



Effect of the high hydrostatic pressure on aromatic profiles and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in mango nectar

Efecto de la alta presión hidrostática sobre la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 y el perfil aromático en néctar de mango

Calderón-Santoyo, M.¹, López-Quintana, G. D.¹, Ramírez-de-León, J. A.², Jiménez-Sánchez, D. E.¹, Ragazzo-Sánchez, J. A.^{1*}.

¹Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico 2595 C. P. 63175, Tepic, Nayarit Mexico

²Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, UAM Reynosa Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Reynosa, Tamaulipas, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Calderón-Santoyo, M., López-Quintana, G. D., Ramírez-de-León, J. A., Jiménez-Sánchez, D. E., Ragazzo-Sánchez, J. A. (2019). Effect of the high hydrostatic pressure on aromatic profiles and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in mango nectar. *Revista Bio Ciencias* 6, e709. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e709>



ABSTRACT

Ataulfo mango (*Mangifera Indica* L.) is one of the tropical fruits with highest demand due to its nutritional composition and characteristic flavor. However, losses of processed products, due to the presence of bacteria such as *Escherichia coli* O157:H7, are usually large. *E. coli* has been considered one of the 10 major pathogens concerned in foods. The use of high hydrostatic pressure technology in the processing of mango nectar would enable to obtain a safety product. The pathogen *Escherichia coli* O157:H7 was inoculated at 1×10^6 CFU/mL in mango nectar. The inoculated samples were then subjected to high hydrostatic pressure (150, 200 and 250 MPa) for 0, 10 and 20 min at 25, 35 and 45 °C. *E. coli* showed more resistance to high hydrostatic pressure at 25 °C than at 35 or 45 °C. Complete *E. coli* inactivation was observed at 150 MPa, 35 y 45 °C

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 22nd 2019.

Accepted/Aceptado: August 30th 2019.

Available on line/Publicado: September 2nd 2019.

RESUMEN

El mango Ataulfo (*Mangifera Indica* L.) es una de las frutas tropicales con mayor demanda debido a su composición nutricional y característico sabor. Sin embargo, existen elevadas pérdidas de productos procesados, debido a la presencia de bacterias como *Escherichia coli* O157:H7, considerada una de los 10 patógenos de interés mundial presente en los alimentos. El uso de la tecnología de altas presiones hidrostáticas en el procesamiento del néctar de mango permitiría obtener un producto con mayor inocuidad. El patógeno *Escherichia coli* O157:H7 se inoculó en néctar de mango a una concentración de 1×10^6 CFU/mL. Las muestras inoculadas se sometieron a la alta presión hidrostática (150, 200 y 250 MPa) por 0, 10 y 20 min, a 25, 35 y 45 °C. *E. coli* mostró una mayor resistencia a la alta presión a 25 °C en comparación con 35 y 45 °C. La completa inactivación de la bacteria, se observó en las muestras tratadas a 150 MPa con 35 y 45 °C en el día cero (día del tratamiento) y a 200 MPa y 35 °C en el día cero y los siguientes 6 días de almacenamiento. La identificación y cuantificación del perfil aromático se determinó por microextracción en fase sólida (SPME). Se observó una

*Corresponding Author:

Ragazzo Sánchez, J. A. Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico 2595 C. P. 63175, Tepic, Nayarit Mexico. Phone +52(311) 211 9400 Ext. 230. E-mail: arturoragazzo@hotmail.com

on day zero (day of treatment) and at 200 MPa, 35 °C on day zero and after 6 days of storage. Identification and quantification of chemical species by solid phase microextraction (SPME) of aromatic profiles of untreated and pressurized mango nectar was carried out. It was observed a reduction with the application of temperature in both, ethanol and α -Pimene concentration, in counterpart β -myrcene and 3-carene were not affected. The pH and total soluble solids showed no significant difference ($p < 0.05$) with the pressure treatments. The treatment by high pressures allowed the complete inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 without causing a negative effect on the aromatic profile of mango nectar.

KEY WORDS

Nectar, Mango, High Hydrostatic Pressure, aromatic compounds, *Escherichia coli*.

Introduction

Mexico is one of the top leaders in mango production. Around 193.343 thousand hectares for cultivation have been established. In 2018, Mexico reported total production of 2 million tons of mango with an income of 3,992 million pesos. Exports represent an annual income of 155 million dollars (SAGARPA, 2018). Moreover, mango contains phenolic compounds and carotenoids that have been linked to beneficial effects against noncommunicable diseases due to its antioxidant activity (AOA) against free radicals such as hydroxyl, superoxide and singlet oxygen (Mesa-Vanegas *et al.*, 2010). However, mango fruits are only available for a short period because it is seasonal and perishable, which is why large post-harvest and economic losses are generated. The current market demands processed foods with nutritional and sensorial properties similar to fresh foods. The use of thermal technologies causes a significant loss of nutrients and flavors, affecting the organoleptic quality of the final product (Zhao *et al.*, 2013). Therefore, the food industry is looking for new preservation technologies to guarantee food safety and avoid negative changes in sensory, nutritional, physicochemical and antioxidant characteristics. Currently, non-thermal technologies are being developed for food processing, such as high

disminución en la concentración de etanol y α -pimeno al aplicar mayor temperatura. Con respecto a β -mirceño y 3-careno no hay diferencia significativa respecto al jugo fresco. El pH y los sólidos solubles no presentaron cambios significativos ($p < 0.05$) al aplicarse los tratamientos de alta presión hidrostática. El tratamiento por altas presiones permitió la inactivación completa de *Escherichia coli* O157:H7 sin causar un efecto negativo sobre el perfil aromático del néctar de mango.

PALABRAS CLAVE

Néctar, *Mangifera Indica*, Altas presiones hidrostáticas, compuestos aromáticos, *Escherichia coli*.

Introducción

El mango es una de los frutos de mayor producción en México. Se tienen establecidas 193.343 miles de hectáreas para el cultivo, el volumen y el valor de su producción en 2018 fue de 2 millones de ton y 3,992 millones de pesos respectivamente. Solamente la actividad exportadora representa anualmente un ingreso de 155 Millones de dólares (SAGARPA, 2018). Además, el mango contiene vitaminas compuestos fenólicos y carotenoides que se han relacionado con efectos beneficiosos contra enfermedades no transmisibles, debido a su actividad antioxidante (AOA) contra radicales libres como hidroxilo, superóxido y oxígeno singlete (Mesa-Vanegas *et al.* 2010). Sin embargo, es un fruto que sólo se encuentra disponible por un periodo corto por ser estacional y perecedero, razón por la que se generan grandes pérdidas poscosecha y en consecuencia pérdidas económicas. El mercado actual demanda alimentos procesados con tecnologías que permitan la conservación de sus propiedades nutricionales y sensorialmente semejantes a los alimentos frescos. Los procesos tradicionales, en su mayoría térmicos, provocan una pérdida significativa de nutrientes y sabores afectando la calidad organoléptica del producto final (Zhao *et al.*, 2013). Por lo que, la industria alimentaria está buscando nuevas tecnologías de preservación para garantizar la seguridad y evitar cambios negativos en las características sensoriales, nutricionales, fisicoquímicas y antioxidantes. Actualmente, se desarrollan tecnologías no térmicas para el procesamiento de alimentos, como la alta presión hidrostática (HHP), la cual está teniendo una gran aceptación debido a que sólo modifica mínimamente la calidad de los alimentos (Oey *et al.*, 2008). Esta tecnología se rige bajo los principios de Le Chatelier e isostático, basada en métodos físicos, sin requerir

hydrostatic pressure (HHP). This technology has great acceptance because food quality is minimally modified (Oey *et al.*, 2008). It is based on physical methods on the principles of Le Chatelier and isostatic, without requiring high temperatures. HHP consists of applying high pressure to solids or liquid foods, where the fluid transmitter is usually water. Originally, HHP was used to inactivate microorganisms, since it has an effect on cell morphology, modifies enzymatic reactions and can affect the genetic mechanisms of microbial cells without altering the sensory quality or nutrients of food (Cheftel, 1995). Other factors such as the composition of the food matrix, water activity, and pH affect or enhance the effect of HHP. The microorganisms are more susceptible in a non-nutritive medium than in an enriched one, which exerts a protective effect due to the presence of proteins and vitamins as nutrients, as well as a higher viscosity (Reyes *et al.*, 2011). Citrus juices were the first products subjected by HHP. The acid pH facilitates the destruction of microorganisms and avoids spore germination after treatment. The process with HHP, unlike thermal processes, allows preserving the taste of fresh juice and its nutritional content (Ferrari *et al.*, 2010). The use of HHP up to 400 MPa is increasing in the food industry since it can be used as an alternative to traditional methods such as sterilization or pasteurization (Raventós-Santamaría, 2005). The potential use of HHP in biotechnological processes has been reported (Rivalain *et al.*, 2010), specifically to decrease and/or eliminate enzymatic activity (Huang *et al.*, 2013), microbial (Klotz *et al.*, 2010) as well as to stabilize food (Jacobo-Velázquez *et al.*, 2012). The use of HHP has been reported in fruit juices such as passion fruit (Laboissière *et al.*, 2007), cucumber (Zhao *et al.*, 2013), apple (Moody *et al.*, 2014) and in mango juices for the destruction of *Escherichia coli* O157: H7 and some enzymes (Hiremath & Ramaswamy, 2012; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2011). The quality of food products is affected by the inactivation or activation of some enzymes by using HPP. For example, *E. coli* dehydrogenases are completely inactivated when 100 MPa for 15 min at 27 °C is applied, while the activity of the aspartase of this bacterium increases at 680 MPa (Téllez-Luis *et al.*, 2011). Hendrickx *et al.* (1998) grouped in two the HHP effects on the enzymes: relatively low pressures, 100 MPa that activate some enzymes, fundamentally those of monomeric type, and high pressures >600 MPa, which provoke enzymatic inactivation.

altas temperaturas. El tratamiento por altas presiones consiste en someter al alimento a una elevada presión, siendo el fluido transmisor de la misma generalmente agua. Originalmente, la HHP se empleó para inactivar microorganismos, dado que tiene efecto sobre la morfología celular, modifica reacciones enzimáticas y puede afectar mecanismos genéticos de las células microbianas, sin alterar la calidad sensorial ni los nutrientes de los alimentos (Cheftel, 1995). Existen otros factores que afectan o potencian el efecto de las altas presiones, como la composición de la matriz alimentaria, la actividad de agua y pH de la misma. Los microorganismos son más susceptibles en un medio no nutritivo que en uno enriquecido, el cual ejerce un efecto protector debido a la presencia de proteínas y vitaminas como nutrientes, así como una mayor viscosidad (Reyes *et al.*, 2011). Los jugos de cítricos fueron los primeros productos tratados por las altas presiones, su pH ácido facilita la destrucción de microorganismos y evita la germinación de esporas después del tratamiento. El proceso con altas presiones, a diferencia de los procesos térmicos, permiten conservar el sabor del jugo fresco y su contenido nutricional (Ferrari *et al.*, 2010). La posibilidad de estabilizar productos alimentarios ácidos mediante el tratamiento con altas presiones isostáticas hasta los 400 MPa, está incrementando el interés particular en la conservación de alimentos, como una alternativa a los métodos tradicionales de esterilización o pasteurización (Raventós-Santamaría, 2005). Se ha reportado el uso potencial de la HHP en procesos biotecnológicos (Rivalain *et al.*, 2010), específicamente para disminuir y/o eliminar la actividad enzimática (Huang *et al.*, 2013), microbiana (Klotz *et al.*, 2010), así como estabilizar alimentos (Jacobo-Velázquez & Hernández-Brenes., 2012). Actualmente, se han reportado diversos estudios en jugos de frutas tales como fruta de la pasión (Laboissière *et al.*, 2007), pepino (Zhao *et al.*, 2013), manzana (Moody *et al.*, 2014); en jugos de mango para destrucción de *Escherichia coli* O157: H7 y algunas enzimas (Hiremath & Ramaswamy, 2012; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2011). Se ha observado que algunas enzimas se inactivan con las HHP, mientras que otras se activan, repercutiendo en la calidad de los productos alimentarios. Por ejemplo, las deshidrogenasas de *E. coli* se inactivan completamente cuando se someten a presiones de 100 MPa durante 15 min a 27 °C, mientras que la actividad de la aspartasa de esta bacteria se incrementa a 680 MPa (Téllez-Luis *et al.*, 2011). Hendrickx *et al.* (1998) agrupan en dos los efectos de la HHP sobre las enzimas: presiones relativamente bajas, del orden de 100 MPa que activan algunas enzimas, fundamentalmente las de tipo monomérico, y presiones altas >600 MPa, que provocan inactivación enzimática.

On the other hand, fresh unpasteurized fruit and vegetable juices are considered as a rising vehicle of foodborne diseases (Parish, 1997). In the absence of a specific pathogen-product association, the National Advisory Committee on Microbiological Criteria in Foods (NACMCF) (Buchanan, 1997) recommends the use of *Escherichia coli* O157:H7 or *Listeria monocytogenes* as reference organisms in the processing of juices, because they are the most difficult organisms to control due to their resistance to the acidity of the juice and limited heat lethality. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the inactivation of *E. coli* in mango nectar applying HHP as well as to evaluate the effect of this unit operation on the main aromatic profile compounds and some physicochemical parameters with the purpose of optimizing the process for obtaining mango nectar.

Material and Methods

Nectar obtention

In order to elaborate the nectar, mango (*Mangifera indica* L.) 'Ataulfo' variety in consumption maturity was used. Fruits were disinfected and blanched to inactivate enzymes such as polyphenol oxidase, peroxidase, polygalacturonase, and catalase. The pulp was standardized with water in the proportion established by the Codex Alimentarius (25 % v/v) and carrying out a Regularization of Sugar (RA) at 13.5° Brix (Eq. 1).

$$RA = \frac{(Kg \text{ Initial pulp}) \times (^\circ\text{Brix Final} - ^\circ\text{Brix Initial})}{(100 - ^\circ\text{Brix Initial})} \quad \text{Eq. 1}$$

Nectar was stored at -20 °C in order to ensure the conservation of the product.

Inoculum Preparation

Escherichia coli O157: H7 ATCC 25922 resistant to rifampicin, isolated and previously studied by Castro-Rosas *et al.* (2012) was donated to Instituto Tecnológico de Tepic. The strain was activated on trip-casein soy agar added with rifampicin at 100 mg/L and incubated for 48 h at 35 °C. Dilutions were performed to obtain 1x10⁶ CFU/mL using the Neubauer chamber.

HHP treatment

100 mL of the inoculated nectar was packed

Por otra parte, los jugos frescos de frutas y verduras no pasteurizados, son considerados como un vehículo ascendente de enfermedades transmitidas por los alimentos (Parish, 1997). En ausencia de una asociación específica patógeno-producto, el National Advisory Committee on Microbiological Criteria in Foods (NACMCF) (Buchanan, 1997) recomienda el uso de *Escherichia coli* O157:H7 o *Listeria monocytogenes* como organismos de referencia en el procesamiento de jugos, debido a que son de los organismos más difíciles de controlar por su resistencia a la acidez del jugo y limitada letalidad al calor. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la inactivación de *E. coli* en néctar de mango tratado con HHP, así como evaluar el efecto de esta operación unitaria sobre los principales compuestos del perfil aromático y algunos parámetros fisicoquímicos, con la finalidad de optimizar el proceso de obtención de néctar de mango.

Material y Métodos

Obtención del néctar

Para elaborar el néctar se utilizó mango (*Mangifera indica* L.) de la variedad Ataulfo en madurez de consumo. Los frutos se desinfectaron y escaldaron para inactivar las enzimas como la polifenoloxidasa, peroxidasa, poligalacturonasa y catalasa. La pulpa resultante se estandarizó con agua en la proporción establecida por el Codex Alimentarios (25 % v/v) y efectuando una Regularización de Azúcar (RA) a 13.5° Brix (Ec. 1).

$$RA = \frac{(Kg \text{ Initial pulp}) \times (^\circ\text{Brix Final} - ^\circ\text{Brix Initial})}{(100 - ^\circ\text{Brix Initial})} \quad \text{Ec. 1}$$

El néctar obtenido se almacenó a -20 °C con el fin de garantizar la conservación del producto para su análisis.

Preparación del inoculo

Escherichia coli O157:H7 ATCC 25922 resistente a rifampicina, aislada y estudiada previamente por Castro-Rosas *et al.* (2012) fue donada al Instituto Tecnológico de Tepic. La cepa se activó en agar soya trip-caseína adicionado con rifampicina a una concentración de 100 mg/L y se incubó durante 48 h a 35 °C. Se realizaron diluciones hasta obtener una concentración de 1x10⁶ CFU/mL, usando la cámara de Neubauer.

Tratamiento de HHP

100 mL de néctar inoculado se envasaron (Bolsas para alto vacío FoodSaver® ROL28), se sellaron al alto

(FoodSaver® ROL28 high vacuum bags), sealed to high vacuum in a V3835 sealing machine (FoodSaver®, USA) and processed in the CIP 42260 isostatic press (Quintus, Technologies, Ohio, USA) according with the protocol reported by Ruiz-Montañez *et al.* (2014). We used a 3³ factorial design. Pressure (150, 200 and 250 MPa), temperature (25, 35 and 45 °C) and residence time (0, 10 and 20 min). The time zero min was considered as the time necessary for the samples to reach the indicated pressure in the HHP equipment (come up time, CUT=2.65 min). After the treatments, samples were stored at 4 °C for 6 days.

Inactivation of *Escherichia coli* 0157: H7

With the aim to determine the inactivation of *E. coli*, the surviving cells were counted after applying HHP. Decimal dilutions were carried out in isotonic solution at 0.85 % NaCl and then plated on ATBS agar added with 100 mg/L of rifampicin. The plates were incubated in triplicate at 35 °C from 24 to 48 h. The inactivation was calculated as the difference between the logarithms of the colony counts of the inoculated samples and the inoculated samples treated ($\log N_0 - \log N$).

Identification and quantification of volatile compounds by SPME-CG-MS

The sample was prepared by placing 10 mL of mango nectar in a 20 mL vial, sealed with a septum and then homogenized with 1 g of NaCl (1:10) on a magnetic stirrer model C-MAG H57. Next, the sample was incubated at 40 °C for 30 min, achieving the first thermodynamic equilibrium between the headspace and the sample. After this time, the solid-phase microextraction fiber was inserted (SPME Fiber Assembly 65 m PDMS/DVB, Fused Silica 24Ga, Manual Holder, 3pk, SUPELCO), exposing it in the headspace inside the vial for 20 min. In this time, a second thermodynamic equilibrium is reached, in which the aromatic compounds adsorbed on the fiber are a representative sample of the contents in the headspace. Finally, the SPME fiber was extracted and immediately inserted into the injection port, exposing the fiber for 4 min for the desorption of the aromas (Solís-Solís *et al.*, 2007). The quantification of mango nectar aromatic compounds was carried out in a gas chromatograph CP-3800 (VARIAN, USA), with manual injection, equipped with a flame ionization detector (FID), fitted with a

vacío en una maquina selladora V3835 (FoodSaver®, USA) y fueron procesadas en la prensa isostática CIP 42260 (Quintus, Technologies, Ohio, USA) de acuerdo con Ruiz-Montañez *et al.* (2014). Se empleó un diseño experimental 3³, presión (150, 200 y 250 MPa), temperatura (25, 35 y 45 °C) y tiempo de residencia (0, 10 y 20 min), el tiempo de 0 min se consideró como el tiempo necesario para que las muestras alcanzaran la presión indicada en el equipo de HHP (come up time, CUT=2.65 min). Después de los tratamientos las muestras se almacenaron a 4 °C durante 6 días para su análisis.

Inactivación de *Escherichia coli* 0157:H7

Para determinar la inactivación de *E. coli* se realizó el recuento de las células sobrevivientes después de aplicar los tratamientos por HHP. Se realizaron diluciones decimales en solución isotónica al 0.85 % de NaCl, subsecuentemente, la siembra de las diluciones se realizó en agar ATBS con 100 mg/L de rifampicina. Las placas se incubaron por triplicado a 35 °C de 24 a 48 h, para cada tratamiento. La inactivación fue calculada como la diferencia entre los logaritmos de los recuentos de las colonias de las muestras inoculadas y las muestras inoculadas tratadas ($\log N_0 - \log N$).

Identificación y cuantificación de los compuestos volátiles por SPME-CG-MS

La muestra se preparó colocando 10 mL de néctar de mango en un vial con capacidad de 20 mL, mismo que se selló con un septum, después se homogeneizó con 1g de NaCl (1:10) en un agitador magnético modelo C-MAG H57, incubado a una temperatura de 40 °C durante 30 min, logrando el primer equilibrio termodinámico entre el espacio de cabeza y la muestra. Después de este tiempo, se insertó la fibra de microextracción en fase sólida (SPME Fiber Assembly 65 μ m PDMS/DVB, Fused Silica 24Ga, Manual Holder, 3pk, SUPELCO), exponiéndola en el espacio de cabeza dentro del vial durante 20 min. Experimentalmente en este tiempo se alcanza un segundo equilibrio termodinámico, en el cual los compuestos aromáticos adsorbidos en la fibra, son una muestra representativa de los contenidos en el espacio de cabeza. Finalmente, se extrajo la fibra de SPME e inmediatamente se insertó en el puerto de inyección, exponiendo la fibra durante 4 min para la desorción de los aromas (Solís-Solís *et al.*, 2007). La cuantificación de los compuestos aromáticos del néctar de mango, se realizó en un cromatógrafo de gases CP-3800 (VARIAN, USA), con inyección manual, equipado con un detector de ionización a la flama (FID), provisto de una columna capilar de sílica

capillary column WCOT fused silica, 3000 x 0.25 mm, covered with CP-SIL 5CB (thickness 25 μm). Nitrogen was used as a carrier gas with a flow rate of 1 mL/min. The operating conditions of the gas chromatograph were as follows: 250 °C injector temperature, initial oven temperature 40 °C increasing to 200 °C at a heating rate of 3 °C/min. Subsequently, the temperature was increased again up to 230 °C, with a heating rate of 5 °C/min as previously reported by Solís-Solís *et al.* (2007).

The identification of the aromatic compounds was performed in a gas chromatograph 7890A (Agilent Technologies, California, USA); coupled to a 240 Ion Trap GC/MS mass spectrum (Agilent Technologies, California, USA), using helium as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min and an RFX-SSil MS column (3000 x 0.25mm Dlx0.25 μm Film). The transfer line was preserved at 250 °C; the mass spectra were scanned at 70 eV in the m/z range of 60 - 600 mass units. The injection was done manually using the SPME fiber. Volatile compounds were identified by comparing the linear retention rates and the mass spectrum data with data from the literature and with the data bank (NIST/49 K Mass Spectral Database, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA USA and Mass Spectral Data Record with Structures, Wiley 6.1, NY, USA).

Physicochemical characterization

The total soluble solids (SST) were measured with a digital refractometer NAR-T1 (ATAGO, USA). Hydrogen Potential (pH) was measured using a pH meter HI18653 (Hanna, Italy). All measurements were made in triplicate.

Sensory analysis

Sensory analysis was performed with 26 untrained judges using a triangular preference test (Pedrero & Pang, 1997). The data were analyzed using an ANOVA and SAS system software version 10.0 ($p > 0.05$).

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA with a 5 % significance level using SAS system version 10.0 under a randomized block design. Process optimization was carried out with the response surface technique using the Statgraphics® plus 4.0 software.

fundida WCOT, de 3000 x 0.25 mm, cubierta con CP-SIL 5CB (espesor 25 μm). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 1mL/min. Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases, de acuerdo a Solís-Solís *et al.* (2007) fueron; temperatura del inyector 250 °C, temperatura inicial del horno 40 °C aumentando hasta 200 °C a una velocidad de 3 °C/min, posteriormente, se aumentó nuevamente hasta alcanzar 230 °C, con una velocidad de 5 °C/min.

La identificación de los compuestos aromáticos se realizó en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, California, USA); acoplado a un espectro de masas 240 Ion Trap GC/MS (Agilent Technologies, California, USA), utilizando helio como gas portador a un flujo 1 mL/min y una columna RFX-SSil MS (3000 x 0.25mm Dlx0.25 μm Film), la línea de transferencia se mantuvo a 250 °C, los espectros de masas se escanearon a 70 eV en el rango m/z de 60 - 600 unidades de masas. La inyección se realizó manualmente mediante la fibra SPME. Los compuestos volátiles se identificaron mediante la comparación de los índices de retención lineal y los datos del espectro de masas con datos de la literatura y con el banco de datos (NIST/49 K Mass Spectral Database, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA EE.UU. y Registro de datos espectrales de masas con Structures, Wiley 6.1, NY, EE. UU.).

Caracterización fisicoquímica

Los sólidos solubles totales (SST) se midieron con un refractómetro digital NAR-T1 (ATAGO, USA) el cual previamente se calibró con agua destilada. El Potencial de hidrogeno (pH) se midió utilizando un pH-metro HI18653 (Hanna, Italia). Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó con 26 jueces no entrenados empleando una prueba de preferencia triangular (Pedrero & Pang, 1997). Los datos fueron analizados usando un ANOVA y software SAS system versión 10.0 ($p < 0.05$).

Análisis estadístico de resultados

El análisis de los datos se realizó mediante un ANOVA con un diseño de bloques aleatorizados utilizando el software estadístico SAS system versión 10.0 ($p < 0.05$). La optimización del proceso se realizó con la técnica de superficie de respuesta con el software Statgraphics® plus 4.0.

Results

Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 by HHP

The logarithmic reduction values of *E. coli* in pressurized mango nectar stored at 4 °C for 6 days showed a directly proportional relationship between the pressure and the lethality of the bacteria (Table 1). At 250 MPa, a greater logarithmic reduction is obtained in comparison with the treatments at 200 and 150 MPa ($p < 0.05$). HHP induces changes in the cell, the main damage occurs on the cell membrane, structure responsible for regulating the entry and exit of nutrients, and constituted by lipids that are particularly sensitive to the effects of pressure, but more resistant than proteins (Vázquez-Gutiérrez et al., 2011). The increase in pressure augments the order of the hydrocarbon

Resultados

Inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 por HHP

Los valores de reducción logarítmica de *E. coli* en las muestras de néctar de mango presurizadas y almacenadas a 4 °C durante 6 días, demuestran que a mayor presión existe mayor letalidad de la bacteria (Tabla 1). A 250 MPa se obtiene una mayor reducción logarítmica con respecto a los tratamientos a 200 y 150 MPa ($p < 0.05$). La HHP induce cambios en la célula, el principal daño se presenta sobre la membrana celular, estructura encargada de regular la entrada y salida de nutrientes, y constituida por lípidos que son particularmente sensibles a los efectos de la presión, pero más resistentes que las proteínas (Vázquez-Gutiérrez et al., 2011). El aumento de la presión incrementa el orden de las cadenas de hidrocarburos, así

Table 1.
Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 (Log CFU/mL) in mango nectar treated by high hydrostatic pressures and stored at 4 °C.

Table 1.
Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 (Log CFU/mL) in mango nectar treated by high hydrostatic pressures and stored at 4 °C.

Pressure		Temperature								
		25 °C			35 °C			45 °C		
		0 min	10 min	20 min	0 min	10 min	20 min	0 min	10 min	20 min
150MPa	Day 0	2.8	3.96	4.1	6	6	6	6	6	6
	Day 2	3.5	3.01	3.5	5.5	5	5.5	6	6	6
	Day 4	3.5	2.57	3.6	5.2	5	5.2	6	6	6
	Day 6	3.2	2.44	3.3	5.2	5	5.2	6	6	6
200MPa	Day 0	3.9	4.46	4.3	6	6	6	6	6	6
	Day 2	3.8	3.95	4.3	6	6	6	6	6	6
	Day 4	3.8	4.23	4.6	6	6	6	6	6	6
	Day 6	3.7	3.93	4.4	6	6	6	6	6	6
250MPa	Day 0	4.7	6	6	6	6	6	6	6	6
	Day 2	4	6	6	6	6	6	6	6	6
	Day 4	4	6	6	6	6	6	6	6	6
	Day 6	4	6	6	6	6	6	6	6	6

chains, as well as the phase transition temperature of the membrane in the gel state to the liquid crystalline state (Bartlett, 2002).

The Food and Drug Administration (FDA) has proposed a reduction of 5-log in pathogenic microorganisms (move to discussion). In this study, using 150 MPa at 45 °C *E. coli* (6 Log) was completely inactivated. The same inhibition was accomplished using 200 MPa at 35 °C. 250 MPa at 25 °C for 10 min completely inactivate *E. coli*. These results satisfy the parameters established by the FDA. The statistical analysis for logarithmic reduction indicated that time, temperature and pressure significantly affect the inhibition process ($p < 0.05$).

On the day of processing (storage time 0), the effect of 150, 200 and 250 MPa pressures at room temperature showed different levels of inactivation. In the range from 20 to 180 MPa, microbial growth is delayed, and protein synthesis is also inhibited. The loss viability of the cells starts from pressures of approximately 180 MPa, once this pressure increases, the rate of inactivation increases exponentially. Damage to the integrity of the membrane and the denaturation of a protein is observed when higher pressures are applied (Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2011). It should be noted that the different effects exerted by HHP on microorganisms directly depend on the stage of development in which they are since cells in logarithmic phase have a greater sensitivity to treatment by HHP than those in stationary phase. Mañas & Mackay (2004) observed this behavior using *Escherichia coli* J1 strain in an exponential and stationary phase. Several cellular modifications were also observed such as aggregation of cytoplasmic proteins and condensation of the nucleotides when the pressures were equal or greater than 200 MPa. This may be due to the microorganisms being in cell division during the logarithmic phase and therefore, the membrane is more sensitive to external factors (Ayvaza *et al.*, 2012).

The irreversible protein denaturation under pressure greater than 300 MPa corresponds to the range of pressure necessary to inactivate vegetative cells (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014). In this study, temperatures of 35 and 45 °C were applied (moderate temperatures) to diminish the possibilities of survival of the microorganism. In addition, it has been reported that the response to pressure stress at 53 MPa in the genus *Escherichia coli* induces the synthesis of

como la temperatura de transición de fase de la membrana en estado gel al estado cristalino líquido (Bartlett, 2002).

La Food and Drug Administration (FDA) ha propuesto una reducción de 5-log en los microorganismos patógenos (pasar a discusión). En este estudio, a 150 MPa y 45 °C se inactivó completamente *E. coli* (6 Log); mientras que el mismo grado de inhibición se logró a 200 MPa y 35 °C. El tratamiento de 250 MPa fue suficiente a 25 °C por 10 min para inactivar completamente *E. coli*. Con lo que se logra lo demandado por la FDA. El análisis estadístico para la reducción logarítmica, indica que el tiempo, temperatura y presión afectan significativamente el proceso de inhibición ($p < 0.05$).

En el día del procesamiento (tiempo 0 de almacenamiento) el efecto de las presiones seleccionadas (150, 200 y 250 MPa) a temperatura ambiente presentaron diferentes niveles de inactivación. En el rango de 20 a 180 MPa, el crecimiento microbiano se retrasa y se inhibe la síntesis de proteínas. La pérdida de viabilidad de las células comienza a partir de presiones de aproximadamente 180 MPa, al incrementar esta presión, la velocidad de inactivación aumenta exponencialmente. Al aplicar presiones mayores, hay daño a la integridad de la membrana y se desnaturalizan las proteínas (Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2011). Cabe resaltar que los diferentes efectos que ejercen las HHP sobre los microorganismos dependen directamente de la etapa de desarrollo en la que éstos se encuentren, ya que las células en fase logarítmica presentan una mayor sensibilidad al tratamiento por HHP que aquellas en fase estacionaria. Mañas & Mackay (2004) observaron este comportamiento utilizando la cepa J1 de *Escherichia coli* en fase exponencial y estacionaria. Se observaron también diversas modificaciones celulares como agregación de proteínas citoplasmáticas y condensación de los nucleótidos, cuando las presiones eran iguales o mayores a 200 MPa. Esto puede deberse a que en la fase logarítmica los microorganismos se encuentran en división celular y por tanto, la membrana es más sensible a los factores externos (Ayvaza *et al.*, 2012).

La desnaturalización irreversible de las proteínas a presión superior a 300 MPa, corresponde al rango de presión necesaria para inactivar las células vegetativas (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014). En este estudio se aplicaron temperaturas de 35 y 45 °C, consideradas aún temperaturas moderadas, para disminuir en mayor medida las posibilidades de supervivencia del microorganismo. Además, se ha reportado que la respuesta al estrés por presión a 53 MPa en el género *Escherichia coli* induce la síntesis de 55 proteínas, incluyendo 11 proteínas de choque térmico y 4 por choque frío como un mecanismo

55 proteins, including 11 thermal shock proteins and 4 cold shock proteins as a defense mechanism of the cell (Buzrul et al., 2008). The pressure is the only stress factor that can simultaneously induce the synthesis of heat shock and cold shock proteins (Ambrosi et al., 2016). One of the effects of the HHP treatments is the breakdown of non-covalent bonds (ionic, hydrophobic, hydrogen bonds) of the proteins and therefore, the secondary, tertiary and quaternary structure can unfold and dissociate, while the primary structure remains unchanged (Dzwolak et al., 2002). According to Messens et al. (1997) applying a pressure lower than 150 MPa changes in the quaternary structure are observed. Nevertheless, it is necessary to apply more than 200 MPa to significantly modify the secondary and tertiary structures. The induction of these proteins represents an attempt by *E. coli* to diminish the damaging effects of increased pressure on membrane integrity, translation processes, as well as the stability of macromolecules (Bartlett, 2002). For this reason, pressures of less than 300 MPa, temperature or prolonged times should be applied. The combined treatment avoids the possibility of having stressed cells that synthesize defense proteins and therefore the microorganism can survive and recover from sublethal damage during storage.

Regarding the effect of the residence time in the inactivation level, we observed that the inhibition increases from 2.8 to 4.1 log CFU/mL when the come up time is augmented, CUT=2.65 min at 20 min the treatment of 150 MPa at 25 °C. Some authors have suggested that increasing the treatment time for some cases, does not generate a better response in the case of the HHP system (Raventós-Santamaría, 2005). However, a high concentration of solutes above 30 % can induce a greater resistance of the microorganism to the pressure due to the physiological conditions of the organism when the water activity is reduced. This resistance may decrease with increasing temperature and time of treatment (Télez-Luis et al., 2001).

The pressure does not generate significant effects until combined treatments with temperature are applied and in the case of 150 MPa with greater residence time (Table 1). Rivalain et al. (2010) report that the application of temperature (between 45 and 70 °C) synergistically improves the effectiveness of the pressure. Synergy is also generated by combining low pH with HHP. When the microorganism is present in an acid medium, as the Gram-negative bacteria, HHP produces an "electroporation" effect due to the stacking of the lipid compounds of the cell membrane, which means an empty space on the cell

de defensa de la célula (Buzrul et al., 2008). La presión es el único factor estresante que puede inducir simultáneamente la síntesis de proteínas de choque térmico y choque frío (Ambrosi et al., 2016). Uno de los efectos de los tratamientos por HHP es la ruptura de los enlaces no covalentes (iónicos, hidrofóbicos, puentes de hidrógeno) de las proteínas; por lo tanto la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria pueden desplegarse y disociarse, mientras la estructura primaria se mantiene sin cambios (Dzwolak et al., 2002). Según Messens et al. (1997) aplicando una presión menor a 150 MPa se observan cambios en la estructura cuaternaria, sin embargo, es necesario aplicar más de 200 MPa para modificar significativamente las estructuras secundaria y terciaria. La inducción de estas proteínas representa un intento por parte de *E. coli* para aminorar los efectos perjudiciales del incremento de la presión en la integridad de la membrana, los procesos de traducción, así como en la estabilidad de las macromoléculas (Bartlett, 2002). Por esta razón, es importante que al aplicar presiones menores de 300 MPa se aplique temperatura, o bien se apliquen tiempos prolongados. El tratamiento combinado evita la posibilidad de tener células estresadas, que sinteticen proteínas de defensa y por lo tanto que el microorganismo pueda sobrevivir y recuperarse del daño subletal durante el almacenamiento.

Respecto al efecto del tiempo de residencia en el nivel de inactivación, se observa que la inhibición incrementa de 2.8 a 4.1 log CFU/mL cuando se incrementa el come up time, CUT=2.65 min a 20 min el tratamiento de 150 MPa a 25 °C. Algunos autores han sugerido que incrementar el tiempo de tratamiento para algunos casos, no genera una mejor respuesta tratándose del sistema de HHP (Raventós-Santamaría, 2005). Sin embargo, una concentración elevada de solutos por encima del 30 %, puede inducir a una mayor resistencia del microorganismo a la presión, debido a las condiciones fisiológicas del organismo al reducirse la actividad del agua. Esta resistencia puede disminuir al aumentar la temperatura y el tiempo del tratamiento (Télez-Luis et al., 2001).

La presión no genera efectos importantes sino hasta que se aplican tratamientos combinados con temperatura y en el caso de 150 MPa con mayores tiempo de residencia (Tabla 1). Rivalain et al. (2010) reportan que la aplicación de temperatura (entre 45 y 70 °C) sinérgicamente mejora la eficacia de la presión. También se genera una sinergia al combinar el bajo pH con HHP. Cuando el microorganismo está presente en un medio mayormente ácido, como en el caso de las bacterias Gram negativas, al aplicar HHP se

membrane. Taking this into account, it is not possible to regulate the entry of substances as well as hydrogen ions present in the juice, promoting cytoplasmic acidification and inducing subsequent cell death (Alpas *et al.*, 2008; Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2011).

Nectar used in this study showed an acid pH of 3.3 ± 0.1 . The influence of the food components on the effect of pressure on microorganisms has been previously reported (Patterson, 2005). Seiji *et al.* (2004) obtained reductions of 2.5 log of *Escherichia coli* O157: H7 when applying 200 MPa for 20 min to the apple juice (pH 3.69). In this study, at those conditions of pressure and time, we accomplished a higher reduction (4.3 log CFU/mL) of *E. coli* at 25 °C (Table 1). By evaluating the inactivation at different retention times it is possible to consider that the pH of the mango nectar, the temperature and the pressure of the treatment result in a synergistic effect causing a greater inactivation, which indicates that possibly a low pH increases the inactivation of the vegetative bacteria by high pressure (Van Opstal *et al.*, 2005). It has been reported that this microorganism can survive in acidic foods up to a pH of 3.7 (Garlant-Miller & Kaspar, 1994). This value is higher than the mango nectar. When the pressure, temperature and acidic pH are combined, greater inhibition of bacteria is observed. By exposing the microorganism to a stress condition such as pressure, the microorganisms less baro-resistant are inactivated. It is important to mention that baroduric microorganisms can survive to pressures of 200 MPa, but can not grow. Nevertheless, when applying a combined treatment with temperature a greater logarithmic reduction is observed, since synthesize proteins as defense response as responsible for the three stress conditions, seems to be complicated for the cell because an energy demand in the form of ATP would be necessary, which would be synthesized in a very limited way due to the denaturation by the pressure of the enzyme ATPase located in the cell membrane. Moreover, it is necessary to consider that during the pressurization process adiabatic heating is generated in the processed product, increasing the temperature from 2 to 3 °C per 100 MPa (Hernández-García, 2007), or from 3 to 9 °C per each 100 MPa (Patterson, 2005), depending on the initial temperature. Several enzyme systems of microorganisms are inhibited or inactivated by pressure. This is the case of several dehydrogenases in *Escherichia coli* (100 MPa), carboxypeptidases of yeasts (400 MPa) and ATPase located in the phospholipid layer involved in the phenomenon of

genera un efecto de "electroporación", debido al apilamiento de los compuestos lipídicos de la membrana celular, es decir, espacios vacíos sobre la membrana celular, por lo que no es posible regular la entrada de sustancias, así como de iones hidrogeno presentes en el jugo, propiciando una acidificación citoplasmática e induciendo una posterior muerte celular (Alpas *et al.*, 2008; Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2011).

El néctar que se usó en este estudio presentó un pH ácido de 3.3 ± 0.1 . Previamente se ha reportado la influencia que tienen los componentes propios del alimento en el efecto de la presión sobre los microorganismos (Patterson, 2005). Seiji (2004) lograron obtener reducciones de 2.5 log de *Escherichia coli* O157:H7 al someter jugo de manzana (pH 3.69) a 200 MPa por 20 min. En el presente estudio, a esas condiciones de presión y tiempo, a 25 °C se logró una reducción superior (4.3 log CFU/mL) de *E. coli* (Tabla 1). Valorando la inactivación a los diferentes tiempos de retención es posible considerar que el pH del néctar de mango, la temperatura y la presión del tratamiento resulta en un efecto sinérgico causando una mayor inactivación, lo que indica que posiblemente un bajo pH aumenta la inactivación de las bacterias vegetativas por alta presión (Van Opstal *et al.*, 2005) y se ha reportado que este microorganismo puede sobrevivir en alimentos ácidos de hasta un pH de 3.7 (Garlant-Miller & Kaspar, 1994) siendo este valor mayor al que presenta el néctar de mango. Cuando se combina presión, temperatura y pH ácido, se observa una mayor inhibición de bacterias. Al exponer al microorganismo a una condición de estrés como la presión, se inactivan los microorganismos menos baroresistentes, cabe mencionar que existen microorganismos barodúricos que pueden sobrevivir a presiones de incluso 200 MPa pero no pueden crecer, pero al aplicar un tratamiento combinado con temperatura hay una mayor reducción logarítmica ya que al sintetizar continuamente proteínas como respuesta de defensa para las tres condiciones de estrés resultaría complicado para la célula ya que habría una demanda de energía bajo la forma de ATP, la cual se sintetizaría de manera muy limitada debido a la desnaturalización por la presión de la enzima ATPasa ubicada en la membrana celular. Además hay que considerar que durante el proceso de presurización se genera un calentamiento adiabático en el producto procesado, incrementando la temperatura de 2 a 3 °C por cada 100 MPa (Hernández-García, 2007), o de 3 a 9 °C por cada 100 MPa (Patterson, 2005), dependiendo de la temperatura inicial. Varios sistemas enzimáticos de los microorganismos son inhibidos o inactivados por la presión. Este es el caso de varias deshidrogenasas en *Escherichia coli* (100 MPa), carboxipeptidasas de las levaduras (400 MPa) y la

active transport through the membrane. The Na⁺/K⁺-ATPase activity of the cell membrane is reduced by high pressure. This effect is probably due to the associated bilayer (Chong *et al.*, 1985). When the pressure is applied, several sites inside the bacterial cell can be damaged and therefore, no function of the ATPase can be performed due to direct denaturation or dislocation of the membrane. ATP is no longer hydrolyzed, and therefore, it is no longer available to carry out the active transport of protons, the cellular pH is acidified and the cell eventually dies.

Aromatic profile of mango nectar treated by HHP

In the 27 treatments of this study, ethanol, α -pimeno, myrcene, 3-carene were detected in mango nectar (with 98 % reliability), which has been reported as components of the aroma (Beaulieu & Lea, 2003; Pandit *et al.*, 2009), as well as nonanoic acid. In the aromatic profile analysis (Table 2), we found that only the increase in temperature has an effect decreasing the concentration of some volatile compounds in the medium, such as α -pimeno and ethanol.

It is possible to affirm the non-alteration of the aroma in this food at different pressure levels because the high pressures do not affect the covalent bonds that are typical of the aroma, but the non-covalent ones as the hydrogen bonds typical of the tertiary structure of the proteins undergo important modifications. This is possible to explain since the distance of a covalent bond is very small 10 Å, the chemical nature of the link indicates that a hybridization of the sp³ orbits exists, which leads to a smaller distance between C-C, C-H, C-O, S-S, among others and when applying pressure, the distance between the elements is smaller. However, due to the sharing of electrons they are not affected by this reduction of space, so aromatic compounds are not affected at pressures less than 1000 MPa (Sangronis *et al.*, 1997). Ethanol was found at an average concentration of 30.92 ± 18.57 µg/L and is only affected by the treatment temperature, being a lower concentration when applying treatments at 35 and 45 °C. This compound has been reported by Lebrun *et al.*, 2008, in Keitt and Kent varieties, which is released during the ripening process in fruits. Also, α -pimeno is affected by temperatures (35 and 45 °C). This is a monoterpene compound product of the secondary metabolism of some fruits such as mango due to the hydrolysis of sugars. This has been reported by Salazar *et al.* (2007) in the

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

Perfil aromático del néctar de mango tratado por alta presión hidrostática

En los 27 tratamientos que comprende este estudio, se detectaron en el néctar de mango (con un 98% de confiabilidad), etanol, α -pimeno, mirceno, 3-careno, mismos que han sido reportados como componentes del aroma impacto de la fruta (Beaulieu & Lea, 2003; Pandit *et al.*, 2009), así como el ácido nonanoico. En el análisis de los datos, para el perfil aromático (Tabla 2), se encontró que solo el incremento de temperatura presenta un efecto disminuyendo la concentración de algunos compuestos volátiles en el medio, tales como α -pimeno y etanol.

Es posible afirmar la no alteración del aroma en este alimento a diferentes niveles de presión, debido a que las altas presiones no afectan los enlaces covalentes que son típicos del aroma, pero los no covalentes como los puentes de hidrógeno típicos de la estructura terciaria de las proteínas sufren modificaciones importantes, esto es posible explicarlo ya que la distancia de un enlace covalente es muy pequeña 10 Å, la naturaleza química del enlace indica que hay una hibridación de la orbitas sp³ lo que conduce a una menor distancia presente entre C-C, C-H, C-O, S-S, entre otros y al aplicar presión, la distancia entre los elementos es menor, sin embargo debido a la compartición de electrones no les afecta dicha reducción de espacio, por lo que los compuestos aromáticos no son afectados a presiones menores a 1000 MPa (Sangronis *et al.*, 1997). El etanol se encontró en una concentración promedio de 30.92 ± 18.57 µg/L y sólo se ve afectado por la temperatura de tratamiento, existiendo una menor concentración cuando se aplican tratamientos a 35 y 45 °C, este compuesto ha sido reportado por Lebrun *et al.* 2008, en variedades Keitt y Kent, el cual es liberado durante el proceso de la maduración en la frutas. También α -Pimeno se ve afectado por las temperaturas (35 y 45 °C). Éste es un compuesto monoterpénico producto del metabolismo secundario de algunas frutas como el mango

Table 2.
Optimum conditions of the process for the conservation of mango nectar treated by high hydrostatic pressures.

Tabla 2.
Condiciones óptimas del proceso para la conservación de néctar de mango tratado por altas presiones hidrostáticas.

Compound	Factor		
	Temperature (°C)	Pressure (MPa)	Time (min)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	36.15	250.0	14.08
α-Pimen	25.0	225.3	20.0
β-Myrceno	45.0	250.0	8.0
3-Carene	25.0	150.0	20.0
Nonanoico acid	31.0	150.2	20.0
Global	25.0	250.0	20.0

mango variety Ataulfo, Kent and Keitt (Lebrun *et al.*, 2008) and by Pandit *et al.* (2009) in 27 mango varieties and in Tommy Atkins by Moreno *et al.* (2010). Nonanoico acid has been identified in this study, this compound is not altered by treatment conditions. β-myrcene and 3-carene are monoterpenes on which the pressure, time or temperature showed no effect. β-myrcene is present in mango fruit at physiological maturity, it has been reported in different varieties Ataulfo (Salazar *et al.*, 2007), Kent and Keitt in the states of physiological and consumer maturity (Lebrun *et al.*, 2008) and in 27 varieties of mango (Pandit *et al.*, 2009) and the 3-carene is a product of secondary metabolism produced by the hydrolysis of sugars.

Effect of HHP on the total soluble solids and on the hydrogen potential

The value of the total soluble solids (SST, °Brix) was 13.5 ± 0.22 (average), statistically equal value to the obtained in SSR for mango nectar without treatment, which indicates that the pressure, time and temperature do not affect the concentration of SST (Figure 1). The main sugars in the mango are mostly fructose, sucrose, glucose as well as maltose and xylose (Tharanathan *et al.*, 2006). In these sugars, covalent bonds predominate, considered stable bonds under pressure conditions less than 1000 MPa. These types of links share one or more pairs of electrons in an orbit and are high energy (95 Kcal/

debido a la hidrólisis de azúcares. Esto ha sido reportado por Salazar *et al.* (2007) en la variedad de mango Ataulfo, en Kent y Keitt (Lebrun *et al.*, 2008) y por Pandit *et al.* (2009) en 27 variedades de mango y en Tommy Atkins por Moreno *et al.* (2010). El ácido nonanoico fue identificado en este estudio, compuesto que no se ve alterado por las condiciones de tratamiento. El β-mirceno y 3-careno, son monoterpenos sobre los que no mostró efecto la presión, tiempo o temperatura, el β-mirceno está presente en el fruto de mango en madurez fisiológica, ha sido reportado en diferentes variedades Ataulfo (Salazar *et al.*, 2007), Kent y Keitt en los estados de madurez fisiológica y de consumo (Lebrun *et al.*, 2008) y en 27 variedades de mango (Pandit *et al.*, 2009) y el 3-careno es producto de metabolismo secundario, producido por la hidrólisis de azúcares.

Efecto de HHP sobre los sólidos solubles totales y en el potencial de hidrogeno

El valor de los sólidos solubles totales (SST, °Brix) fue en promedio de 13.5 ± 0.22 , valor estadísticamente igual al valor obtenidos en SSR para néctar de mango sin tratamiento, lo que indica que la presión, tiempo y temperatura no afectan la concentración de SST (Figura 1). Los principales azúcares existentes en el mango son mayoritariamente fructosa, sacarosa, glucosa, así como maltosa y xilosa (Tharanathan *et al.*, 2006), en estos azúcares predominan los enlaces covalentes, considerados enlaces estables en condiciones de presión menores a 1000 MPa. Este tipo de enlaces comparten

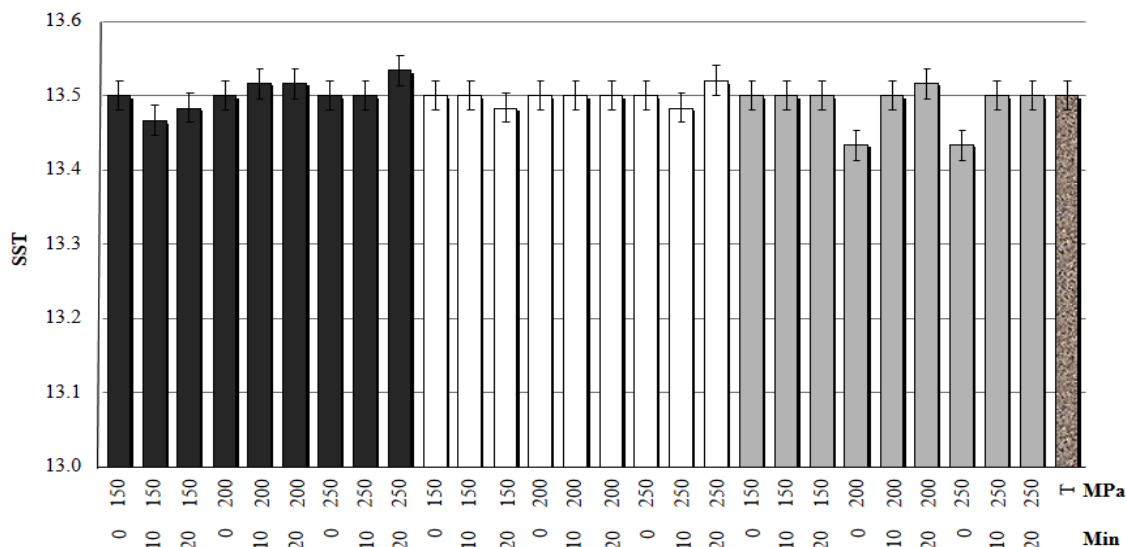


Figure 1. Effect of high hydrostatic pressure on the content of total soluble solids in mango nectar at different temperatures (black 25 °C, white 35 °C, gray 45 °C and T: control).

Figura 1. Efecto de la alta presión hidrostática sobre el contenido de sólidos solubles totales en el néctar de mango a diferentes temperaturas (negro 25 °C, blanco 35 °C, gris 45 °C y T: testigo)

mol), thus the application of pressure does not release enough energy to break them. It has been reported that grape juice subjected to HHP (500 MPa) showed no change in the content of total soluble solids (Zhao *et al.*, 2013). In melon, at 800 MPa, a slight decrease in SST was observed (Wolbang *et al.*, 2008). The effect on the total soluble solids is not the same when treating a juice or a fruit since the juices are foods where the chemical compounds and nutrients individually receive and transmit the pressure proportionally. Butz *et al.*, (2002) reported when pressurizing sugars such as fructose, sucrose, glucose, they remain without noticeable changes until 21 days after treatment. The low pH in the juices contributes to having a longer storage period. The average pH of the samples treated by HHP was 3.2 ± 0.012 , a statistically equal value to the pH of the mango nectar without treatment (Figure 2). The statistical analysis ($R=0.902$) showed no effect of pressure, time and temperature ($p<0.05$) hence the hydrogen potential value is not altered. Heremans (1995) mentioned a decrease in pH of 0.3 units per 100 MPa, but during the depressurization process, the pH returns to its initial level.

uno o más pares de electrones en una órbita y son de alta energía (95 Kcal/mol), por lo que la aplicación de presión no libera la suficiente energía para romperlos. Se ha reportado que el jugo de uva sometido a HHP (500 MPa) no mostró cambios en el contenido de sólidos solubles totales (Zhao *et al.*, 2013); en melón, a una presión de 800 MPa se observó una ligera disminución de los SST (Wolbang *et al.*, 2008). El efecto en los sólidos solubles totales no resulta igual cuando se trata un jugo o un fruto entero, ya que los jugos son alimentos donde los compuestos químicos y nutrientes individualmente reciben y transmiten la presión en forma proporcional. Butz *et al.* (2002) reportaron que, al presurizar azúcares como fructosa, sacarosa, glucosa, éstos se mantienen sin cambios notables hasta los 21 días posteriores al tratamiento. El pH bajo en los jugos contribuye a tener un periodo de almacenamiento más largo. El pH promedio de las muestras tratadas por HHP fue de 3.2 ± 0.012 , valor estadísticamente igual al pH del néctar de mango sin tratamiento (Figura 2). El análisis estadístico ($R=0.902$) indicó que no hay efecto de la presión, tiempo y temperatura ($p<0.05$) por lo que el valor de potencial de hidrogeno no se ve alterado. Heremans (1995) sostiene que hay una disminución del pH en 0.3 unidades por cada 100 MPa, pero durante el proceso de despresurización, el pH regresa a su nivel inicial.

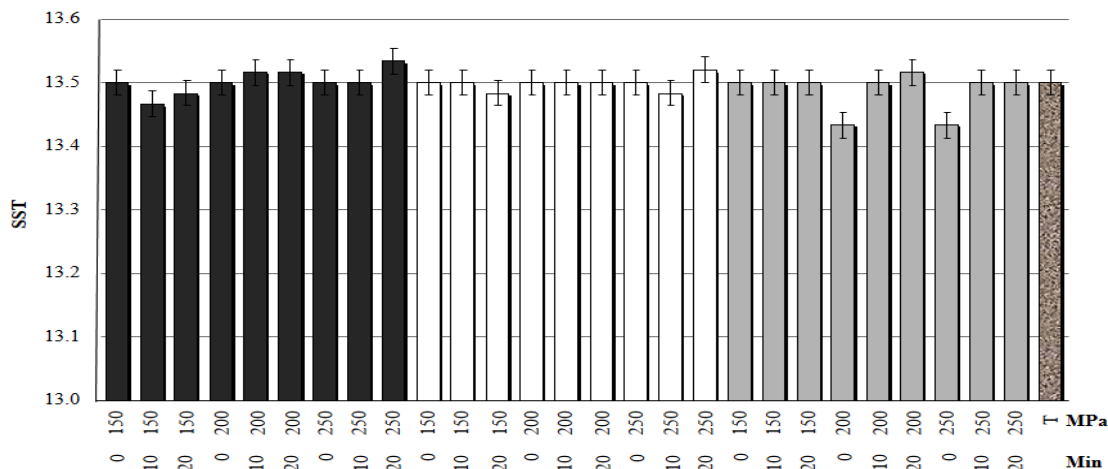


Figure 2. Effect of high hydrostatic pressure treatment on the potential of Hydrogen (pH) in mango nectar at different temperatures (gray 25 °C, white 35 °C, black 45 °C and T: control).

Figura 2. Efecto del tratamiento de alta presión hidrostática sobre el potencial de Hidrogeno (pH) en el néctar de mango a diferentes temperaturas (gris 25 °C, blanco 35 °C, negro 45 °C y T: testigo).

Process optimization

The optimal conditions for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 to maximize the conservation of each of the aromatic compounds, independently, as well as the conditions for the integral conservation of mango nectar, evaluated in a global manner, are presented in Table 2. The total inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 is possible from 250 MPa at 25 °C for 10 min. However, the analysis of response surface, based on its calculation principles, determined as optimal conditions 250 MPa, 36.15 °C, and 14.08 min. It is possible to visualize these conditions in the response surface (Figure 3), which shows in dark gray, the optimal zone for the inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 under the conditions used in the different treatments.

Regarding the aromatic compounds evaluated in this study, we noticed by response surface analysis the effect of temperature above 35 °C on the α -pimeno compound and ethanol, reporting as 25 °C as the optimal temperature for this compound. This indicates that at low-temperature levels, the preservation of these compounds is guaranteed. We determined the optimal conditions of the process by applying the methodology of multiple responses in the response surface analysis considering the concentration of 3-carene, ethanol,

Optimización del proceso

Las condiciones óptimas para la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7, para maximizar la conservación de cada uno de los compuestos aromáticos, realizándose de manera independiente, así como las condiciones para la conservación integral del néctar de mango, evaluada de manera global se presentan en la Tabla 2. La inhibición total de *Escherichia coli* O157:H7 es posible a partir de 250 MPa a 25 °C durante 10 min, sin embargo el análisis de superficie de respuesta, en base a sus principios de cálculo, determinó como condiciones óptimas 250 MPa, 36.15 °C y 14.08 min, es posible visualizar estas condiciones en la manta de superficie de respuesta (Figura 3), misma que muestra en color gris oscuro, la zona óptima para la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7, bajo las condiciones empleadas en los diferentes tratamientos.

Con respecto a los compuestos aromáticos evaluados, el efecto de la temperatura sobre el compuesto α -pimeno y etanol a temperaturas superiores a los 35 °C, reportado por el análisis estadístico, se evidenció en el análisis de superficie de respuesta, el cual reporta como temperatura óptima para este compuesto 25 °C, indicando que a niveles bajos de temperatura, se garantiza la conservación de estos compuestos. Al aplicar la metodología de múltiples respuestas en el análisis de superficie de respuesta considerando la concentración del 3-carene, etanol, β -mirceno, ácido

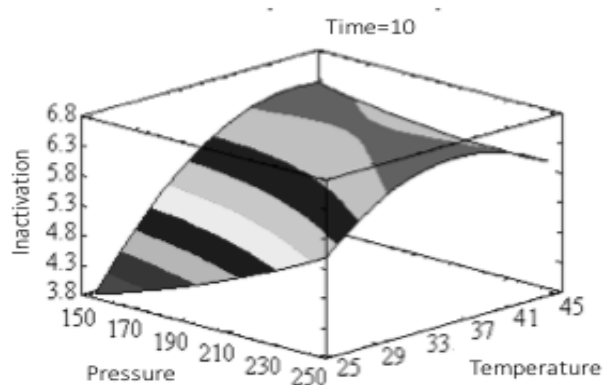


Figure 3. Response surface for obtaining the optimal conditions of the treatment of high hydrostatic pressures on the inhibition of *Escherichia coli* O157: H7.

Figura 3. Superficie de respuesta para la obtención de las condiciones óptimas del tratamiento de altas presiones hidrostáticas sobre la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7.

β -myrcene, nonanoic acid, α -pimeno and logarithmic reduction of *Escherichia coli* O157:H7 (Table 2). It is important to mention that these conditions coincided with the optimal conditions for the inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, which guarantees the preservation of the aromatic compounds of mango, as well as the nectar food safety.

Optimal conditions were applied to samples of mango nectar without inoculum of *Escherichia coli* O157:H7 in order to sensorially evaluate the differences between nectar treated with high pressures and nectar without treatment. The analysis of variance ($p>0.05$) allows us to state that the judges did not detect significant changes in the taste and smell of mango nectar treated with high hydrostatic pressures compared to the control without treatment.

Conclusions

The application of pressure, temperature and residence time was favorable in the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in mango nectar. Complete inactivation was achieved with the treatment of 250 MPa, 25 °C and 10 min; the same results were obtained by applying 200 MPa, 35 °C and 150 MPa, 45 °C and 0 min. Soluble solids content and pH of mango nectar was not affected by the treatments. The increase of

nonanoic, α -pimeno and the logarithmic reduction of *Escherichia coli* O157:H7, se determinaron las condiciones óptimas del proceso (Tabla 2). Es importante señalar que estas condiciones coincidieron con las condiciones óptimas para la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7, lo que garantiza la conservación de los compuestos aromáticos de interés del mango, así como la inocuidad del néctar.

Las condiciones óptimas se aplicaron a muestras de néctar de mango sin inóculo de *Escherichia coli* O157:H7 con la finalidad de evaluar sensorialmente las diferencias entre el néctar tratado con altas presiones y el néctar sin tratamiento. El análisis de varianza ($p>0.05$) permite afirmar que los jueces no detectaron cambios significativos en el sabor y olor del néctar de mango tratado con altas presiones hidrostáticas respecto al control sin tratamiento.

Conclusiones

La aplicación de presión, temperatura y tiempo de residencia resultó favorable en la inactivación de *Escherichia coli* O157:H7 en néctar de mango. La inactivación completa se logró con el tratamiento de 250 MPa, 25 °C y 10 min; el mismo objetivo se consiguió al aplicar 200 MPa, 35 °C y a 150 MPa, 45 °C y 0 min. Los tratamientos evaluados no afectaron el contenido en los sólidos solubles totales y el potencial de hidrogeno del néctar de mago. El incremento de la temperatura

temperature in the treatments decreased the content of some volatile compounds such as α -pimeno and ethanol. The response surface analysis proposes as optimal process conditions for the conservation of the aromatic quality and the safety of the product 250 MPa, 25 °C, and 20 min. HHP was effective on the inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, without negatively affecting the properties and quality of mango nectar.

en los tratamientos disminuyó el contenido de algunos compuestos volátiles tales como el α -pimeno y etanol. El análisis de superficie de respuesta propone como condiciones óptimas del proceso para la conservación de la calidad aromática y la inocuidad del producto 250 MPa, 25 °C y 20 min. El tratamiento por altas presiones hidrostáticas fue efectivo sobre la inhibición de *Escherichia coli* O157:H7, sin afectar negativamente las propiedades y la calidad del néctar de mango.

Acknowledgments

The authors thank PROMEP for the financial support for the realization of this research (Agricultural Resources Network), to CONACYT Mexico, for the scholarship granted to Gina Dolores López-Quintana to carry out Masters in Food Sciences.

Agradecimientos

Los autores agradecen a PROMEP por el apoyo financiero para la realización de esta investigación (Red Aprovechamiento de Recursos Agropecuarios), al CONACYT México, por la beca otorgada a Gina Dolores López-Quintana para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Alimentos.

Referencias

- Alpas, H., Kalchayanand N., Bozoglu, F. and Ray, B. (2008). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of food borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 60: 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00324-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00324-X)
- Ambrosi, V., Polenta, G., Gonzalez, C., Ferrari, G., and Maresca, P. (2016). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative food science and emerging technologies*, 38: 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.009>
- Ayvaza, H., Schirmerb, S., Parulekarc, Y., Balasubramaniama, V.M., Somervillea, J. A. and Daryaeia, H. (2012). Influence of selected packaging materials on some quality aspects of pressure-assisted thermally processed carrots during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 46: 437-447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.004>
- Bartlett, D.H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595: 367-381. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00357-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00357-0)
- Beaulieu, J. C. & Lea, J. M. (2003). Volatile and quality changes in fresh-cut mangos prepared from firm-ripe and soft-ripe fruit, stored in clamshell containers and passive MAP. *Post-harvest Biology and Technology*, 30(1): 15-28. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00081-4)
- Bermúdez-Aguirre, D., Guerrero-Beltrán, J. Á., Barbosa-Cánovas, G. V. and Welti-Chanes, J. (2011). Study of the inactivation of *Escherichia coli* and pectin methylesterase in mango nectar under selected high hydrostatic pressure treatments. *Food science and technology international*, 17(6): 541-547. <https://doi.org/10.1177/1082013211399681>
- Buchanan, A. (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157: H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food technology (USA)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US1997053527>
- Butz, P., García Fernandez, A. and Tausher, B. (2002). Influence of high pressure treatment on sensorial and nutritional quality of fruit and vegetables. *Progress in Biotechnology*, 9: 417-421. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(02\)80133-2](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(02)80133-2)
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A. and Demazeau, G. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3): 275-278. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.015>
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A. and Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat

- salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International journal of food microbiology*, 156 (2), 176-180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025>
- Cheftel, J. C. (1995). Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation/revisión: Alta-presión, inactivación microbiológica y conservación de alimentos. *Food science and technology international*, 1(2-3): 75-90. <https://doi.org/10.1177/108201329500100203>
- Chong, P. L., Fortes, P.A. and Jameson, D. M. (1985). Mechanisms of inhibition of Na/K ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 14484-14490. <http://www.jbc.org/content/260/27/14484.short>
- Dzwolak, W., Kato, M. and Taniguchi, Y. (2002). Fourier transform infrared spectroscopy in high pressure studies on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595: 131-144. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00340-5)
- FDA (Food and Drug Administration) <http://www.accessdata.fda.gov> [Last checked december 18th 2018].
- Ferrari, G., Maresca, P. and Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100(2): 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.006>
- Garlant-Miller, L. and Kaspar, C. W. 1994. Escherichia coli O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*, 57:460-464.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van der Broeck, I. and Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*. 9(5): 197-203. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00039-9)
- Heremans, K. (1995). High pressure effects on biomolecules. En: *High Pressure Processing of Foods*, (D. A. Ledward, R. G. Earnshaw, D. E. Johnson y A. P. M. Hasting, eds.), pp 81-98. University Press, Nottingham, U.K.
- Hernández-García, I. L. (2007). Efecto de la aplicación de altas presiones dinámicas sobre la actividad de la enzima pectinmetilesterasa en sistemas modelo. (Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos). Universidad de las Américas Puebla, Cholula, Puebla, México. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/hernandez_g_il/
- Hiremath, N. D. & Ramaswamy, H. S. (2012). High-pressure destruction kinetics of spoilage and pathogenic microorganisms in mango juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(2): 113-125. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00559.x>
- Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., and Wu, J. (2013). Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18: 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.01.001>
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Hernández-Brenes, C. (2012). Stability of avocado paste carotenoids as affected by high hydrostatic pressure processing and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16: 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.001>
- Klotz, B., Mañas, P. and Mackey, B. M. (2010). The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International journal of food microbiology*, 137(2-3): 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.020>
- Laboissière, L. H. E. S., Deliza, R., Barros-Marcellini, A. M., Rosenthal, A., Camargo, L. M. A. Q., and Junqueira, R. G. (2007). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice. *Innovative food science and emerging technologies*, 8(4): 469-477. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.001>
- Lebrun, M., Plotto A., Goodner, K., Ducamp, M. N. and Baldwin, E. (2008). Discrimination of mango maturity by volatiles using the electronic nose and gas chromatography. *Postharvest Biology and Technology*, 48: 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.010>
- Mañas, P. & Mackey, B. M. (2004) Morphological and Physiological Changes Induced by High Hydrostatic Pressure in Exponential-and Stationary-Phase Cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. *Applied and environmental microbiology*, 70: 1545- 1554. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1545-1554.2004>
- Mesa-Vanegas, A., Gaviña, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Trujillo S. and Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2): 13-26. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000200003

- Messens, W.; Van Camp, J. and Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 81: 107-112. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01015-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01015-7)
- Moody, A., Marx, G., Swanson, B. G. and Bermúdez-Aguirre, D. (2014). A comprehensive study on the inactivation of *Escherichia coli* under nonthermal technologies: High hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound. *Food Control*, 37: 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.052>
- Moreno, A., León, D. F. Giraldo, G. A. and Ríos, E. (2010). Volatile compounds profile analysis of mango (*Mangifera indica* L. Var. *Tommy Atkins*) treated by combined methods. *Revista Colombiana de Química* 39(1): 61-72. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042010000100005
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A. and Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit-and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19(6): 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.001>
- Pandit, S. S., Chidley, H. G., Kulkarni, R. S., Pujari, K. H., Giri, A. P. and Gupta, V. S. (2009). Cultivar relationships in mango based on fruit volatile profiles. *Food Chemistry* 114: 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.107>
- Parish, M. E. (1997). Public health and nonpasteurized fruit juices. *Critical Reviews in Microbiology* 23: 109-119. <https://doi.org/10.3109/10408419709115132>
- Patterson, MF. (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* 98(6): 1400-1409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x>
- Pedrero, L. & Pang B. (1997). Evaluación sensorial de los alimentos: Metodos Analíticos. Editorial Longman. Ed. Segunda. Mexico, D.F.
- Raventós-Santamaría, M. (2005). Industria Alimentaria: tecnología emergente. Editorial Ediciones UPC. Barcelona España.
- Reyes Ramírez, A., Ruiz Sánchez, E., Yam Chimal, C. and Dzul Chan, M. (2011). Selección de *Bacillus spp.* con actividad antagonica in vitro contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*, 15(2): <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209122297007.pdf>
- Rivalain, N., Roquain, J. and Demazeau, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology advances* 28(6): 659-72. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.001>
- Ruiz-Montañez, G., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., Velazquez-De La Cruz, G., De León, J. R. and Navarro-Ocaña, A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food chemistry*, 159, 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.009>
- Salazar, S., Santiesteban H., Velásquez V. and Cruz-López L. (2007). Volatiles of mango Var. Ataulfo Characterized by SPME and Capillary GC/MS spectroscopy. *Journal of the Mexican Chemical Society* 51(3): 145-147. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2007000300004
- Sangronis, E., Pothakamury, U., Ramos, A. M., Ibarz, A. and Barbosa, G. V. (1997). La alta presión hidrostática: Una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria*, 33: 32-43.
- (SAGARPA) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Reportes Agrícolas de Mango. (2016). [Last checked February 18th 2019].
- Seiji, N., Chiniro T., Misuya S. and Isao H. (2004). Response of *Escherichia coli* O157:H7 in apple and orange juices by hydrostatic pressure treatment with rapid decompression. *Food Microbiology* 21: 469-473. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.09.004>
- Solís-Solís, H. M., Calderón-Santoyo, M., Schorr-Galindo, S., Luna-Solano, G. and Ragazzo-Sánchez, J. A. (2007). Characterization of aroma potential of apricot varieties using different extraction techniques. *Food Chemistry* 105: 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.061>
- Tabilo-Munizaga, G., Gordona, T.A., Villalobos-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salazar, F. N., Pérez-Wond, M. and Acuña, S. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon Blanc wine. *Food Chemistry*, 155: 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.051>
- Télez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M. and Simal-Gándara, J. (2001). Application of high hydrostatic pressure in the food preservation. *CYTA-Journal of Food*, 3(2): 66-80. <https://doi.org/10.1080/11358120109487649>

- Tharanathan, R. N., Yashoda, H.M. and Prabha, T. N. (2006). Mango (*Mangifera indica* L.), "the king of the fruits" an overview. *Food Reviews International* 2: 95-123. <https://doi.org/10.1080/87559120600574493>
- Van Opstal, I, Vanmuysen, S.C., Wuytack, E.Y., Masschalck, B. and Michiels, C.W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2): 179-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.022>
- Vázquez-Gutiérrez, J. L., Quiles, A., Hernando, I. and Pérez-Munuera, I. (2011). Changes in the microstructure and location of some bioactive compounds in persimmons treated by high hydrostatic pressure. *Postharvest Biology and Technology* 61(2-3): 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.03.008>
- Wolbang, C., Fitos, J. and Treeby, M. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2): 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.08.001>
- Zhao, L., Wang, S., Liu, F., Dong, P., Huang, W., Xiong, L. and Liao, X. (2013). Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17: 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.004>