución, que fue sólo significativamente diferente ($p < 0,05$) entre el primer y el último día en los yogures de soja elaborados con licuados tratados a 200 MPa 50°C y 300 MPa 50°C. Los valores promedio de $\tan \delta$ para todos los yogures de soja fueron de $0,224 \pm 0,005$ para el día 1 y $0,215 \pm 0,007$ para el día 28, indicando que los cambios en la estructura del gel fueron muy leves.

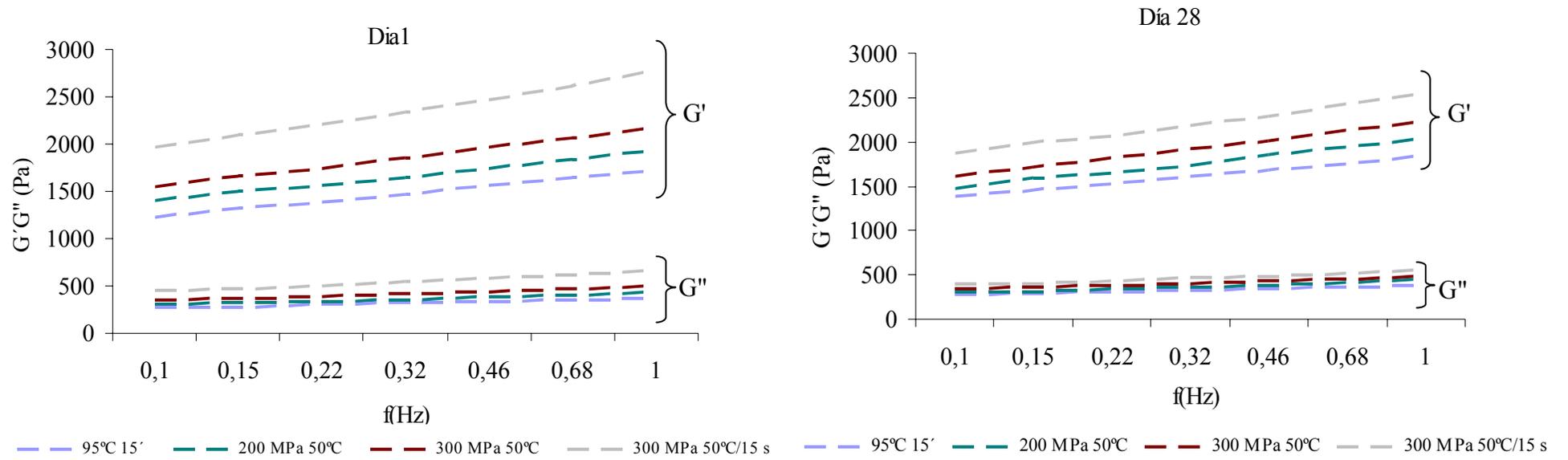


Figura 20. Curvas de barrido de frecuencia de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, correspondientes a los días 1 y 28 de almacenamiento a 4°C.

El valor G^* representa la resistencia total de un material contra el esfuerzo aplicado; éste se calculó para conocer el desarrollo de rigidez en los yogures de soja (Tabla 17). Los resultados obtenidos demostraron que todos los tratamientos aplicados causaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de G^* . Los yogures de soja elaborados con licuado de soja tratado a 95°C , 15 min, presentaron los valores más bajos de rigidez, mientras que el tratamiento UHPH permitió obtener yogures de soja con valores superiores. Este parámetro fue aumentando a medida que incrementó la intensidad del tratamiento, siendo la combinación 300 MPa 50°C , 15 s la que presentó los mayores valores.

La evolución de G^* de los yogures de soja procedentes de los tratamientos a 200 MPa 50°C y 300 MPa 50°C no presentó diferencias a lo largo del almacenamiento, aunque se observó un leve aumento entre los días 1 y 7. Los valores más bajos y más altos de G^* respectivamente fueron para los yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C , 15 min y 300 MPa 50°C , 15s y, además, en ambos casos su evolución durante el almacenamiento presentó fluctuaciones, indicando una menor estabilización de la estructura del gel.

Tabla 16. Valores medios (\pm d.e.) de $\text{Tan } \delta$ (Pa) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.

Tratamientos	Días de almacenamiento a 4°C.				
	1	7	14	21	28
95°C 15 min	0,221 \pm 0,012 ^{ax}	0,214 \pm 0,005 ^{cxy}	0,217 \pm 0,004 ^{axy}	0,208 \pm 0,006 ^{by}	0,211 \pm 0,007 ^{bxy}
200 MPa 50°C	0,223 \pm 0,005 ^{ax}	0,220 \pm 0,007 ^{abxy}	0,217 \pm 0,008 ^{axy}	0,214 \pm 0,005 ^{aby}	0,213 \pm 0,005 ^{by}
300 MPa 50°C	0,223 \pm 0,005 ^{ax}	0,220 \pm 0,005 ^{abxy}	0,220 \pm 0,000 ^{axy}	0,216 \pm 0,005 ^{ayz}	0,212 \pm 0,004 ^{bz}
300 MPa 50°C, 15 s	0,227 \pm 0,010 ^{ax}	0,224 \pm 0,007 ^{ax}	0,218 \pm 0,006 ^{ax}	0,217 \pm 0,004 ^{ax}	0,223 \pm 0,010 ^{ax}

^{a-c} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; ^{x-y} Distintos superíndices en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días.

Tabla 17. Valores medios (\pm d.e.) de G^* (Pa) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.

Tratamientos	Días de almacenamiento a 4°C				
	1	7	14	21	28
95°C 15 min	1527 \pm 84 ^{dz}	1676 \pm 96 ^{dy}	1763 \pm 68 ^{dxy}	1792 \pm 92 ^{dx}	1786 \pm 93 ^{dx}
200 MPa 50°C	2003 \pm 31 ^{cx}	2120 \pm 185 ^{cx}	2095 \pm 100 ^{cx}	2067 \pm 176 ^{cx}	2148 \pm 146 ^{cx}
300 MPa 50°C	2251 \pm 125 ^{bx}	2293 \pm 134 ^{bx}	2286 \pm 157 ^{bx}	2385 \pm 236 ^{bx}	2363 \pm 78 ^{bx}
300 MPa 50°C, 15 s	2814 \pm 87 ^{ax}	2542 \pm 78 ^{az}	2671 \pm 48 ^{ay}	2627 \pm 82 ^{ayz}	2891 \pm 129 ^{ax}

^{a-d} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; ^{x-z} Distintos superíndices en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días.

4.3.6. Firmeza del yogur de soja durante el almacenamiento.

Los resultados del análisis de la firmeza, que se define como la fuerza necesaria para alcanzar una deformación dada (Van Vliet *et al.*, 1991), se presentan en la tabla 18. Los yogures de soja elaborados con licuado tratado a 95°C, 15 min presentaron los valores más bajos de firmeza; por el contrario, el tratamiento UHPH del licuado condujo a la obtención de yogures de soja más firmes ($p < 0,05$) y se observó que la firmeza aumentó con el incremento de presión de tratamiento. Sin embargo, no se produjo un aumento adicional de firmeza con el tratamiento de 300 MPa 50°C, 15 s. Durante el almacenamiento, excepto por el tratamiento de 300 MPa 50°C, 15 s, en donde el aumento se observó el día 21, los demás yogures presentaron un aumento de la firmeza a partir del los 7 o 14 días, para estabilizarse después.

Las características mecánicas de los yogures obtenidas mediante el ensayo de punción, presentaron, en general, una tendencia similar a las observadas en los ensayos de viscoelasticidad. Sin embargo, la excepción la constituyó el yogur de soja obtenido a 300 MPa 50°C, 15 s, en el que la firmeza no aumentó con el efecto adicional del tiempo de retención de la temperatura. Es posible que la diferencia entre los parámetros mecánicos de G^* y firmeza, pueda atribuirse a la diferencia de magnitud de la fuerza aplicada en la evaluación mecánica, ya que el parámetro G^* se obtiene de un análisis que no rompe la estructura de la red y, por lo tanto, su sensibilidad para detectar la contribución de las diferentes interacciones es más alta que en la prueba de punción, en la que se experimenta la rotura macroscópica de gel.

Tabla 18. Valores medios (\pm d.e.) de firmeza (N) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.

Tratamientos	Días de almacenamiento a 4°C				
	1	7	14	21	28
95°C 15 min	1,33 \pm 0,24 ^{cy}	1,53 \pm 0,30 ^{cx}	1,60 \pm 0,33 ^{cx}	1,67 \pm 0,38 ^{cx}	1,55 \pm 0,35 ^{cx}
200 MPa 50°C	1,66 \pm 0,20 ^{by}	1,97 \pm 0,34 ^{bx}	1,95 \pm 0,35 ^{bx}	2,00 \pm 0,37 ^{bx}	2,05 \pm 0,26 ^{bx}
300 MPa 50°C	2,11 \pm 0,23 ^{ayz}	2,04 \pm 0,38 ^{bz}	2,27 \pm 0,37 ^{axy}	2,40 \pm 0,35 ^{ax}	2,19 \pm 0,44 ^{abxyz}
300 MPa 50°C, 15 seg	2,10 \pm 0,23 ^{ay}	2,40 \pm 0,21 ^{ax}	2,29 \pm 0,22 ^{ax}	2,31 \pm 0,24 ^{ax}	2,35 \pm 0,38 ^{ax}

^{a-c}Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; ^{x-z}Diferentes superíndices en la misma línea indica diferencia significativas ($p < 0,05$) entre días.

4.3.7. Capacidad de retención de agua (CRA) del yogur de soja durante el almacenamiento.

Durante el almacenamiento de los yogures de soja es probable que se produzcan transiciones y/o rupturas en la red proteica que provoquen la expulsión del agua. Para estimar la capacidad de retención de agua de los yogures de soja se realizaron dos análisis: la medida de la sinéresis espontánea y la medida de la expulsión de la fase acuosa inducida por centrifugación. En la tabla 19 se presentan los resultados de sinéresis espontánea y se observa que los distintos yogures de soja no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos durante la primera mitad del almacenamiento pero sí se detectaron en los análisis del día 21 y 28. La sinéresis espontánea aumentó en todos los yogures ($p < 0,05$) a lo largo del almacenamiento, a partir del día 1 y de manera progresiva. El día 28, los yogures elaborados con licuado de soja tratado a 300 MPa, 15 s, mostraron un leve incremento respecto al resto.

Tabla 19. Resultado de sinéresis espontánea (%) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento.

Tratamientos	Días de almacenamiento a 4°C				
	1	7	14	21	28
95°C 15 min	1,42 ± 0,67 ^{az}	1,79 ± 0,20 ^{ay}	2,01 ± 0,40 ^{axy}	1,92 ± 0,28 ^{bxy}	2,12 ± 0,32 ^{bx}
200 MPa 50°C	1,64 ± 0,52 ^{ay}	1,88 ± 0,46 ^{axy}	2,09 ± 0,30 ^{ax}	2,10 ± 0,48 ^{abx}	2,15 ± 0,33 ^{bx}
300 MPa 50°C	1,34 ± 0,65 ^{az}	1,69 ± 0,41 ^{ay}	1,80 ± 0,50 ^{axy}	1,96 ± 0,58 ^{bwx}	2,13 ± 0,36 ^{bw}
300 MPa 50°C, 15 s	1,75 ± 0,40 ^{az}	1,74 ± 0,37 ^{az}	2,04 ± 0,23 ^{ayz}	2,35 ± 0,48 ^{ayx}	2,49 ± 0,22 ^{ax}

^{a-b}Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos;

^{x-z}Diferentes superíndices en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días.

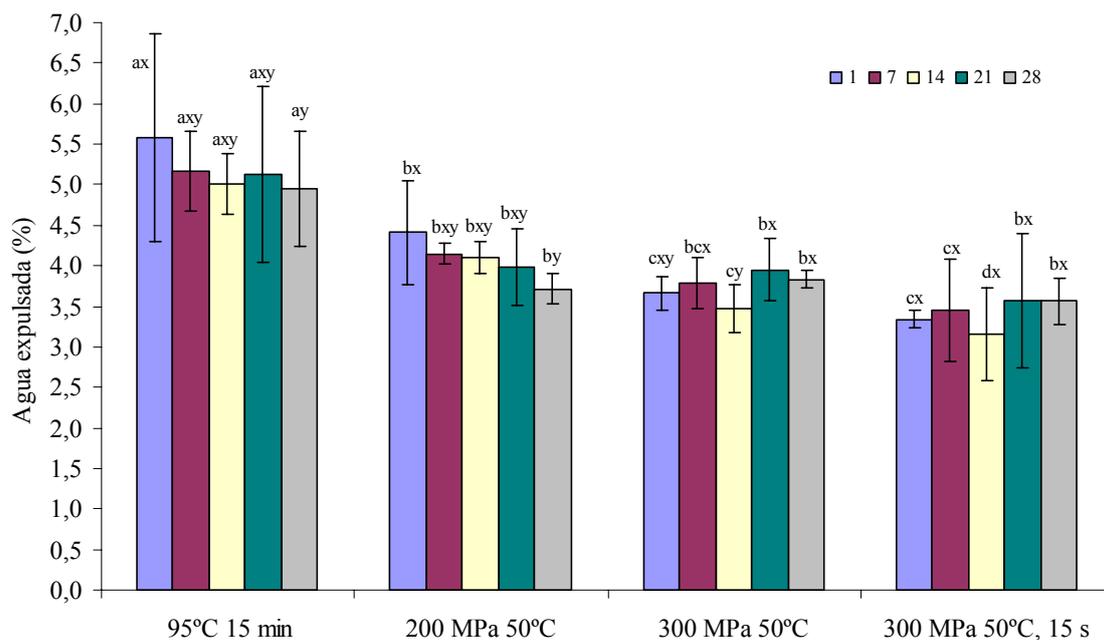


Figura 21. Evolución de agua expulsada inducida por centrifugación en los yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C. ^{a-c}Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos; ^{x-y}Diferentes superíndices en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días.

Los resultados de la expulsión de fase acuosa inducida por centrifugación (Figura 21) fueron distintos a los de sinéresis espontánea. Los yogures de soja elaborados con licuado tratado por UHPH, presentaron valores significativamente más bajos de agua expulsada ($p < 0,05$) que los elaborados con licuado tratado a 95°C, 15 min y este efecto fue más evidente a medida que la aplicación de presión se fue incrementado. Sin embargo, los yogures de soja elaborados con licuado de soja tratado a 300 MPa 50°C, 15 s, no manifestaron una retención de agua adicional comparados con el tratamiento de presión a 300 MPa 50°C. La evolución durante el almacenamiento de todos los yogures de soja dio lugar a un producto estable en términos de CRA pues, en general, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) durante el periodo de almacenamiento, a excepción de los yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y 200 MPa 50°C, en los que la expulsión de la fase acuosa fue significativamente más baja ($p < 0,05$) el día 28 de almacenamiento que el día 1. Es importante mencionar que todos los aspectos de microestructura antes mencionados están estrechamente relacionados

con los resultados de CRA, un parámetro muy importante en los geles alimentarios, ya que la sinéresis es un defecto indeseable en estos productos.

Comparados con los resultados descritos por Kovalenko & Briggs (2002) en yogur de soja elaborado con licuado tratado a 95°C, 15 min, nuestros resultados de sinéresis espontánea fueron bajos, pues estos autores obtuvieron valores de sinéresis situados en un intervalo del 4 al 15 %. En nuestro caso, la principal, aunque baja expulsión de agua por parte del gel, se produce durante las primeras 24 horas, cuando la estructura se está estabilizando en refrigeración. Después se produce una leve retracción de la red durante el almacenamiento en frío que implica la expulsión de agua causada por el establecimiento de nuevas interacciones entre partículas y moléculas, como confirman las micrografías del día 28 de almacenamiento (Figura 19).

4.3.8. Parámetros de color de yogur de soja durante el almacenamiento.

Durante el periodo de almacenamiento de los yogures, se evaluaron las coordenadas de color L^* , a^* y b^* (Tabla 20). Un día después de la elaboración, los yogures de soja elaborados con el licuado tratado a 95°C, 15 min, presentaron valores significativamente bajos de la coordenada L^* (luminosidad) respecto a los UHPH, que presentaron valores semejantes entre ellos. La evolución de L^* varió arbitrariamente a lo largo del almacenamiento mostrando, en algunos casos, diferencias entre los días 1 y 28. De todas maneras, las diferencias observadas fueron de aproximadamente 1 unidad, un cambio que probablemente no pueda ser detectado por los consumidores. Aunque en el licuado de soja investigado en la primera etapa de estudio el tratamiento UHPH causó una disminución de la luminosidad, la estructura coloidal de los geles cambió la interacción con la luz, de manera que se contrarrestó ése efecto inicial.

En la coordenada a^* (eje del rojo al verde), los yogures de soja presentaron valores positivos en todos los tratamientos aplicados. Estos valores fueron contrarios a los obtenidos en el licuado de soja, que presentó una contribución negativa de a^* , en la zona del verde y atribuibles a la formación del gel. Aunque el yogur de soja tiene color blanco a la vista, el colorímetro detectó la contribución positiva en la zona del rojo, y se observó que en todos los yogures de soja UHPH, los valores de a^* fueron más altos que

en los yogures obtenidos con licuado tratado a 95°C, 15 min. Además, durante el periodo de almacenamiento, todos los yogures presentaron un aumento significativo de a^* , que ya se produjo, sobre todo, entre los días 1 y 7 de refrigeración.

En los resultados de la coordenada b^* (eje del azul al amarillo), los valores fueron positivos en todos los casos, con contribución del amarillo al color del yogur de soja. El valor significativamente más alto ($p < 0,05$) fue el del yogur procedente de licuado de soja tratado a 95°C, 15 min, que también presentó valores estables durante el almacenamiento, mientras que la contribución del amarillo en los yogures de soja UHPH disminuyó significativamente durante el almacenamiento, produciéndose la diferencia más acentuada entre el día 1 y el día 7.

Los datos obtenidos en nuestro estudio son comparables a los del estudio realizado por Cheng *et al.* (1990) en yogures elaborados con licuado tratado por autoclave (121°C, 15 min), con valores similares en los cuadrantes rojo (0,18) y amarillo (9,25), aunque menores en el parámetro L^* (68,58). Lee *et al.* (1990) proporcionan valores de L^* de 80,80 en yogures elaborados con licuado tratado por ebullición, similares a los encontrados en nuestro estudio. Estos últimos autores mencionan que la luminosidad del yogur de soja es atribuida a las propiedades de dispersión de la luz de las globulinas de la soja coagulada.

Para tener una estimación del cambio global del color a lo largo del almacenamiento, se calculó el valor de ΔE entre el día 1 y el día 28. Los resultados indicaron que el yogur más estable en términos de diferencia de color fue el elaborado con licuado tratado a 95°C, 15 min, con un valor $\Delta E = 0,88 \pm 0,11$; seguido por el de 300 MPa 50°C, 15 s, con $\Delta E = 2,44 \pm 0,59$; y por último, los de 200 MPa 50°C y 300 MPa 50°C, que dieron valores similares de ΔE , alrededor de 4,67.

Por otro lado, asumiendo que, en nuestro estudio, el yogur obtenido a partir del producto tratado a 95°C, 15 min, es el producto de referencia para el consumidor, se calculó la diferencia de color entre éste y los elaborados con licuado UHPH (Tabla 20). Esta diferencia global fue incrementando a lo largo del almacenamiento, siendo principalmente debida a los menores valores de b^* en los yogures UHPH. El yogur de soja obtenido con el tratamiento a 300 MPa 50°C, 15 s, fue el que exhibió la menor diferencia de color comparado con el producto de referencia. Los cambios de color en

los yogures de soja UHPH pueden ser debidos, por un lado, a los cambios químicos que se desarrollaron en los licuados de soja tratados durante el tratamiento UHPH y, por otro, a las distintas estructuras de los geles formadas durante la fermentación y que, como ya se ha discutido, evolucionan durante el almacenamiento.

Tabla. 20. Resultado de parámetros de color de L^* , a^* , b^* y diferencia de color (ΔE) de yogures de soja elaborados con licuados tratados a 95°C, 15 min y por UHPH, durante el almacenamiento a 4°C.

	Almacenamiento (días)	Tratamientos			
		95°C 15 min	200 MPa 50°C	300 MPa 50°C	300 MPa 50°C, 15 s
L^*	1	85,45 ± 0,37 ^{bz}	86,41 ± 0,10 ^{ax}	85,99 ± 0,78 ^{axy}	86,10 ± 0,23 ^{ax}
	7	86,28 ± 0,16 ^{axy}	85,73 ± 0,33 ^{by}	85,40 ± 0,52 ^{cx}	85,77 ± 0,40 ^{bxy}
	14	86,59 ± 0,18 ^{ax}	84,95 ± 0,50 ^{bz}	85,47 ± 0,40 ^{bx}	85,17 ± 0,80 ^{byz}
	21	86,50 ± 0,09 ^{axy}	84,89 ± 0,39 ^{bz}	85,30 ± 0,37 ^{bx}	85,23 ± 1,22 ^{byz}
	28	86,24 ± 0,05 ^{ay}	85,17 ± 0,06 ^{bz}	84,61 ± 0,27 ^{by}	84,95 ± 1,13 ^{bz}
a^*	1	0,14 ± 0,01 ^{cz}	0,43 ± 0,07 ^{az}	0,25 ± 0,03 ^{bz}	0,31 ± 0,02 ^{bz}
	7	0,33 ± 0,03 ^{dxy}	1,19 ± 0,02 ^{by}	0,81 ± 0,04 ^{cy}	1,37 ± 0,02 ^{ay}
	14	0,34 ± 0,02 ^{cxy}	1,44 ± 0,03 ^{aw}	1,39 ± 0,03 ^{bw}	1,37 ± 0,01 ^{by}
	21	0,31 ± 0,01 ^{dy}	1,30 ± 0,02 ^{bx}	1,16 ± 0,17 ^{cx}	1,47 ± 0,03 ^{ax}
	28	0,36 ± 0,03 ^{bx}	1,37 ± 0,01 ^{ax}	1,38 ± 0,02 ^{aw}	1,38 ± 0,01 ^{ay}
b^*	1	14,25 ± 0,04 ^{ax}	11,83 ± 0,46 ^{bx}	11,34 ± 0,16 ^{cw}	11,25 ± 0,10 ^{cx}
	7	13,60 ± 0,27 ^{az}	8,54 ± 0,56 ^{dy}	9,12 ± 0,07 ^{cx}	10,89 ± 0,03 ^{bxy}
	14	14,19 ± 0,51 ^{axy}	8,28 ± 0,27 ^{dy}	8,98 ± 0,47 ^{cx}	10,52 ± 0,16 ^{by}
	21	13,93 ± 0,56 ^{axy}	7,33 ± 0,05 ^{dz}	8,47 ± 0,20 ^{cy}	10,56 ± 0,07 ^{by}
	28	13,94 ± 0,63 ^{axy}	7,41 ± 0,05 ^{cz}	7,03 ± 0,27 ^{cz}	9,34 ± 0,47 ^{bz}
ΔE	1	--	2,62 ± 0,47 ^{bz}	2,95 ± 0,16 ^{abz}	3,07 ± 0,05 ^{az}
	7	--	5,17 ± 0,57 ^{ay}	4,61 ± 0,15 ^{by}	2,97 ± 0,07 ^{cz}
	14	--	6,24 ± 0,38 ^{ax}	5,44 ± 0,52 ^{bx}	4,13 ± 0,08 ^{cy}
	21	--	6,87 ± 0,14 ^{ax}	5,67 ± 0,16 ^{bx}	3,93 ± 0,22 ^{cy}
	28	--	6,70 ± 0,06 ^{ax}	7,17 ± 0,23 ^{aw}	4,97 ± 0,66 ^{bx}

^{a-d} Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días; ^{w-z} Distintos superíndices en la misma línea indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

4.3.9. Actividad del inhibidor de tripsina (IT) en el yogur de soja durante el almacenamiento.

En la figura 22 se muestran los valores de actividad residual de los IT del licuado antes de fermentar y en los yogures de 1 y 28 días. El licuado de soja tratado a 95°C, 15 min presentó los valores más bajos de actividad de los IT, seguido por los productos tratados a 300 MPa 50°C, 15 s, 300 MPa 50°C y 200 MPa 50°C. La reducción de la actividad residual de los IT entre los licuados de soja tratados por UHPH fue más evidente cuando la aplicación de presión se fue incrementando, así como el tiempo de retención aplicado, mostrando un valor de 66,13%, en el producto tratado a 300 MPa 50°C, 15 s, muy similar al obtenido en la primera etapa de estudio del licuado de soja. El bajo valor de actividad residual de licuado de tratado a 95°C, 15 min se atribuye al intenso tratamiento térmico aplicado (Liu, 1999); a consecuencia de esto, los yogures elaborados con este licuado, presentaron valores inapreciables respecto a los demás.

Los yogures de soja del día 1 mostraron una reducción significativa de actividad residual de los IT en todos los casos, excepto en los procedentes de licuado tratado a 300 MPa 50°C, 15 s. Entre ellos mostraron diferencias significativas, las mismas que se observaron en los licuados de soja de los que procedían. La reducción de la actividad residual en los productos UHPH después de la fermentación se situó entre el 1% (300 MPa 50°C, 15 s) y el 10% (200 MPa 50°C). En el producto tratado térmicamente, la reducción fue total, aunque hay que tener en cuenta que el licuado ya partía de unos valores de actividad IT muy bajos. Kanekar *et al.* (1992) demostraron que, en masas preparadas con harina de soja y agua, la fermentación láctica reduce la actividad IT en un 5-6%. Además, observaron que las bacterias ácido-lácticas pueden hidrolizar la caseína en presencia de los IT activos, aunque estos inhiban la hidrólisis de la caseína por parte de la tripsina, por lo que sugieren que la proteasa producida por las bacterias ácido-lácticas parece ser diferente a la tripsina. Este comportamiento puede ser una gran ventaja para la producción de productos fermentados derivados de licuado de soja.

El almacenamiento a 4°C durante 28 días también tuvo efecto sobre la actividad de los IT, causando una disminución respecto al día 1. La disminución más acentuada se observó en los productos tratados a 200 MPa 50°C (19% de reducción adicional), seguida de 300 MPa 50°C (16,4%). La reducción del 10% en los yogures procedentes de licuado tratado a 300 MPa 50°C, 15 s no se señaló como significativa en el análisis

estadístico. Esta disminución de la actividad IT durante el almacenamiento en refrigeración podría tener relación con la disminución de la población de *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*. En la leche, este es el microorganismo con mayor actividad proteolítica de los que integran el cultivo iniciador y en licuado de soja también se ha demostrado este comportamiento (Donkor *et al.*, 2007b). Como ya se ha descrito, la población de *L. bulgaricus* disminuyó a lo largo de la vida útil del yogur de soja (Figura 18). Si se produjo lisis celular, se pudieron haber liberado peptidasas al medio (Saldo *et al.*, 2002) causando desactivación de los IT. Esta hipótesis concuerda con una menor disminución de la actividad IT durante el almacenamiento en los sogures con un mayor número de células vivas de *L. bulgaricus* (300 MPa 50°C, 15 s).

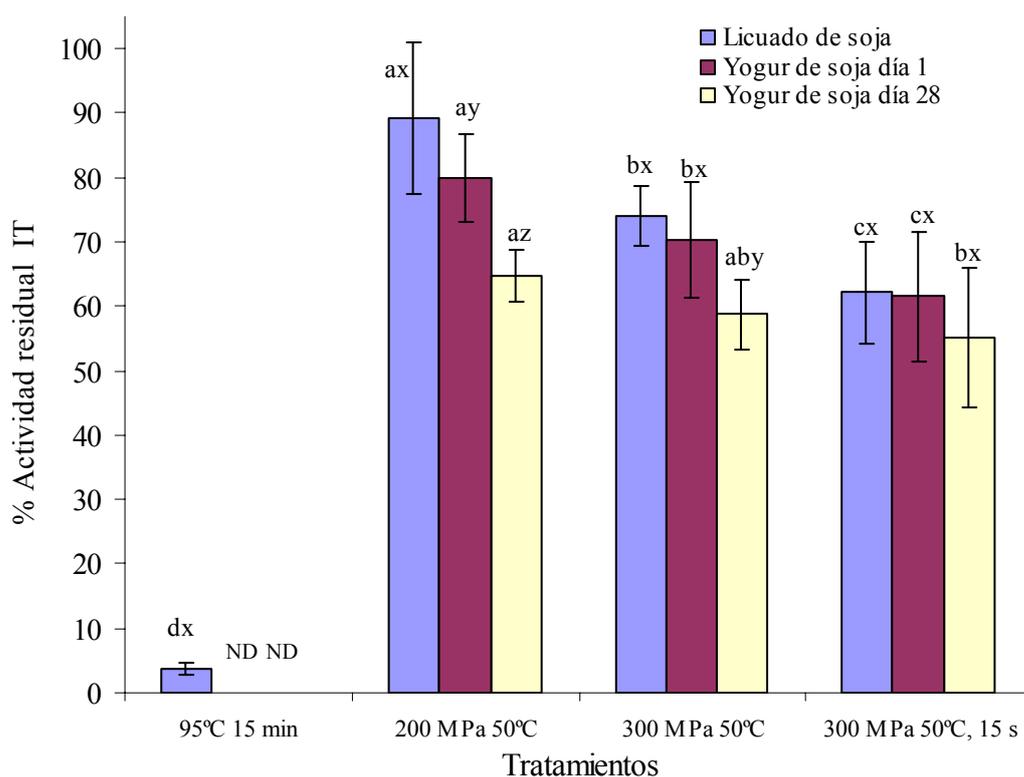


Figura 22. Actividad residual de los IT (%) de licuados de soja tratados a 95°C, 15 min y por UHPH y sus respectivos sogures. ^{a-d}Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre días; ^{x-z}Distintos superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

4.3.10. Oxidación en el yogur de soja durante el almacenamiento.

Para conocer la evolución de la oxidación durante el periodo de almacenamiento se determinó el contenido de TBARS en los licuados de soja sin fermentar y los sogures almacenados los días 1 y 28. Tanto el licuado tratado a 95°C, 15 min como el yogur obtenido a partir de éste, presentaron valores de TBARS inferiores ($p < 0,05$) (Tabla 21) a los de los licuados tratados por UHPH y sus respectivos sogures. No se detectaron diferencias entre los licuados tratados por UHPH, y los valores obtenidos fueron comparables a los de la primera etapa de estudio. La fermentación no tuvo efecto sobre la cantidad de TBARS en ninguna de las muestras estudiadas. El tiempo de almacenamiento sí tuvo efecto, aunque limitado, sobre la cantidad de TBARS, pues el día 28 sólo aumentó en los sogures 95°C 15 min, si bien muy levemente, y en los procedentes de los licuados tratados a 200 MPa 50°C, de manera más manifiesta. Serra *et al.* (2008c), en un estudio con yogures elaborados con leche tratada por UHPH, se observó una pequeña tendencia, aunque no significativa, al aumento de la oxidación durante el almacenamiento de estos.

Lin & Yen (1999) mencionan que las bacterias ácido lácticas poseen habilidad para inhibir la oxidación y que, a pesar de no poseer actividad superóxido-dismutasa, son capaces de quelar iones metálicos, eliminar especies reactivas al oxígeno o demostrar capacidad reductora. Así, las bacterias ácido-lácticas junto con las condiciones de almacenamiento en frío, habrían protegido a los sogures del progreso de la oxidación.

Tabla 21. Contenido en TBARS (mg/l) de licuados de soja tratados a 95°C, 15 min y por UHPH y sus respectivos sogures.

Tratamientos	Licuados de soja	Yogures de soja	
		Día 1	Día 28
95°C 15 min	0,29 ± 0,06 ^{by}	0,31 ± 0,05 ^{cxy}	0,35 ± 0,02 ^{cx}
200 MPa 50°C	0,59 ± 0,09 ^{ay}	0,57 ± 0,06 ^{ay}	0,82 ± 0,11 ^{ax}
300 MPa 50°C	0,58 ± 0,07 ^{ax}	0,50 ± 0,02 ^{bx}	0,60 ± 0,11 ^{bx}
300 MPa 50°C, 15 s	0,59 ± 0,07 ^{ax}	0,55 ± 0,05 ^{abx}	0,56 ± 0,07 ^{bx}

^{a-c}Distintos superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$); ^{x-y}Distintos superíndices en la misma línea indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

V. CONCLUSIONES

1. La UHPH es un tratamiento eficaz para disminuir la carga microbiana de los licuados de soja, ya que garantiza la destrucción total de la población de enterobacterias y tiene un efecto significativo sobre la de esporas. El efecto sobre la población inicial aumenta al incrementar la presión del tratamiento.

2. Las características fisicoquímicas de los licuados de soja tratados por UHPH, muestran aspectos diferenciales respecto a los tratados térmicamente por métodos convencionales, entre los que cabe destacar los siguientes: importante reducción del tamaño de partícula en los licuados tratados por UHPH; ligera disminución de la luminosidad, y mejora considerable de la estabilidad física.

3. Las principales características químicas de calidad del licuado de soja revelan que los tratamientos UHT y UHPH inactivan completamente la enzima LOX. Los valores de TBARS son superiores en los licuados de soja tratados por UHPH respecto a los UHT. Sin embargo, los niveles detectados en los tratados por UHPH podrían ser imperceptibles por el consumidor y, además, se encuentran dentro de los valores o aceptables para productos con perfil de ácidos grasos similar al de la soja. Los licuados de soja tratados por UHT presentan un elevado porcentaje de inactivación de los IT comparado con los tratados por UHPH. Estos, no obstante, muestran una elevada digestibilidad, similar a los UHT, favorecida por la desnaturalización de las proteínas.

4. En relación al perfil de componentes volátiles, el licuado de soja tratado por UHT presenta más diferencias cualitativas respecto al producto base que los UHPH, debido a que el tratamiento térmico es responsable de la formación de gran cantidad de sustancias aromáticas. Sin embargo, algunos componentes, tales como el hexanal, presentan mayor área bajo el pico en los licuados UHPH, en consonancia con los resultados observados en el estudio de la oxidación lipídica.

5. El estudio del proceso de coagulación a 45°C pone de manifiesto diferencias en la cinética del desarrollo de los geles debidas a los tratamientos térmicos y UHPH. El inicio de la coagulación se produce más rápidamente en los licuados UHPH, debido a la mayor superficie activa de interacción generada por la homogeneización. Sin embargo, la velocidad de agregación es superior en los licuados tratados térmicamente a causa del mayor grado de desnaturalización sufrido por las proteínas en comparación con el

tratamiento UHPH. Por otra parte, la densidad del entramado del gel al finalizar el proceso de coagulación fue mayor en los geles obtenidos a partir de licuado tratado térmicamente, ya que a la temperatura de incubación se ven favorecidas las interacciones hidrofóbicas, las cuales fueron predominantes en dichos tratamientos.

6. Los yogures obtenidos a partir del licuado tratado por UHPH presentan mayor firmeza, deformabilidad y capacidad de retención de agua que los elaborados a partir de los productos AC y UHT. Los yogures UHPH son más homogéneos, debido fundamentalmente a las características de distribución de la grasa y al incremento de la superficie activa de interacción, ya que las gotas se encuentran muy bien recubiertas con proteína. Este hecho facilita una íntima interacción proteína-proteína y la estabilización de los geles UHPH, especialmente durante la refrigeración de los mismos. El resultado de la evaluación sensorial avala estas diferencias, mostrando mayor preferencia de los yogures de soja elaborados a partir de licuado tratado por UHPH.

7. La disminución de la población de lactobacilos durante el almacenamiento de los yogures de soja contribuye a que todos ellos mantienen valores de pH adecuados para el consumo, no observándose post-acidificación.

8. El comportamiento mecánico de los yogures durante el almacenamiento muestra mayor carácter viscoelástico en los UHPH en comparación con los obtenidos a partir de tratamiento térmico a 95°C durante 15 min. Los valores de viscoelasticidad a lo largo del almacenamiento indican la alta estabilidad de las interacciones responsables de la estructura de los geles UHPH.

En cuanto a la rotura macroscópica exhibida por los yogures mediante punción, la firmeza de los UHPH es mayor que la de los tratados térmicamente, y aumenta con la presión aplicada. Durante el almacenamiento se observa un ligero aumento de la firmeza debido a la compactación de la estructura como consecuencia de la expulsión de suero.

9. La sinéresis espontánea exhibida durante el almacenamiento es pequeña en todos los yogures y similar en todos los tratamientos; a lo largo del almacenamiento sólo se incrementa ligeramente. La expulsión de fase acuosa inducida por centrifugación es mayor en los yogures obtenidos a partir de licuado tratado a 95°C 15 min en

comparación con los de UHPH; en estos últimos se observa que el incremento de la presión conduce un aumento en la CRA.

10. En términos de color, los sogures UHPH muestran una mayor luminosidad, aunque la estabilidad observada por la diferencia de color entre el día 1 y el 28 de almacenamiento es mayor en el elaborado con licuado de soja tratado a 95°C, 15 min. El sogur UHPH que presenta una menor diferencia de color respecto al de 95°C 15 min, tomado como producto de referencia, es el elaborado con licuado de soja tratado a 300 MPa 50°C, 15 s.

11. La fermentación y el almacenamiento de los sogures favorecen la disminución de la actividad de los inhibidores de tripsina y apenas tienen efecto sobre los niveles de oxidación.

12. Como conclusión final, se puede afirmar que la tecnología UHPH es muy adecuada para el tratamiento del licuado de soja y la obtención de sogur, ya que da lugar a un producto con unas características de calidad, en general, mejoradas respecto del tratamiento término convencional. De los tratamientos estudiados el que ha dado lugar a mejores características globales es el de 300 MPa.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Achouri, A., Boye, J. I., & Zamani, Y. (2006).** Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chemistry* **99**, 759-766.
- Achouri, A., Boye, J. I., & Zamani, Y. (2007a).** Soybean variety and storage effects on soymilk flavour and quality. *International Journal of Food Science & Technology*, **43**, 82-90.
- Achouri, A., Boye, J., & Zamani, Y. (2007b).** Changes in soymilk quality as a function of composition and storage. *Journal of Food Quality* **30**, 731-744.
- Ang, H. G., Kwik, W. L., & Theng, C. Y. (1985).** Development of soymilk- A review. *Food Chemistry* **17**, 235-250.
- AOAC. (2000).** Official methods of analysis. Washington, DC.
- Ashaye, O. A., Taiwo, L. B., Fasoyiro, S. B., & Akinnagbe, C. A. (2001).** Compositional and shelf properties of soy-yogurt using two starter cultures. *Nutrition and Food Science* **31**, 247-250.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., & Laasko, S. (1981).** Lipoxygenase from soybean. En: *Methods in enzymology*. Editores: Lowenstein, J. M. Waltham, Massachusetts. pp. 441-451.
- Badui, D. S. (2006).** Soya. En: *Química de los alimentos*. Editores: Pearson Addison Wesley, México. pp: 633.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1997).** *Química de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España.
- Bello, R. A., & Gil Rivas, W. (1992).** Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada, como fuente de alimento. *FAO*. México. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB494S/AB494S00.HTM>.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., & Mor-Mur, M. (2003).** Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: Role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science* **64**, 19-25.

Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A. J., & Trakatelliss, A. G. (1994). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1931-1937.

Boutin, C., Giroux, H. J., Paquin, P., & Britten, M. (2007). Characterization and acid-induced gelation of butter oil emulsions produced from heated whey protein dispersions. *International Dairy Journal* **17**, 696-703.

Briñez, W. J., Roig-Sagues, A. X., Hernández, M. M., & Guamis, B. (2006a). Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. *Journal of Food Protection* **69**, 86-92.

Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández, M. M., & Guamis, B. (2006b). Inactivation by ultrahigh-pressure homogenization of *Escherichia coli* strains inoculated into orange juice. *Journal of Food Protection* **69**, 984-989.

Briñez, W. J., Roig-Sagues, A. X., Hernández, M., & Guamis, B. (2006c). Inactivation of two strains of *Escherichia coli* inoculated into whole and skim milk by ultrahigh pressure homogenization. *Lait* **86**, 241-249.

Briñez, W. J., Roig-Sagués, A. X., Hernández, M. M., & Guamis, B. (2007). Inactivation of *Staphylococcus* spp. strains in whole milk and orange juice using ultrahigh pressure homogenisation at inlet temperatures of 6 and 20°C. *Food Control* **18**, 1282-1288.

Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology* **9**, 143-151.

Buono, M. A., Niroomand, F., Fung, D. Y. C., & Erickson, L. E. (1989). Destruction of indigenous *Bacillus* spores in soy milk by heat. *Journal of Food Protection* **52**, 825-826.

Buono, M. A., Setser, C., Erickson, L.E., & Fung, D. Y. C. (1990a). Soymilk yogurt: Sensory evaluation and chemical measurement. *Journal of Food Science* **55**, 528-531.

Bury, D., Jelen, P., & Kaláb, M. (2001). Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: A comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2**, 23-29.

Canganella, F., Nespica, M. L., Giontella, D., & Trovatelli, L. D. (1999). Survival of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas paucimobilis* in yoghurts manufactured from cow's milk and soymilk during storage at different temperatures. *Microbiological Research* **154**, 15-21.

Canganella, F., Giontella, D., Nespica, M. L., Massa, S., & Trovatelli, L. D. (2000). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* in yogurts manufactured from cowmilk and soymilk during storage at two temperatures. *Annals of Microbiology* **50**, 43-53.

Chanamai, R., & McClements, D. J. (2001). Prediction of emulsion color from droplet characteristics: dilute monodisperse oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids* **15**, 83-91.

Chantrapornchai, W., Clydesdale, F., & McClements, D. J. (1998). Influence of droplet size and concentration on the color of oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2914-2920.

Chen, S. (1989). Principles of soymilk production. En: Food uses of whole oil and protein seeds, Lusas, E. W., Erikson, D. R., & Nip, W. K. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois. pp: 40-45.

Cheng, Y. J., Thompson, L. D., & Brittin, H. C. (1990). Sogurt, a yogurt-like soybean product: Development and properties. *Journal of Food Science* **55**, 1178-1179.

Chizzolini, R., Novelli, E., & Zanardi, E. (1998). Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Meat Science* **49**, S87-S99.

Chou, C., & Hou, J. (2000). Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *International Journal of Food Microbiology* **56**, 113-121.

Damin, M. R., Minowa, E., Alcántara, M. R., & Oliveira, M. N. (2008). Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies* **39**, 40-55.

Datta, N., Hayes, M. G., Deeth, H. C., & Kelly, A. L. (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research* **72**, 393-399.

Desrumaux, A., & Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa): Effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science & Technology* **37**, 263-269.

Diels, A. J., Callewaert, L., Wuytack, E., Masschalck, B., & Michiels, C. (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**, 281-291.

Diels, A. M. J., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., & Michiels, C. W. (2004). Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnology Progress* **20**, 1512-1517.

Diels, A. M. J., Wuytack, E. Y., & Michiels, C. W. (2003). Modelling inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* by high-pressure homogenisation at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 55-62.

Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007b). Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 9868-9876.

Donkor, O., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007a). α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry* **104**, 10-20.

Drake, M. A., & Gerard, P.D. (2003). Consumer attitudes and acceptability of soy-fortified yogurts. *Journal of Food Science* **68**, 1118-1122.

Drake, M.A., Chen, X. Q., Tamarapu, S., & Leenanon, B. (2000). Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts. *Journal of Food Science* **65**, 1244-1247.

Ediriweera, N., Akiyama, Y., & Saio, K. (1987). Inactivation of lipoxygenase in soybeans with retention of protein solubility. *Journal of Food Science* **52**, 685-690.

FAO. (2002). Chapter XIX soybeans: Post-harvest Operations. Disponible en: <http://www.fao.org/inpho/content/compnd/text/Ch19sec1.htm#>.

Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M.-P., Gardner, N., Fliss, I., & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology* **116**, 174-181.

Fávaro Trindade, C. S., Terzi, S. C., Trugo, L. C., Modesta, R. C., & Couri, S. (2001). Development and sensory evaluation of soy milk base yoghurt. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición* **51**, 100-104.

Fávaro Trindade, S.C., Cascardo Silva, F., Freitas, S., & Couri, S. (1997). Comportamiento reológico de los "yogurts" de soya homogeneizados y no homogeneizados. *Alimentaria* **285**, 69-73.

Feijoo, S. C., Hayes, W. W., Watson, C. E., & Martin, J. H. (1997). Effects of Microfluidizer® technology on *Bacillus licheniformis* spores in ice cream mix. *Journal of Dairy Science* **80**, 2184-2187.

Fenaille, F., Mottier, P., Turesky, R., Ali, S., & Guy, P. (2001). Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *Journal of Chromatography A* **921**, 237-245.

Fenaille, F., Visani, P., Fumeaux, R., Milo, C., & Guy, P. A. (2003). Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2790-2796.

Fisher, C., & Scott, T. R. (1997). Food Flavours. Biology and Chemistry. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. UK.

Floury, J., Desrumaux, A., & 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**, 127-134.

Floury, J., Desrumaux, A., & Legrand, J. (2002a). Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science* **67**, 3388-3395.

Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. A. V., & Legrand, J. (2002b). Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation. *Food Hydrocolloids* **16**, 47-53.

Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M. V., & Legrand, J. (2003). Effect of high pressure homogenisation on methylcellulose as food emulsifier. *Journal of Food Engineering* **58**, 227-238.

Floury, J., Bellettre, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004a). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science* **59**, 843-853.

Floury, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004b). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. Study of droplet break-up and recoalescence phenomena. *Chemical Engineering Science* **59**, 1285-1294.

Friedman, M., & Brandon, D.L. (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 1069-1086.

Garro, M. S., de Valdez, G. F., Oliver, G., & de Giori, G. S. (1999). Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. *Journal of Food Protection* **62**, 808-810.

Garro, Marisa S., de Valdez, G. F., Oliver, G., & de Giori, G. S. (1998). Growth characteristics and fermentation products of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus casei* and *L. fermentum* in soymilk. *European Food Research and Technology* **206**, 72-75.

German, B., Damodaran, S., & Kinsella, J. E. (1982). Thermal dissociation and association behavior of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**, 807-811.

Golbitz, P. (1995). Traditional soyfoods – Processing and Products. *Journal of Nutrition* **125**, S570-S572.

Grau, A., Guardiola, F., Boatella, J., Barroeta, A., & Codony, R. (2000). Measurement of 2-thiobarbituric acid values in dark chicken meat through derivative spectrophotometry: Influence of various parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1155-1159.

Griffiths, D. W. (1984). The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various pea (*pisum* spp.) and field bean (*vicia faba*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **35**, 481-486.

Guamis, B., Trujillo, A., Ferragut, V., & Daoudy, L. (2006). Aplicaciones de las altas presiones en la industria alimentaria. En: Técnicas avanzadas de procesado y conservación de alimentos. Editores: Blanco, C. A., Gómez, M., Ronda, F., & Caballero, P. A. Valladolid. pp. 61-76.

Gueimonde, M., Alonso, L., Delgado, T., Bada-Gancedo, J. C., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2003). Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk. *Food Research International* **36**, 43-48.

Guerzoni, M. E., Vannini, L., Lopez, C. C., Lanciotti, R., Suzzi, G., & Gianotti, A. (1999). Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. *Journal of Dairy Science* **82**, 851-862.

Guimarães, V. M., Tavares de Rezende, S., Moreira, M. A. Gonçalves de Barros, E., & Felix, C. R. (2001). Characterization of α -galactosidase from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* **58**, 67-73.

Guo, S-T., Ono, T., & Mikami, M. (1997). Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 4601-4605.

Gupta, R. P., & Gupta, R. (May 17, 1988). Equipment for making no-beany flavor soymilk. USA. 4,744,524.

Guraya, H. S., & James, C. (2002). Deagglomeration of rice starch-protein aggregates by high-pressure homogenization. *Starch - Stärke* **54**, 108-116.

Hamerstrand, G .E., Black, L. T., & Glover, J. D. (1981) Trypsin-inhibitors in soy products - Modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry* **58**, 42-45.

Haque, A., Richardson, R. K., & Morris, E. R. (2001). Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids* **15**, 593-602.

Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003a). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research* **70**, 297-305.

Hayes, M. G., & Kelly, A. L. (2003b). High pressure homogenisation of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. *Journal of Dairy Research* **70**, 307-313.

Hayes, M. G., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. *Journal of Dairy Research* **72**, 25-33.

Hou, J-W., Yu, R-Ch., Chou, Ch-Ch. (2000). Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International* **33**, 393-397.

Howard, P. A., Lehnhardt, W. F., & Orthoefer, F. T. (Jan. 11, 1983). 7S and 11S vegetable protein fractionation and isolation. USA. 4,368,151.

Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science* **42**, 1269-1273.

Hua, Y., Cui, S., Wang, Q., Mine, Y., & Poysa, V. (2005). Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Research International* **38**, 377-385.

IDF (1997). Yaourt. Denombrement des microorganismes caracteristiques. Standard 117B. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.

IDF. (1991). Yogurt. Determination of titrable acidity. Standard 150. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.

IDF. (2002). Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Routine method using combustion according to the Dumas principle. Standard 185. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.

Ikeda, K., Matsuda, Y., Katsumaru, A., Teranishi, M., Yamamoto, T., & Kishida, M. (1995). Factors affecting protein digestibility in soybean foods. *Cereal Chemistry* **72**, 401-405.

Iwuoha, C. I., & Umunnakwe, K. E. (1997). Chemical, physical and sensory characteristics of soymilk as affected by processing method, temperature and duration of storage. *Food Chemistry* **59**, 373-379.

Johnson, L. A., Hoover, W. J., & Deyoe, C. W. (Oct. 11, 1983). Soymilk process. USA. 4,409,256.

Jood, S., Mehta, U., Singh, R., & Bhat, C. M. (1985). Effect of processing on flatulence-producing factors in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 268-271.

Kajiyama, N., Isobe, S., Uemura, K., & Noguchi, A. (1995). Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. *International Journal of Food Science & Technology* **30**, 147-158.

Kanekar, P., Joshi, N., Sarnaik, S., & Kelkar, A. (1992). Effect of fermentation by lactic acid bacteria from soybean seeds on trypsin inhibitor (TI) activity. *Food Microbiology* **9**, 245-249.

Karleskind, D., Laye, I., Halpin, E., & Morr, C. V. (1991). Improving acid production in soy-based yogurt by adding cheese whey proteins and mineral salts. *Journal of Food Science* **56**, 999-1001.

- Keinan-Boker, L., Peeters, P. H. M., Mulligan, A. A., Navarro, C., & Slimani, N. (2002).** Soy product consumption in 10 European countries: The European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutrition* **5**, 1217-1226.
- Kennedy, I. R., Mwandemele., & McWhirter, K. S. (1985).** Estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds. *Food Chemistry* **17**, 85-93.
- Kheadr, E. E., Vachon, J. F., Paquin, P., & Fliss, I. (2002).** Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of cheddar cheese. *International Dairy Journal*, **12**, 435-446.
- Kielczewska, K., kruk, A., Czerniewicz, M., Warminska, M., & Haponiuk, E. (2003).** The effect of high-pressure homogenization on changes in milk colloidal and emulsifying systems. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **12**, 43-46.
- Knudsen, K. E., & Li, B. W. (1991).** Determination of oligosaccharides in protein-rich feedstuffs by gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 689-694.
- Koca, A. F., Yazici, F., & Anil, M. (2002).** Utilization of soy yoghurt in tarhana production. *European Food Research and Technology* **215**, 293-297.
- Kohyama, K., & Nishinari, K. (1993).** Rheological studies on the gelation process of soybean 7S and 11S proteins in the presence of glucono- δ -lactone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 8-14.
- Kovalenko, I. V., & Briggs, J. L. (2002).** Textural characterization of soy-based yogurt by the Vane method. *Journal of Texture Studies* **33**, 105-118.
- Kulmyrzaev, A., Bryant, C., & McClements, D. J. (2000).** Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1593-1597.
- Kuo, T. M., Lowell, C. A., & Smith, P. T. (1997).** Changes in soluble carbohydrates and enzymic activities in maturing soybean seed tissues. *Plant Science* **125**, 1-11.

Kwok, K. C., & Niranjana, K. (1995). Review: Effect of thermal processing on soymilk. *International Journal of Food Science & Technology* **30**, 263-295.

Kwok, K. C., Liang, H.-H., & Niranjana, K. (2002). Optimizing conditions for thermal processes of soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4834-4838.

Kwok, K. C., MacDougall, D. B., & Niranjana, K. (1999). Reaction kinetics of heat-induced colour changes in soymilk. *Journal of Food Engineering* **40**, 15-20.

Kwok, K. C., Shiu, Y. W., Yeung, C. H., & Niranjana, K. (1998). Effect of thermal processing on available lysine, thiamine and riboflavin content in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**, 473-478.

Lacroix, N., Fliss, I., & Makhlouf, J. (2005). Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. *Food Research International*, **38**, 569-576.

Lakshmanan, R., de Lamballerie, M., & Jung, S. (2006). Effect of soybean-to-water ratio and pH on pressurized soymilk properties. *Journal of Food Science* **71**, E384-E391.

Lanciotti, R., Vannini, L., Pittia, P., & Guerzoni, M. (2004a). Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. *Food Microbiology* **21**, 753-760.

Lanciotti, R., Chaves-López, C., Patrignani, F., Paparella, A., Guerzoni, M. E., Serio, A., & Suzzi, G. (2004b). Effects of milk treatment with dynamic high pressure on microbial populations, and lipolytic and proteolytic profiles of crescenza cheese. *International Journal of Dairy Technology* **57**, 19-25.

Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., & Guerzoni, M. E. (1996). Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letters in Applied Microbiology* **22**, 165-168.

Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Angelini, P., & Guerzoni, M. E. (1994). Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **18**, 319-322.

- Lee, S. Y., Morr, C. V., & Seo, A. (1990).** Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *Journal of Food Science* **55**, 532-536.
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2003).** Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: Effect of heating temperature and incubation. *Journal of Texture Studies* **34**, 515-536.
- Lin, M. Y., & Yen, Ch-L. (1999).** Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1460-1466.
- Liu, K. (1999).** *Soybeans: Chemistry, technology and utilization*. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland USA.
- Liu, Z-S., Chang, S. K. C., Li, L-T., & Tatsumi, E. (2004).** Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties. *Food Research International* **37**, 815-822.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1998).** Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, **30**, 529-542.
- Ludikhuyze, L., VandenBroeck, I., Weemaes, C., & Hendrickx, M. (1998b).** Effect of combined pressure and temperature on soybean lipoxygenase. 1. Influence of extrinsic and intrinsic factors on isobaric-isothermal inactivation kinetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4074-4080.
- MacLeod, G., & Ames, J. (1988).** Soy flavor and its improvement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **27**, 219.
- Matoba, T., Hidaka, H., Kitamura, K., Kaizuma, N., & Kito, M. (1985).** Contribution of hydroperoxide lyase activity to n-hexanal formation in soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 856-858.
- Messina, M. (1999).** Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition* **70**, 439S-450S.
- Min, S., Yu, Y., Yoo, S., & Martin, S. S. (2005b).** Effect of soybean varieties and growing locations on the flavor of soymilk. *Journal of Food Science* **70**, C1-C11.

Ministerio de la presidencia. (Jun. 6, 2002). Norma de calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado*. Núm. 135, 20259.

Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids* 15, 263-269.

Moroni, O., Jean, J., Autret, J., & Fliss, I. (2002). Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal* 12, 907-913.

Mullin, W. J., Fregeau-Reid, J. A., Butler, M., Poysa, V., Woodrow, L., Jessop, D.B., & Raymond, D. (2001). An interlaboratory test of a procedure to assess soybean quality for soymilk and tofu production. *Food Research International* 34, 669-677.

Murti, T. W., Bouillanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. J. (1992). Bacterial growth and volatile compounds in yoghurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* ssp. *Journal of Food Science* 00, 153-157.

Nielsen, N. (1985). The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62, 1680-1686.

Nik, A. M., Tosh, S., Poysa, V., Woodrow, L., & Corredig, M. (2008). Physicochemical characterization of soymilk after step-wise centrifugation. *Food Research International* 41, 286-294.

Nsofor, L. M., & Chukwu, E. U. (1992). Sensory evaluation of soy milk-based yogurt. *Journal of Food Science and Technology* 29, 301-304.

Oguntunde, A.O., & Akintoye, O. A.(1991). Measurement and comparison of density, specific heat and viscosity of cow's milk and soymilk. *Journal of Food Engineering* 13, 221-230.

Omogbai, B.A., Ikenebomeh, M. J., & Ojeaburu, S. I. (2005). Microbial utilization of stachyose in soymilk yogurt production. *African Journal of Biotechnology* 4, 905-908.

- Ono, T., Choi, M. R., Ikeda, A., & Odagiri, S. (1991).** Changes in the composition and size distribution of soymilk protein particles by heating. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**, 2291-2297.
- Ono, T., Takeda, M., & Shuntang, G. (1996).** Interaction of protein particles with lipids in soybean milk. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **60**, 1165-1169.
- Paquin, P. (1999).** Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *International Dairy Journal* **9**, 329-335.
- Peñalvo, J.L., Castilho, M.C., Silveira, M. I. N., Matallana, M.C., & Torija, M.E. (2004).** Fatty acid profile of traditional soymilk. *European Food Research and Technology* **219**, 251-253.
- Pereda, J., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2006).** Effect of ultra high-pressure homogenisation on natural-occurring micro-organisms in bovine milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International* **61**, 245-248.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007).** Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk. *Journal of Dairy Science* **90**, 1081-1093.
- Pereda, J., Jaramillo, D. P., Quevedo, J. M., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2008a).** Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal*, **18**, 826-834.
- Pereda, J., Ferragut, V., Buffa, M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2008b).** Proteolysis of ultra-high pressure homogenised treated milk during refrigerated storage. *Food Chemistry* **111**, 696-702.
- Pereda, J., Ferragut, V., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2008c).** Effects of ultra-high-pressure homogenization treatment on the lipolysis and lipid oxidation of milk during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 7125-7130.

Perrier-Cornet, J. M., Marie, P., & Gervais, P. (2005). Comparison of emulsification efficiency of protein-stabilized oil-in-water emulsions using jet, high pressure and colloid mill homogenization. *Journal of Food Engineering* **66**, 211-217.

Picart, L., Thiebaud, M., Rene, M., Guiraud, J. P., Cheftel, J. C., & Dumay, E. (2006). Effects of high pressure homogenisation of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. *Journal of Dairy Research* **73**, 454-463.

Popper, L., & Knorr, D. (1990). Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology* **44**, 84-89.

Prawiradjaja, S. (2003). Process optimization for solid extraction, flavor improvement and fat removal in the production of soymilk from full fat soy flakes. Thesis Master Iowa State University, Ames Iowa.

Robinson, D., Wu, Z., Domoney, C., & Casey, R. (1995). Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chemistry* **54**, 33-43.

Rochat, T., Gratadoux, J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., & van de Guchte, M. (2006). Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: An efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5143-5149.

Roesch, R., & Corredig, M. (2003). Texture and microstructure of emulsions prepared with soy protein concentrate by high-pressure homogenization. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie* **36**, 113-124.

Rosenthal, A., Deliza, R., Cabral, L. M. C., Cabral, L. C., Farias, C. A. A., & Domingues A. M. (2003). Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. *Food Control*. **14**, 187-192.

Saio, K. (1979). Tofu-relationships between soybean components and tofu texture. *Cereal Food World* **24**, 343- 347.

- Saito, M., Kudo, H., & Mandarino, J. M. G. (2004).** Effect of variety and cultivating region on the color of soymilk and other soybean processing. *Japan Agricultural Research Quarterly* **30**, 179-184.
- Saldo, J., McSweeney, P. L. H., Sendra, E., Kelly, A. L., Guamis, B. (2002).** Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal* **12**, 35-44.
- Sanches-Silva, A., Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P. (2004).** Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1046**, 75-81.
- Sanderson, G. R. (1990).** Gellan gum. En: Food gels. Editores: Harris, P. Elsevier Applied Science. London and New York. pp. 201-231.
- Sandra, S., & 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**, 1095-1104.
- Sandra, S., & Dalgleish, D. G. (2007).** The effect of ultra high-pressure homogenization (UHPH) on rennet coagulation properties of unheated and heated fresh skimmed milk. *International Dairy Journal* **17**, 1043-1052.
- Sangwan, N. K., Gupta, K., & Dhindsa, K. S. (1986).** Fatty acid composition of developing soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**, 415-417.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007).** Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal* **17**, 782-790.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Ferragut, V. (2008a).** Ultra-high pressure homogenization-induced changes in skim milk: Impact on acid coagulation properties. *Journal of Dairy Research* **75**, 69-75.
- Serra, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2008b).** Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high

pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*, **In Press, Accepted Manuscript**.

Serra, M., Trujillo, A. J., Pereda, J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2008c). Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, **In Press, Accepted Manuscript**.

Sheard, P. R., Enser, M., Wood, J. D., Nute, G. R., Gill, B. P., & Richardson, R. I. (2000). Shelf life and quality of pork and pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science* **55**, 213-221.

Shiraiwa, M., Harada, K., & Okubo, K. (1991). Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity. *Agricultural and Biological Chemistry*. **55**, 323-331.

Smiddy, M. A., Martin, J-E., Huppertz, T., & Kelly, A. L. (2007). Microbial shelf-life of high-pressure-homogenised milk. *International Dairy Journal* **17**, 29-32.

Sorgentini, D. A., Wagner, J. R., & Anon, M. C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2471-2479.

Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* **8**, 311-317.

Subirade, M., Loupil, F., Allain, A., & Paquin, P. (1998). Effect of dynamic high pressure on the secondary structure of β -lactoglobulin and on its conformational properties as determined by fourier transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal* **8**, 135-140.

Tahiri, I., Makhlof, J., Paquin, P., & Fliss, I. (2006). Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. *Food Research International* **39**, 98-105.

Tamime, A.Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications - a review. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**, S2-S15.

- Thanh, V. H., Okubo, K., & Shibasaki, K. (1975).** Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean protein. *Plant Physiology* **56**, 19-22.
- Thiebaud, M., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J. P., & Cheftel, J. C. (2003).** High-pressure homogenisation of raw bovine milk. effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal* **13**, 427-439.
- Thomas, R., deMan, J., & deMan, L. (1989).** Soymilk and tofu properties as influenced by soybean storage conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **66**, 777-782.
- Toda, K., Chiba, K., & Ono, T. (2007).** Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. *Journal of Food Science* **72**, C108-C113.
- Torres-Penaranda, A. V., & Reitmeier, C. A. (2001).** Sensory descriptive analysis of soymilk. *Journal of Food Science* **66**, 352-356.
- Torres-Penaranda, A. V., Reitmeier, C. A., Wilson, L. A., Fehr, W. R., & Narvel, J. M. (1998).** Sensory characteristics of soymilk and tofu made from lipoxygenase-free and normal soybeans. *Journal of Food Science* **63**, 1084-1087.
- Trachoo, N. (2002).** Yogurt: The fermented milk. *Songklanakarin Journal of Science Technology* **24**, 727-737.
- Tsukamoto, Ch., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., & Kitamura, K. (1995).** Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1184-1192.
- USDA. (2007).** World agricultural supply and demand estimates. *World Agricultural Outlook Board*, USA. May 9, 2007.
- Vachon, J. F., Kheard, E. E., Giasson, J., Paquin, P., & Fliss, I. (2002).** Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection* **8**, 345-352.

Van Buren, J.P., Steinkraus, K.H., Hackler, L. R., El Rawi, I., & Hand, D. B. (1964). Heat effects on soymilk, indices of protein quality in dried soymilks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **12**, 524-528.

Van de Guchte, M., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 147-153.

Van der Ven, C., Matser, A. M., & Van den Berg, R. W. (2005). Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by high-pressure processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1087-1092.

Van Vliet, T., Van Dijk, H. J. M., Zoon, P., & Walstra, P. (1991). Relation between syneresis and rheological properties of particle gels. *Colloid & Polymer Science* **6**, 620-627.

Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., & Guerzoni, M. E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 123-135.

Wang, B., Xiong, Y. L., & Wang, Ch. (2001). Physicochemical and sensory characteristics of flavored soymilk during refrigeration storage. *Journal of Food Quality* **24**, 513-526.

Wang, H., & Murphy, P. A. (1994b). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 1674-1677.

Wang, Q., Ke, L., Yang, D., Bao, B., Jiang, J., & Ying, T. (2007). Change in oligosaccharides during processing of soybean sheet. *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition (suppl 1)* 89-94.

Wang, R., Zhou, X., & Chen, Z. (2008). High pressure inactivation of lipoxygenase in soy milk and crude soybean extract. *Food Chemistry* **106**, 603-611.

- Wang, Y-Ch., Yu, R-Ch., Yang, H-Y., & Chou, Ch-Ch. (2003).** Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiology* **20**, 333-338.
- Wang, Y-Ch., Yu, R-C., & Chou, Ch-Ch. (2002).** Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiology* **19**, 501-508.
- Weinbrenner, D. R., Barefoot, S. F., & Grinstead, D. A. (1997).** Inhibition of yogurt starter cultures by Jensenin G, a *Propionibacterium* bacteriocin. *Journal of Dairy Science* **80**, 1246-1253.
- Westhoff, D. C. (1981).** Microbiology of ultrahigh temperature milk. *Journal of Dairy Science*. **64**, 1667-173.
- Wilkens, W. F., Mattick, L. R., & Hand, D. B. (1967).** Effect of processing method on oxidative off-flavor of soybean milk. *Food Technology* **21**, 86-89.
- Wilkens, W., & Lin, F. (1970).** Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **18**, 333-336.
- Wolf, W. J. (1970).** Soybean Proteins: Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **18**, 969-976.
- Wolf, W. J. (1975).** Lipoxygenase and flavor of soybean protein products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**, 136-141.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. J., & Michiels, C. W. (2002).** Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 205-212.
- Wuytack, E., Phuong, L. D. T., Aertsen, A., Reyns, K. M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Opstal, I. V., Diels, A. M. J., & Michiels, C. W. (2003).** Comparison sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of Food Protection* **66**, 31-37.

Yazici, F., Alvarez, V.B., & Hansen, P.M.T. (1997). Fermentation and properties of calcium-fortified soy milk yogurt. *Journal of Food Science* **62**, 457-461.

Yoshiki, Y., Kudou, S. & Okubo, K. (1998). Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 2291-2299.

Yuan, S., & Chang, S. K. C. (2005). Off-flavor compounds in soymilk as affected by soybean variety and processing methods. *IFT Annual Meeting*.

Yuan, S., & Chang, S. K-C. (2007a). Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 426-431.

Zamora, A., Ferragut, V., Jaramillo, P. D., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2007). Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk. *Journal of Dairy Science* **90**, 13-23.

Zarkadas, C. G., Yu, Z., Voldeng, H. D., & Minero-Amador, A. (1993). Assessment of the protein quality of a new high-protein soybean cultivar by amino acids analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 616-623.

Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E., & Isobe, S. (2005). High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **38**, 7-14.

Zhang, H., Takenaka, M., & Isobe, S. (2004). DSC and electrophoretic studies on soymilk protein denaturation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **75**, 719-726.

Zourari, A., Accolas, J. P., & Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria - a review. *Lait* **72**, 1-34.