

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



**MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

**EFFECTO DEL pH Y LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN  
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus reuteri* EN ZUMO  
DE LULO (*Solanum quitoense*)**

PRESENTADO POR LA ALUMNA:

**SARA JORDÁ MARÍN**

DIRECTORES/AS:

**DRA. CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS  
DRA. LUCÍA SEGUÍ GIL**

Valencia, septiembre 2019

# EFECTO DEL pH Y LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus reuteri* EN ZUMO DE LULO (*Solanum quitoense*)

Sara Jordá Marín<sup>1</sup>, Cristina Barrera Puigdollers<sup>1</sup>, Lucía Seguí Gil<sup>1</sup>, Leidy Indira<sup>2</sup>

## RESUMEN

El desarrollo de alimentos que promuevan la salud y el bienestar es una de las prioridades actuales de la industria alimentaria. El lulo o “naranja” (*Solanum quitoense* Lam.), es un fruto que se diferencia por su contenido en aminos bioactivos derivados de la espermidina, con potencial efecto antihipertensivo. De acuerdo con esto, el lulo podría ser empleado como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales para la prevención de la hipertensión arterial en la población obesa. Además del consumo de frutas, la ingesta de determinados microorganismos también consigue disminuir la grasa corporal al modificar la microbiota intestinal, estimular la síntesis de péptidos que inducen la saciedad, reducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias y/o modificar el perfil lipídico. Es por ello que, con el objeto de desarrollar un nuevo zumo probiótico que prevenga la obesidad, en este trabajo se evalúa el efecto del pH (5,5 y 6) y las altas presiones de homogenización (100 y 150 MPa) sobre las propiedades fisicoquímicas (°Brix, pH, densidad, tamaño de partícula, color, actividad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH y el contenido en fenoles totales y flavonoides) y microbiológicas (recuento de viables) del zumo de lulo inoculado con *Lactobacillus reuteri* e incubado durante 24 y 48 h. Los resultados revelaron que el zumo de lulo es un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo probiótico, especialmente cuando su pH se ajusta a 5,5, y que la homogeneización previa a la inoculación solo mejora los recuentos cuando el pH del zumo se ajusta a 6. Al aumentar de 24 a 48 h el tiempo de incubación los recuentos apenas varían (en el caso de los zumos a pH 5,5) o aumentan significativamente (en el caso de los zumos a pH 6). Los cambios en las propiedades fisicoquímicas resultaron más o menos acusados en función del crecimiento microbiano. Los zumos con un mayor contenido en células vivas resultaron más turbios, presentaron un tamaño medio de partícula más elevado y un mayor contenido de sólidos sedimentables, además de experimentar mayores cambios en el color. El crecimiento microbiano en los zumos también mejoró el contenido en fenoles y flavonoides totales, junto a la capacidad antioxidante total medida por el método DPPH.

**PALABRAS CLAVE:** zumo de lulo, presión de homogenización, *Lactobacillus reuteri*, probiótico, propiedades antioxidantes.

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Valencia, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

<sup>2</sup>Universidad Tecnológica del Chocó, Grupo de Investigación en Valoración y Aprovechamiento de la Biodiversidad, Carrera 22, No. 18 B-10 Quibdó, Colombia.

## RESUM

El desenvolupament d'aliments que promouen la salut i el benestar és una de les prioritats actuals de la indústria alimentària. El lulo o "naranjilla" (*Solanum quitoense* Lam.), És un fruit que es diferencia pel seu contingut en amines bioactives derivades de la espermidina, amb potencial efecte antihipertensiu. D'acord amb això, el lulo podria ser emprat com a ingredient en el desenvolupament d'aliments funcionals per a la prevenció de la hipertensió arterial en la població obesa. A més del consum de fruites, la ingesta de determinats microorganismes també aconsegueix disminuir el greix corporal en modificar la microbiota intestinal, estimular la síntesi de pèptids que indueixen a la sacietat, reduir la síntesi de citokines proinflamàtories i / o modificar el perfil lipídic. És per això que, amb l'objecte de desenvolupar un nou suc probiòtic que previngui l'obesitat, en aquest treball s'avalua l'efecte del pH (5,5 i 6) i les altes pressions d'homogeneïtzació (100 i 150 MPa) sobre les propietats fisicoquímiques (° Brix, pH, densitat, mida de partícula, color, activitat antioxidant pels mètodes ABTS i DPPH i el contingut en fenols totals i flavonoides) i microbiològiques (recompte de viables) del suc de lulo inoculat amb *Lactobacillus reuteri* i incubat durant 24 i 48 h. Els resultats van revelar que el suc de lulo és un mitjà adequat per al creixement del microorganisme probiòtic, especialment quan el seu pH s'ajusta a 5,5, i que l'homogeneïtzació prèvia a la inoculació només millora els recomptes quan el pH del suc s'ajusta a 6. en augmentar de 24 a 48 h el temps d'incubació dels recomptes tot just varien (en el cas dels sucs a pH 5,5) o augmenten significativament (en el cas dels sucs a pH 6). Els canvis en les propietats fisicoquímiques van resultar més o menys acusats en funció del creixement microbià. Els sucs amb un major contingut en cèl·lules vives van resultar més tèrbols, van presentar una mida mitjana de partícula més elevada i un major contingut de sòlids sedimentables, a més d'experimentar majors canvis en el color. El creixement microbià en els sucs també va millorar el contingut en fenols i flavonoides totals, al costat de la capacitat antioxidant total mesura pel mètode DPPH.

PARAULES CLAU: suc de lulo, pressió d'homogeneïtzació, *Lactobacillus reuteri*, probiòtic, propietats antioxidants.

## ABSTRACT

The development of foods that promote health and well-being is one of the current priorities of the food industry. The lulo or "naranjilla" (*Solanum quitoense* Lam.), Is a fruit that differs by its content in bioactive amines derived from spermidine, with potential antihypertensive effect. Accordingly, lulo could be used as an ingredient in the development of functional foods for the prevention of high blood pressure in the obese population. In addition to the consumption of fruits, the intake of certain microorganisms also reduces body fat by modifying the intestinal microbiota, stimulating the synthesis of satiety inducing peptides, reducing the synthesis of pro-inflammatory cytokines and/or modifying the lipid profile. That is the reason, in order to develop a new probiotic juice that prevents obesity, this work evaluates the effect of pH (5.5 and 6) and high homogenization pressures (100 and 150 MPa) on the properties physicochemical (°Brix, pH, density, particle size, color, antioxidant activity by ABTS and DPPH methods and

the content in total and flavonoid phenols) and microbiological (viable count) of the lulo juice inoculated with *Lactobacillus reuteri* and incubated during 24 and 48 h. The results revealed that lulo juice is a suitable medium for the growth of the probiotic microorganism, especially when its pH is adjusted to 5.5, and that homogenization prior to inoculation only improves the counts when the pH of the juice is adjusted to 6. By increasing the incubation time from 24 to 48 h, the counts hardly vary (in the case of juices at pH 5.5) or increase significantly (in the case of juices at pH 6). Changes in physicochemical properties were more or less pronounced depending on microbial growth. The juices with a higher content in living cells were more cloudy, had a higher average particle size and a higher content of sedimentable solids, in addition to experiencing greater changes in color. Microbial growth in juices also improved the content of phenols and total flavonoids, together with the total antioxidant capacity measured by the DPPH method.

**KEY WORDS:** lulo juice, homogenization pressure, *Lactobacillus reuteri*, probiotic, antioxidant properties

## **INTRODUCCIÓN**

La obesidad es una patología metabólica altamente prevalente en nuestro país y constituye un gran problema de salud pública. Con frecuencia, este exceso de grasa abdominal se presenta asociado con otros desórdenes fisiológicos, tales como la resistencia a la insulina y la hipertensión arterial, que aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes. Entre las causas subyacentes a este síndrome no solo se encuentran la contribución genética, los hábitos alimentarios o la falta de actividad física, sino también la microbiota intestinal (Farías y col., 2011). Es un hecho probado que las diversas bacterias que colonizan el intestino regulan la extracción energética de los alimentos, la secreción de hormonas intestinales, el metabolismo a nivel periférico y el tono inflamatorio sistémico (DiBaise y col., 2008). En consecuencia, determinan la mayor o menor eficacia con la que se extrae energía de la dieta, así como la mayor o menor tendencia a depositar el exceso de energía como tejido adiposo (Mai y col., 2009).

En relación con la dieta, las recomendaciones generales para la prevención de la obesidad incluyen la disminución de la ingesta de grasas saturadas y azúcares simples y el aumento de la ingesta de frutas y vegetales (Albornoz-López y Pérez-Rodrigo, 2012). Las frutas, además de presentar un delicioso y refrescante sabor y aroma, constituyen una fuente natural de vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, fibra y otros compuestos bioactivos. Es por esto que su consumo está correlacionado con una menor incidencia de enfermedades coronarias y determinados tipos de cáncer (Vasco y col., 2008; Kuskoski y col., 2005). Entre todas las frutas el lulo (*Solanum quitoense* Lam.), también conocido como "naranjilla", se diferencia por su contenido en aminos bioactivos derivadas de la espermidina ( $N^1, N^4, N^8$ -tris-dihidrocafeoil y  $N^1, N^4, N^8$ -bis-dihidrocafeoil) con potencial efecto antihipertensivo (Forero y col., 2016). El mecanismo por el cual estos compuestos controlan la hipertensión es la inhibición de la enzima convertidora angiotensina, siendo la concentración inhibitoria media de  $1,1 \pm 0,3$  ppm para la pulpa del fruto fresco y de  $83,5 \pm 4,1$  ppm para el fruto seco. De acuerdo con esto, el lulo podría ser empleado como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales para la prevención de la hipertensión arterial en la población obesa. Perteneciente a la familia de las solanáceas, la planta produce

una fruta esférica con un diámetro que oscila entre 3 y 8 cm. Su piel (epicarpio) es naranja y, por lo general, está cubierta de pelos cortos (o "espinas"), espinosos y rígidos. La estructura interna del fruto es similar a la del tomate: la pulpa verde-amarillenta (mesocarpio y endocarpio) forma cuatro compartimentos separados por particiones membranosas y rellenos de pulpa translúcida verde o amarillenta, muy jugosa y ácida (Iguar y col., 2014).

Además del consumo de frutas, la ingesta de determinados microorganismos también consigue disminuir la grasa corporal al modificar la microbiota intestinal, estimular la síntesis de péptidos que inducen la saciedad, reducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias y/o modificar el perfil lipídico (Dahiya y col., 2017). Este es el caso de *Lactobacillus reuteri*, un microorganismo probiótico que reside en el tracto gastrointestinal humano (Casas y Dobrogosz, 2000) y que produce reuterina, un metabolito secundario de amplio espectro antimicrobiano capaz de modificar la composición de la microbiota y de inhibir patógenos entéricos (Bron y col., 2017). Aunque este tipo de microorganismos se ingieren habitualmente en forma de suplementos, está demostrado que su consumo como parte de un alimento podría aumentar su resistencia al proceso digestivo (Ranadheera y col., 2010). Habitualmente se emplean los productos lácteos fermentados como matrices alimentarias para el desarrollo de alimentos probióticos pero, debido a su elevado contenido en colesterol, su consumo está restringido en individuos afectados por la obesidad. Como alternativa, los zumos de frutas y hortalizas están cobrando mucha importancia como sustrato para el crecimiento de estos microorganismos que, administrados vivos en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Si embargo, estos alimentos habitualmente no reúnen el pH ni el contenido en vitaminas y aminoácidos esenciales necesarios para el óptimo crecimiento de la mayoría de las bacterias ácido-lácticas con efecto probiótico. Es por esto que resulta indispensable, además de seleccionar la cepa más adecuada para cada sustrato, añadir otros ingredientes en la formulación (prebióticos, crioprotectores, extracto de levadura, etc.) y/o aplicar algunas técnicas durante el procesado (microencapsulación, homogeneización a presiones moderadas, impregnación a vacío, etc.) para alcanzar la concentración mínima de  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL ó g al final de la vida útil del producto que se requiere para la declaración a nivel europeo de sus propiedades saludables (Rad y col., 2013).

La homogeneización es una operación unitaria que consiste en aplicar presión a un líquido con el objeto de disminuir el tamaño de las partículas sólidas y las gotas de aceite presentes en el mismo. La homogeneización suele ser utilizada en las industrias de zumos cítricos como alternativa a los tratamientos térmicos tradicionales para mejorar algunos de los atributos de calidad, tales como la viscosidad (Crandall y Davis, 1991), el color (Lee y Coates, 2004), la turbidez (Baker, 1977), la estabilidad de los sólidos en suspensión (Carle y col., 1998) o el rendimiento en zumo (Lortkipanidze y col., 1972). La homogeneización convierte la pulpa sensible en pulpa de fondo (Kupper y col., 1987), modificando así la percepción del sabor en los zumos de frutas (Marsh y col., 2006). Adicionalmente, la aplicación de presiones de homogeneización altas y/o moderadas en zumos de frutas ha demostrado ser menos destructiva para los compuestos de bajo peso molecular responsables de los atributos sensoriales y nutricionales, así como suficientemente efectiva en la inactivación de microorganismos responsables de deterioro (Betoret y col., 2009; Betoret y col., 2012; Gómez y col., 2011). Aplicada a cepas con efecto probiótico, la homogeneización ha permitido aumentar la supervivencia y mejorar sus

propiedades funcionales (Patrignani y col., 2009). En ensayos con cepas de *Lactobacillus paracasei* A13, la aplicación de altas presiones de homogeneización aumentó su hidrofobicidad, directamente relacionada con su capacidad de adhesión a las células intestinales y su resistencia al proceso de digestión (Basson y col., 2007; Tabanelli y col., 2012).

Por todo lo comentado anteriormente, el presente estudio se propone con el objeto de evaluar el efecto del pH y las altas presiones de homogeneización sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas (recuento de viables) de zumo de lulo inoculado con *Lactobacillus reuteri* e incubado durante 24 y 48 h.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Materia prima y obtención del zumo**

Para preparar el zumo se empleó lulo fresco (*Solanum quitoense*) adquirido en un mercado local de la ciudad de Valencia con un grado de madurez adecuado. Previamente a la obtención del zumo, el fruto se lavó con hipoclorito de sodio y agua, se retiró el pedúnculo y se licuó en una licuadora (Phillips Avance Collection Standmixer, 800W 2L) durante 1 min. Finalmente, el jugo obtenido se tamizó primero con un tamiz de acero inoxidable de 700 µm y posteriormente con otro de 500 µm de la marca CISA.

Respecto al microorganismo probiótico se utilizó *Lactobacillus reuteri* Kandler CECT 1988 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia). Para la recuperación de las cepas liofilizadas o congeladas se empleó caldo MRS estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) que, tras la incubación a 37 °C durante 24 h, alcanzó una concentración en torno a 10<sup>9</sup> UFC/mL.

### **Preparación del zumo probiótico**

Una vez obtenido, parte del zumo se homogeneizó en un homogeneizador de alta presión a escala de laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia) a 100 ó 150 MPa. El zumo homogeneizado y sin homogeneizar se pasteurizó a 72 °C durante 3 min. Seguidamente, y de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos (Betoret y col., 2012; Morales y col., 2009), el zumo de lulo se enriqueció con 5 g/L de extracto de levadura (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) y su pH se elevó desde 3 hasta 5,5 ó 6 por adición de bicarbonato sódico. Finalmente, se añadieron 4 mL/L del inóculo preparado anteriormente y se procedió a incubar los zumos a 37 °C durante 24 y 48 h.

### **Determinaciones analíticas**

Todas las determinaciones descritas en este apartado se realizaron al menos por triplicado en los zumos antes y/o después de su inoculación e incubación.

## SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

El contenido en sólidos solubles de los diferentes zumos se determinó en un refractómetro (Abbe Atago, Nar T3, Japón) termostato a 20 °C, mediante la lectura directa del índice de refracción en Brix.

## DETERMINACIÓN DEL pH

El pH de las muestras líquidas se valoró con un pH-metro digital (Mettler Toledo Inlab), previamente calibrado con disoluciones tampón a pH 7 y 4.

## DENSIDAD

La densidad de los zumos se determinó con un picnómetro de líquidos a temperatura ambiente y empleando agua destilada como líquido de referencia:

$$\rho = \frac{m_3 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot \rho_w \quad (1)$$

donde:  $m_0$  = masa del picnómetro vacío (g);  $m_1$  = masa del picnómetro enrasado con agua (g);  $m_3$  = masa del picnómetro con zumo de lulo (g).

## PULPA SUSPENDIDA Y TURBIDEZ

Tal y como describen Betoret y col. (2012), la pulpa suspendida se corresponde con el volumen de precipitado obtenido tras centrifugar 10 mL de zumo a 365 g (para la pulpa más inestable) ó 3000 g (para la pulpa más estable) durante 10 min a 25 °C, para lo cual se empleó una centrífuga P-Selecta Medifriger BL-S. Por otra parte, la turbidez de las muestras estaría relacionada con la transmitancia del sobrenadante resultante medida a 650 nm, para lo cual se empleó un espectrofotómetro UV/Visible Thermo Scientific Helios Zeta.

## TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula de los diferentes zumos se midió en un equipo Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK) provisto de una fuente de luz azul de 470 nm de longitud de onda y un rango de medida entre 0,02 y 200 micras. Para ello fue necesario diluir con agua desionizada una pequeña cantidad de muestra en la celda del difractómetro bajo agitación moderada hasta una obscuración del 8-9%. El índice de refracción del zumo (nube) y del dispersante (agua) fue 1,5 y 1,33 respectivamente. La absorbancia de las partículas de la nube se tomó como 0,01. Cada dilución fue analizada 10 veces.

La distribución de tamaño de partícula del zumo se caracterizó por los diámetros basados en el volumen ( $D[4,3]$ ) y en el área ( $D[3,2]$ ) y por los percentiles  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$ , los cuales representan los diámetros característicos por debajo de los cuales el 10%, 50% y 90% de las partículas se encuentran dentro

de la distribución. Las ecuaciones 2 y 3 definen los diámetros en función del volumen y área respectivamente:

$$D[4,3] = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad (2)$$

$$D[3,2] = \frac{\sum_i n_i d_i^3}{\sum_i n_i d_i^2} \quad (3)$$

donde  $n_i$  es el número de partículas de diámetro  $d_i$ .

## PROPIEDADES ÓPTICAS

El color de los zumos se determinó a partir del espectro de reflexión obtenido con un espectrocolorímetro MINOLTA (modelo CM-3600D), tomando como referencia el iluminante D65, el observador de 10° y excluyendo el brillo de la cubeta. Previamente se calibró el equipo sobre fondo negro y fondo blanco. Para su medida, las muestras se colocaron en cubetas de plástico de 25 mL de capacidad y 2 cm de espesor. A partir de las coordenadas de color obtenidas en el espacio CIE- $L^*a^*b^*$  fue posible estimar las coordenadas psicométricas: tono ( $h^*_{ab}$ ) y croma ( $C^*_{ab}$ ) (ecuaciones 4 y 5:

$$h^*_{ab} = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (4)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

donde:  $a^*$  es la componente rojo-verde y  $b^*$  es la componente amarillo-azul.

## PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Tras varias pruebas, la extracción de los antioxidantes presentes tanto en el fruto como en el zumo se llevó a cabo con una mezcla de metanol-agua 80:20 (v/v) en una proporción 1:5 (m/m). Tras 1 h en agitación, se centrifugó la mezcla a 1000 rpm durante 5 min a 20 °C en una centrífuga Selecta modelo “Medrifriger BL-S”. Las determinaciones se realizaron sobre el sobrenadante resultante.

El contenido en fenoles totales se determinó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999; Wolfe y col., 2003). Este método espectrofotométrico se fundamenta en la reducción del citado reactivo por los compuestos fenólicos presentes en la muestra, lo que resulta en la formación de un complejo azulado (Moraga y col., 2012). Para ello, un volumen de 0,125 mL de extracto, 0,125 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y 0,5 mL de agua bidestilada se hicieron reaccionar durante 6 min en una cubeta de espectrofotómetro. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 1,25 mL de carbonato de sodio al 7% (m/v) y 1 mL de agua bidestilada. Como referencia se utilizó un blanco en donde la muestra se reemplazó por la misma cantidad de agua bidestilada. Transcurridos 90 min, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta U/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de ácido gálico (pureza  $\geq 98\%$ , Sigma-



Aldrich) comprendida entre 0 y 500 mg/L y se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g).

El contenido en flavonoides totales se determinó por aplicación del método colorimétrico del cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) adaptado y descrito por Luximon-Ramma y col. (2005). Para ello, se hicieron reaccionar en una cubeta de espectrofotómetro una alícuota de 1,5 mL de extracto y 1,5 mL de una disolución de cloruro de aluminio al 2% (m/v) en metanol y se dejó en oscuridad durante 10 min. Como referencia se utilizó un blanco en donde la muestra se reemplazó por la misma cantidad de agua bidestilada. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 368 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta U/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de quercetina (pureza  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich) comprendida entre 0 y 350 mg/L y se expresaron en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra (mg EQ/g).

La capacidad antioxidante de los zumos se midió por dos métodos diferentes. El método DPPH, basado en la reducción del radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) por los antioxidantes presentes en la muestra, que pasa de color morado a amarillo pálido (Brand-Williams y col., 1995; Santacruz, 2011). En este caso, se partió de la metodología descrita por Stratil y col. (2006) y Kuskoski y col. (2005) pero con algunas modificaciones. Utilizando una disolución de DPPH<sup>•</sup> 100  $\mu\text{M}$  (39,4  $\mu\text{g/mL}$ ) en metanol (pureza  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich), se hicieron reaccionar en una cubeta de espectrofotómetro 0,1 mL de extracto, 0,9 mL de metanol y 2 mL de la disolución metanol-DPPH<sup>•</sup>. Como referencia se utilizó un blanco en donde la muestra se reemplazó por la misma cantidad de agua bidestilada. La absorbancia se midió tras 0, 30 y 60 min de reacción a 517 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos fueron comparados con una curva patrón de trólox,  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , (pureza  $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich) comprendida entre 0 y 500 mg/L y expresados en miligramos equivalentes de trólox por gramo de muestra (mg TE/g).

El método ABTS mide la decoloración que experimenta el catión  $\text{ABTS}^+$  tras secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra, cambiando de color verde-azulado a incoloro. Para generar el catión  $\text{ABTS}^+$  (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) se siguió la metodología propuesta por Re y col., (1999). Se preparó una disolución del ácido (7 mM, pureza  $\geq 99\%$ ) con persulfato potásico (2,45 mM, pureza  $\approx 99,99\%$ ) en agua bidestilada y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h. Una vez liberado el catión, éste se diluyó en tampón fosfato hasta obtener una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$  leída a 734 nm. Inmediatamente, se hicieron reaccionar 0,1 mL de extracto con 2,9 mL de disolución  $\text{ABTS}^+$ . Como referencia se utilizó un blanco en donde la muestra se reemplazó por la misma cantidad de agua bidestilada. La absorbancia fue medida tras 0, 3 y 7 min de reacción a 734 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. El tampón fosfato fue preparado a partir de dos disoluciones stock: una disolución de fosfato sódico monobásico 0,2 M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y otra de fosfato sódico dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (pureza  $\approx 99\%$ , Sigma-Aldrich). Los resultados obtenidos fueron comparados con una curva patrón de trólox,  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ , (pureza mayor o igual al 97%, Sigma-

Aldrich), comprendida entre 0 y 500 mg/L y expresados en miligramos equivalentes de trólox por gramo de muestra (mg TE/g).

## RECUESTO DE VIABLES

La concentración de *Lactobacillus reuteri* en los diferentes zumos formulados se determinó por el procedimiento de dilución seriada en agua destilada estéril y siembra en placas Petri con agar MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), que se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Statgraphics Centurion XVI.II. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) simples y multifactoriales para evaluar las diferencias entre los productos elaborados, con un nivel de confianza del 95%.

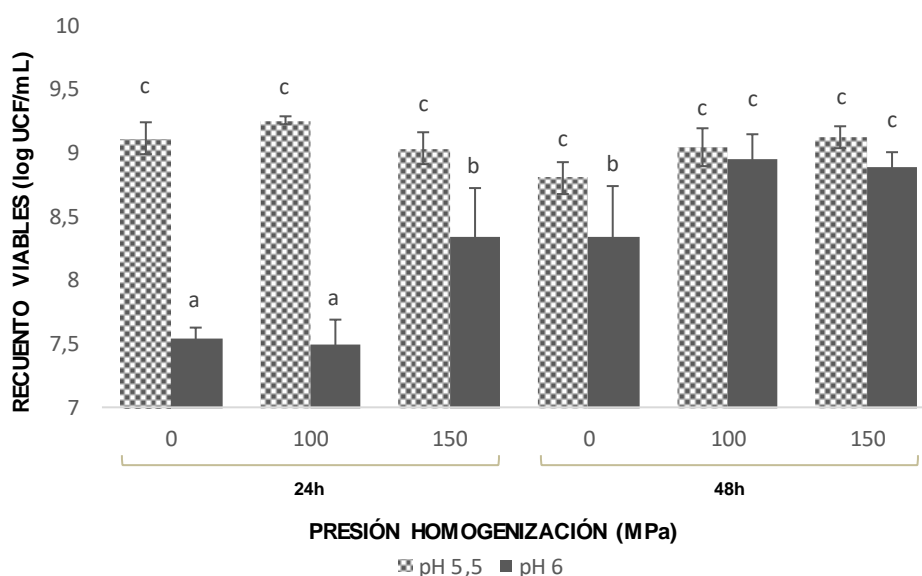
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de las variables de proceso sobre el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* en zumo de lulo

Como se puede observar en la Figura 1, los recuentos obtenidos tras 24 y 48 h de incubación superaron en todos los casos el valor mínimo establecido en  $10^7$  UFC/g necesario para poder afirmar que un alimento tiene carácter probiótico (International Dairy Federation, 1992). Además, puesto que estos valores son notablemente más elevados que los obtenidos por Betoret y col. (2019) tras incubación durante 24 h y con el mismo microorganismo el zumo de lulo natural, se puede afirmar que la adición de bicarbonato de sodio y extracto de levadura a la formulación del mismo resultan decisivos para conseguir un mayor crecimiento microbiano.

Por lo general, los zumos de lulo en los que el pH se ajustó a 5,5 resultaron ser un medio más adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* CECT 925T. En los zumos de lulo ajustados a pH 6 fue necesario incrementar hasta 48 h el tiempo de incubación para alcanzar recuentos microbianos del mismo orden. Sin embargo, aumentar desde 24 hasta 48 h el tiempo de incubación de los zumos de lulo ajustados a pH 5,5 apenas afectó o incluso disminuyó ligeramente el contenido en células vivas. Probablemente la cinética de crecimiento del probiótico en estos zumos sea más rápida, de manera que tras 48 h de incubación la población ya se encontraría en la fase estacionaria y/o de muerte celular debido al agotamiento de nutrientes y/o a la excreción de ácidos orgánicos y otros contaminantes bioquímicos al medio.

Respecto a la homogeneización del zumo previa a su inoculación, ésta no afectó al crecimiento microbiano en los zumos ajustados a pH 5,5 pero lo favoreció significativamente en los zumos ajustados a pH 6. Esta mejora en el crecimiento microbiano en los zumos tras ser sometidos a altas presiones de homogeneización fue observada en estudios anteriores (de, 2018) y se debería a la reducción en el tamaño de partícula y a la consecuente mayor disponibilidad de los nutrientes presentes, lo que parece ser especialmente efectivo en condiciones más adversas.



a,b,c... letras diferentes para una misma serie indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

**FIGURA 1.** Efecto de las variables de proceso sobre el recuento de viables tras 24 y 48 horas de incubación.

## Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades físico-químicas del zumo de lulo

### SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (BRUX), pH Y DENSIDAD

En la Tabla 1 se puede apreciar que, como consecuencia del crecimiento del microorganismo probiótico, los zumos experimentaron con el tiempo de incubación una bajada en el pH y en el contenido en sólidos solubles totales. Esto era de esperar puesto que *Lactobacillus reuteri* es una bacteria ácido-láctica capaz de fermentar los carbohidratos presentes en el zumo y liberar ácido láctico (De Vos y col., 2009; Pot y Tsakalidou, 2009). Ni la presión de homogeneización aplicada ni la cantidad de bicarbonato de sodio añadida para elevar el pH del zumo afectaron de forma significativa a este descenso.

Respecto a la densidad, no se aprecian diferencias significativas entre las diferentes muestras de zumo analizadas. Únicamente cabría resaltar el ligero aumento en la densidad que experimentan los zumos tras la homogeneización lo que, coincidiendo con Martínez (2017), sería consecuencia de la disminución del tamaño de partícula y el aumento en la estabilidad de los sólidos en suspensión.

**TABLA 1.** Brix, pH y densidad de los zumos de lulo sin inocular y tras 24 y 48 h de incubación.

t (h)	SIN HPH		HPH 100 MPa		HPH 150 MPa		
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	
pH	0	5,59 (0,04)	6,457 (0,006)	5,642 (0,010)	6,13 (0,11)	5,623 (0,006)	6,09 (0,05)
	24	4,900 (0,010)	6,23 (0,09)	4,943 (0,006)	6,057 (0,006)	5,377 (0,006)	5,990 (0,010)
	48	4,74 (0,006)	5,20 (0,006)	4,760 (0,006)	5,483 (0,006)	5,210 (0,006)	5,037 (0,010)
*Brix	0	9,6 (0,1)	10,0 (0,1)	9,6 (0,1)	10,0 (0,1)	9,5 (0,1)	10,0 (0,1)
	24	9,2 (0,1)	10,2 (0,1)	9,0 (0,1)	9,9 (0,1)	8,7 (0,1)	10,0 (0,1)
	48	8,8 (0,1)	9,3 (0,1)	8,7 (0,1)	9,2 (0,1)	8,0 (0,1)	8,9 (0,1)
p	0	0,9558 (0,0008)	0,9548 (0,0008)	0,9566 (0,0008)	0,953186 (0,000105)	0,9605 (0,0010)	0,9510 (0,0005)
	24	0,95720 (0,00006)	0,95498 (0,00004)	0,95769 (0,00005)	0,956380 (0,000015)	0,95380 (0,00005)	0,955441 (0,000019)
	48	0,961527 (0,000019)	0,956579 (0,00007)	0,958739 (0,000015)	0,96198 (0,00002)	0,962997 (0,000013)	0,955198 (0,000014)

p densidad en g/cm<sup>3</sup>; \*entre paréntesis, error de la medida.

## TURBIDEZ Y PULPA SUSPENDIDA

En la Tabla 2 se muestran los resultados correspondientes a las determinaciones de turbidez y pulpa suspendida. A la hora de interpretar los resultados debe tenerse en cuenta que se está analizando zumos inoculados con el microorganismo probiótico, de manera que las diferencias que se observan entre ellos pueden estar afectadas por la mayor o menor cantidad de biomasa presente en estos. De hecho, tras 24 h de fermentación con *Lactobacillus reuteri* la cantidad de pulpa separada por centrifugación tanto a 366 g como a 3000 g resultó significativamente más elevada (p-valor < 0,05) que la del zumo equivalente sin homogeneizar; sin embargo, la transmitancia o cantidad de luz transmitida a través del zumo solo aumentó en determinados casos y siempre tras la centrifugación del zumo a 3000 g, lo que indica que las bacterias presentes se mantienen en suspensión aumentando la turbidez del zumo. Por su parte, la aplicación de altas presiones de homogeneización y la adición de una cantidad más elevada de bicarbonato sódico también dieron como resultado zumos más turbios o con una nube más estable. Este mismo efecto de la homogeneización sobre los valores de transmitancia fue observado por otros autores (Betoret y col., 2009) en zumo de mandarina y explicado en términos de la disminución del tamaño de las partículas suspendidas. El zumo de lulo ajustado a pH 6 también presentó antes de la inoculación con el probiótico una cantidad de precipitado significativamente más elevada que el ajustado a pH 5,5.

**TABLA 2.** Turbidez y porcentaje de pulpa suspendida de los zumos de lulo sin inocular y tras 24 y 48 h de incubación.

		SIN HPH		HPH 100 MPa		HPH 150 MPa	
		pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
%Pulpa 366g	0h	0,45 (0,03) <sup>a</sup>	0,63 (0,05) <sup>cdef</sup>	0,542 (0,015) <sup>abc</sup>	0,47 (0,05) <sup>a</sup>	0,525 (0,010) <sup>ab</sup>	0,467 (0,008) <sup>a</sup>
	24h	0,542 (0,008) <sup>abc</sup>	0,881 (0,008) <sup>h</sup>	0,73 (0,03) <sup>g</sup>	0,543 (0,016) <sup>abc</sup>	0,48 (0,03) <sup>a</sup>	0,541 (0,019) <sup>abc</sup>
	48h	0,59 (0,18) <sup>bcde</sup>	0,49 (0,09) <sup>a</sup>	0,64 (0,03) <sup>defg</sup>	0,55 (0,05) <sup>abcd</sup>	0,71 (0,11) <sup>g</sup>	0,67 (0,04) <sup>efg</sup>
Transmitancia 366g	0h	24,0 (1,4) <sup>k</sup>	18,4 (1,9) <sup>i</sup>	9,6 (0,8) <sup>d</sup>	7,3 (0,12) <sup>bc</sup>	16,1 (0,5) <sup>fg</sup>	6,6 (0,2) <sup>b</sup>
	24h	17,1 (0,3) <sup>gh</sup>	9,3 (0,2) <sup>d</sup>	7,9 (0,6) <sup>c</sup>	6,7 (0,2) <sup>b</sup>	5,05 (0,12) <sup>a</sup>	4,262 (0,017) <sup>a</sup>
	48h	15,1 (0,4) <sup>ef</sup>	15,3 (0,3) <sup>ef</sup>	14,6 (0,5) <sup>e</sup>	4,3 (0,3) <sup>a</sup>	20,8 (1,1) <sup>j</sup>	18,2 (0,7) <sup>hi</sup>
%Pulpa 3000g	0h	0,19 (0,03) <sup>a</sup>	0,376 (0,011) <sup>bcde</sup>	0,27 (0,14) <sup>abc</sup>	0,30 (0,14) <sup>abcd</sup>	0,26 (0,09) <sup>ab</sup>	0,29 (0,006) <sup>abcd</sup>
	24h	0,44 (0,03) <sup>cdefg</sup>	0,7 (1,1) <sup>efg</sup>	0,6 (0,2) <sup>g</sup>	0,46 (0,13) <sup>defg</sup>	0,46 (0,04) <sup>defg</sup>	0,58 (0,15) <sup>fg</sup>
	48h	0,52 (0,17) <sup>efg</sup>	0,42 (0,03) <sup>bcdef</sup>	0,45 (0,04) <sup>defg</sup>	0,42 (0,03) <sup>bcdefg</sup>	0,59 (0,04) <sup>g</sup>	0,858 (0,017) <sup>h</sup>
Transmitancia 3000g	0h	54,2 (0,9) <sup>ghi</sup>	49,1 (0,4) <sup>def</sup>	51,3 (3,3) <sup>fg</sup>	39,8 (0,8) <sup>b</sup>	37,2 (1,3) <sup>ab</sup>	49,5 (0,13) <sup>ef</sup>
	24h	64,3 (0,5) <sup>k</sup>	46,3 (1,9) <sup>cd</sup>	61 (2) <sup>j</sup>	44,1 (1,5) <sup>c</sup>	48 (3) <sup>de</sup>	35 (4) <sup>a</sup>
	48h	54,5 (1,9) <sup>hi</sup>	51,7 (1,7) <sup>gh</sup>	55,6 (0,7) <sup>i</sup>	50,6 (1,8) <sup>ef</sup>	38,9 (0,7) <sup>b</sup>	50,4 (0,3) <sup>ef</sup>

Entre paréntesis, desviación estándar de tres medidas. a,b,c,...letras diferentes para una misma propiedad indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

## TAMAÑO DE PARTÍCULA

En la Tabla 3 se muestran las propiedades relacionadas con el tamaño de partícula de los diferentes zumos analizados. Como se puede observar, los diámetros D[4,3] y D[3,2] de los zumos no homogeneizados siguieron un comportamiento muy parecido, aumentando significativamente (p-valor < 0,05) al aumentar el pH del medio y disminuyendo con la incubación y su duración. Respecto a la homogeneización, su aplicación a los zumos previa a su inoculación con *Lactobacillus reuteri* aumentó significativamente (p-valor < 0,05) el tamaño medio de las partículas presentes en los zumos ajustados a pH 5,5, pero lo disminuyó en el caso de los zumos ajustados a pH 6. Esta misma tendencia se mantuvo tras incubación durante 24 y 48 h. Comparando estos resultados con los de crecimiento de *Lactobacillus reuteri* en los zumos comentados anteriormente, se podría afirmar que existe una relación más o menos directa entre la concentración de microorganismo en los zumos y el tamaño medio de sus partículas, de manera que los zumos con un mayor contenido microbiano presentan en términos generales partículas de mayor tamaño. Este efecto estaría enmascarando en los zumos de lulo ajustados a pH 5,5 el descenso en el tamaño de partícula que era de esperar debido a la aplicación de altas presiones de homogeneización.

**TABLA 3.** Tamaño de partícula en  $\mu\text{m}$  de los zumos de lulo sin inocular y tras 24 y 48 h de incubación.

	SIN HPH		HPH 100 MPa		HPH 150 MPa		
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	
0	D[4,3]	35 (2) <sup>f</sup>	51 (5) <sup>gh</sup>	60,4 (1,9) <sup>jk</sup>	34 (2) <sup>ef</sup>	54,7 (1,4) <sup>hi</sup>	22,7 (0,9) <sup>b</sup>
	D[3,2]	9,54 (0,14) <sup>h</sup>	10,20 (0,18) <sup>i</sup>	12,9 (0,5) <sup>j</sup>	8,95 (0,10) <sup>g</sup>	14,0 (0,3) <sup>k</sup>	8,97 (0,15) <sup>g</sup>
	d <sub>10</sub>	4,50 (0,03) <sup>k</sup>	4,50 (0,05) <sup>k</sup>	5,395 (0,117) <sup>m</sup>	4,260 (0,019) <sup>i</sup>	5,79 (0,14) <sup>n</sup>	4,66 (0,04) <sup>l</sup>
	d <sub>50</sub>	11,52 (0,19) <sup>cdef</sup>	12,7 (0,3) <sup>fg</sup>	17,4 (1,6) <sup>i</sup>	10,79 (0,13) <sup>bcdef</sup>	20,9 (0,9) <sup>j</sup>	10,59 (0,19) <sup>bcde</sup>
	d <sub>90</sub>	115 (5) <sup>e</sup>	162 (13) <sup>gh</sup>	168 (3) <sup>h</sup>	115 (6) <sup>e</sup>	144 (5) <sup>f</sup>	67 (6) <sup>b</sup>
	D[4,3]	31 (3) <sup>def</sup>	53 (2) <sup>ghi</sup>	52,8 (1,2) <sup>ghi</sup>	34,9 (1,5) <sup>ef</sup>	62 (4) <sup>k</sup>	31 (3) <sup>d,e,f</sup>
24h	D[3,2]	5,54 (0,12) <sup>b</sup>	8,45 (0,05) <sup>f</sup>	7,34 (0,13) <sup>e</sup>	6,41 (0,08) <sup>c</sup>	9,6 (0,6) <sup>h</sup>	6,3 (0,3) <sup>c</sup>
	d <sub>10</sub>	2,50 (0,04) <sup>c</sup>	3,88 (0,02) <sup>i</sup>	2,95 (0,03) <sup>efg</sup>	3,04 (0,02) <sup>g</sup>	3,65 (0,22) <sup>h</sup>	2,86 (0,09) <sup>de</sup>
	d <sub>50</sub>	9,3 (0,2) <sup>ab</sup>	12,44 (0,12) <sup>efg</sup>	14,2 (0,5) <sup>gh</sup>	9,83 (0,14) <sup>abcd</sup>	44 (6) <sup>k</sup>	10,2 (0,6) <sup>bcd</sup>
	d <sub>90</sub>	94 (9) <sup>d</sup>	169 (8) <sup>h</sup>	153 (4) <sup>fg</sup>	114 (5) <sup>e</sup>	153 (7) <sup>fg</sup>	96 (8) <sup>d</sup>
	D[4,3]	28,1 (1,7) <sup>cd</sup>	27 (3) <sup>cd</sup>	49 (3) <sup>g</sup>	24,9 (1,3) <sup>bc</sup>	56 (7) <sup>ij</sup>	18,1 (0,5) <sup>a</sup>
	D[3,2]	5,83 (0,10) <sup>b</sup>	6,18 (0,06) <sup>c</sup>	6,8 (0,2) <sup>d</sup>	4,74 (0,02) <sup>a</sup>	7,4 (0,3) <sup>a</sup>	4,99 (0,12) <sup>a</sup>
48h	d <sub>10</sub>	2,76 (0,05) <sup>d</sup>	2,90 (0,02) <sup>ef</sup>	2,88 (0,10) <sup>e</sup>	1,987 (0,008) <sup>a</sup>	3,01 (0,11) <sup>fg</sup>	2,27 (0,05) <sup>b</sup>
	d <sub>50</sub>	9,35 (0,15) <sup>ab</sup>	9,69 (0,13) <sup>abc</sup>	11,7 (0,6) <sup>def</sup>	8,08 (0,05) <sup>a</sup>	15,2 (1,5) <sup>h</sup>	7,9 (0,3) <sup>a</sup>
	d <sub>90</sub>	91 (3) <sup>cd</sup>	84 (8) <sup>cd</sup>	146 (10) <sup>f</sup>	83 (6) <sup>c</sup>	155 (15) <sup>fg</sup>	45 (6) <sup>a</sup>

Entre paréntesis, desviación estándar de cinco medidas. <sup>a,b,c,...</sup>letras diferentes para una misma propiedad indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Al comparar estos resultados con los obtenidos por Martínez (2017) para el zumo de lulo sin inocular y homogeneizado a diferentes presiones (0, 50, 100 y 150 MPa) se aprecian notables diferencias, posiblemente debidas a que el proceso de obtención del zumo en uno y otro caso no sea exactamente el mismo. En cambio, el tamaño de partícula de los zumos de lulo obtenidos en este trabajo se asemeja al del zumo de arándano comercial analizado por Castagnini (2014).

## PROPIEDADES ÓPTICAS

El efecto de la presión de homogeneización y el crecimiento microbiano sobre los parámetros CIE-L\*a\*b\* y sobre las coordenadas psicométricas tono (hab\*) y croma (Cab\*), se muestran en la Tabla 4.

Comparando los resultados de luminosidad (L\*) con los obtenidos en un estudio previo realizado por Martínez (2017), se observa que la luminosidad del zumo de lulo rectificado con bicarbonato de sodio hasta pH 5,5 ó 6 es notablemente más baja que la del zumo de lulo fresco a su pH natural (en torno a  $40,4 \pm 0,4$ ). Prueba de ello es que al aumentar el pH desde 5,5 hasta 6 el zumo se volvió ligeramente más oscuro y esto se vio favorecido por la aplicación de altas presiones de homogeneización. Por el contrario, la inoculación y posterior incubación de los zumos produjo en la mayoría de los casos un aumento notable en la luminosidad de las muestras.

La adición de bicarbonato de sodio a la formulación del zumo de lulo también produjo un aumento notable en la intensidad de color rojo con respecto al zumo de lulo fresco a su pH natural caracterizado por Martínez (2017), el cual presentó valores de la coordenada a\* ligeramente más bajos ( $9,5 \pm 0,2$ ) a los mostrados en la Tabla 4. El crecimiento de *Lactobacillus reuteri* en el zumo de lulo también implicó un aumento significativo en el valor de la coordenada a\* de los zumos, lo que, junto a la adición de bicarbonato de sodio, enmascara el efecto depresor esperado debido a la aplicación de altas presiones de homogeneización.

Respecto a la coordenada b\*, la rectificación del pH del zumo de lulo con bicarbonato de sodio produjo un notable descenso en la intensidad de color amarillo (valores de b\* más bajos que los del zumo a su pH natural, los cuales oscilan entorno a  $34,9 \pm 1,4$ ). Puesto que los valores de la coordenada b\* fueron muy similares a los de la coordenada a\*, la intensidad de color azul-amarillo se comportó del mismo modo frente a las variables de proceso consideradas.

A pesar de todos estos cambios en las coordenadas L\*, a\* y b\*, la coordenada psicrométrica hab\* presentó valores muy similares en todos los zumos, con independencia de su pH, la presión de homogeneización aplicada o el tiempo de incubación. Por su parte, el croma tomó valores más bajos en los zumos ajustados a pH 6 y en todos los casos aumentó con el tiempo de incubación. Sin embargo, el efecto de la presión de homogeneización sobre la coordenada psicrométrica Cab\* no fue tan evidente y se vio más afectado por el nivel en el que se presentaron las otras variables de proceso consideradas.

**TABLA 4.** Propiedades ópticas de los zumos de lulo sin inocular y tras 24 y 48 h de incubación.

	SIN HPH		HPH 100 MPa		HPH 150 MPa		
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	
0	L*	3,33 (0,03) <sup>cd</sup>	3,32 (0,12) <sup>c</sup>	3,54 (0,04) <sup>e</sup>	2,986 (0,007) <sup>b</sup>	3,91 (0,15) <sup>g</sup>	3,03 (0,12) <sup>b</sup>
	a*	16,5 (0,2) <sup>e</sup>	12,3 (0,6) <sup>a</sup>	18,26 (0,09) <sup>f</sup>	15,16 (0,11) <sup>d</sup>	13,2 (0,2) <sup>b</sup>	14,6 (0,6) <sup>c</sup>
	b*	16,8 (0,2) <sup>e</sup>	12,7 (0,6) <sup>a</sup>	18,61 (0,10) <sup>f</sup>	15,45 (0,10) <sup>d</sup>	13,7 (0,2) <sup>b</sup>	14,9 (0,6) <sup>c</sup>
	hab*	44,429 (0,019) <sup>cde</sup>	43,99 (0,04) <sup>b</sup>	44,469 (0,017) <sup>efg</sup>	44,454 (0,009) <sup>def</sup>	43,79 (0,06) <sup>a</sup>	44,39 (0,04) <sup>c</sup>
	Cab*	23,6 (0,3) <sup>e</sup>	17,7 (0,9) <sup>a</sup>	26,07 (0,13) <sup>f</sup>	21,64 (0,15) <sup>d</sup>	19,1 (0,3) <sup>b</sup>	20,8 (0,8) <sup>c</sup>
	24h	L*	4,65 (0,05) <sup>j</sup>	3,44 (0,12) <sup>de</sup>	4,68 (0,03) <sup>j</sup>	2,83 (0,02) <sup>a</sup>	3,32 (0,06) <sup>cd</sup>
a*		25,87 (0,17) <sup>l</sup>	12,64 (0,13) <sup>ab</sup>	27,1 (0,3) <sup>m</sup>	15,36 (0,15) <sup>d</sup>	18,28 (0,16) <sup>f</sup>	22,2 (0,2) <sup>i</sup>
b*		26,29 (0,17) <sup>l</sup>	13,10 (0,13) <sup>a</sup>	27,5 (0,3) <sup>m</sup>	15,62 (0,14) <sup>d</sup>	18,57 (0,16) <sup>f</sup>	22,56 (0,19) <sup>i</sup>
hab*		44,542 (0,007) <sup>hi</sup>	43,97 (0,07) <sup>b</sup>	44,579 (0,016) <sup>ji</sup>	44,519 (0,016) <sup>gh</sup>	44,533 (0,015) <sup>hi</sup>	44,596 (0,009) <sup>ji</sup>
Cab*		36,8 (0,2) <sup>l</sup>	18,20 (0,18) <sup>a</sup>	38,6 (0,4) <sup>m</sup>	21,9 (0,2) <sup>f</sup>	26,1 (0,2) <sup>f</sup>	31,7 (0,3) <sup>i</sup>
48h		L*	4,89 (0,06) <sup>h</sup>	4,07 (0,10) <sup>k</sup>	4,37 (0,04) <sup>i</sup>	4,29 (0,07) <sup>i</sup>	3,77 (0,03) <sup>f</sup>
	a*	23,34 (0,12) <sup>j</sup>	20,8 (0,8) <sup>h</sup>	22,54 (0,16) <sup>j</sup>	22,22 (0,09) <sup>i</sup>	19,9 (0,3) <sup>g</sup>	24,3 (0,2) <sup>k</sup>
	b*	23,85 (0,12) <sup>j</sup>	21,2 (0,8) <sup>h</sup>	22,96 (0,15) <sup>i</sup>	22,63 (0,10) <sup>i</sup>	20,2 (0,3) <sup>g</sup>	24,8 (0,2) <sup>k</sup>
	hab*	44,385 (0,016) <sup>c</sup>	44,458 (0,016) <sup>ef</sup>	44,470 (0,017) <sup>efg</sup>	44,475 (0,014) <sup>efg</sup>	44,493 (0,015) <sup>fgh</sup>	44,407 (0,012) <sup>cd</sup>
	Cab*	33,37 (0,17) <sup>j</sup>	29,6 (1,2) <sup>h</sup>	32,2 (0,2) <sup>i</sup>	31,72 (0,14) <sup>i</sup>	28,4 (0,5) <sup>g</sup>	34,7 (0,4) <sup>k</sup>

Entre paréntesis, desviación estándar de tres medidas: a,b,c,...letras diferentes para una misma propiedad indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

## **Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades antioxidantes del zumo de lulo**

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos para fenoles y flavonoides totales. Como se puede comprobar, el contenido en flavonoides totales resultó ligeramente inferior al de fenoles totales, lo que indica que estos son los principales compuestos fenólicos presentes en el zumo de lulo. En la mayoría de los casos, el contenido en fenoles totales se vio significativamente incrementado tras la incubación de los zumos de lulo durante 24 h con *Lactobacillus reuteri*. Similares resultados fueron obtenidos por Hole y col. (2012) en un estudio llevado a cabo en granos de cereales, cuyo contenido en compuestos fenólicos aumentó tras la fermentación con diferentes cepas del género *Lactobacillus*. Según apuntan estos autores, la presencia de determinadas bacterias ácido-lácticas favorece la liberación de ácidos fenólicos, aumentando su biodisponibilidad y su detección por medio de técnicas espectrofotométricas. Sin embargo, al aumentar de 24 a 48 h el tiempo de incubación se produjo un notable descenso en el contenido en fenoles totales, más acusado en los zumos que presentaron una cinética de crecimiento microbiano más rápido (todos los zumos ajustados a pH 5,5 y el zumo homogeneizado a 150 MPa y posteriormente ajustado a pH 6). La aplicación de altas presiones de homogeneización también podría favorecer un descenso más rápido en el contenido en fenoles totales ya que, al reducir el tamaño de partícula, la superficie expuesta al oxígeno y otros agentes responsables del deterioro aumenta.

En comparación con los valores obtenidos por otros autores, el contenido en fenoles totales presentó valores significativamente más bajos a los mostrados por Gancel y col. (2008), quienes encontraron valores de  $5,05 \pm 0,63$  mg EAG/g de muestra fresca, pero muy similares a los hallados por Contreras-Calderón y col. (2011) para el fruto, en torno a  $0,58 \pm 0,02$  mg EAG/g de muestra fresca, por Igual y col. (2014), en torno a  $0,811 \pm 0,016$  mg EAG/g de muestra fresca, y por Vasco y col. (2008), en torno a  $0,91 \pm 0,17$  mg EAG/g de muestra fresca. Teniendo en cuenta que estos valores se analizaron en fruto fresco, podemos afirmar que durante el proceso de elaboración y ajuste del pH de los zumos existe una pérdida importante de compuestos fenólicos. Sin embargo, la aplicación de altas presiones de homogeneización favoreció de forma positiva, mediante un ligero aumento, el contenido en fenoles totales y flavonoides presentes en las muestras, debido a la disminución del tamaño de partícula y al consecuente aumento en la estabilidad de la pulpa en suspensión.



**TABLA 5.** Contenido en fenoles y flavonoides totales de los zumos de lulo sin inocular y tras 24 y 48 h de incubación.

		SIN HPH		HPH 100 MPa		HPH 150 MPa	
		pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
<b>Fenoles (mg EAG/g)</b>	<b>0</b>	0,193 (0,002) <sup>cdef</sup>	0,164 (0,007) <sup>ab</sup>	0,189 (0,006) <sup>cde</sup>	0,177 (0,007) <sup>bcd</sup>	0,169 (0,008) <sup>abc</sup>	0,177 (0,010) <sup>bcd</sup>
	<b>24h</b>	0,310 (0,006) <sup>g</sup>	0,292 (0,015) <sup>g</sup>	0,307 (0,019) <sup>g</sup>	0,169 (0,006) <sup>abc</sup>	0,20 (0,03) <sup>ef</sup>	0,21 (0,04) <sup>f</sup>
	<b>48h</b>	0,188 (0,006) <sup>bcde</sup>	0,190 (0,009) <sup>cdef</sup>	0,192 (0,015) <sup>cdef</sup>	0,187 (0,003) <sup>bcde</sup>	0,15 (0,02) <sup>a</sup>	0,198 (0,016) <sup>def</sup>
<b>Flavonoides (mg EQ/g)</b>	<b>0</b>	0,119 (0,002) <sup>def</sup>	0,124 (0,004) <sup>g</sup>	0,120 (0,004) <sup>efg</sup>	0,123 (0,003) <sup>fg</sup>	0,1171 (0,0014) <sup>de</sup>	0,119 (0,002) <sup>defg</sup>
	<b>24h</b>	0,111 (0,003) <sup>bc</sup>	0,131 (0,005) <sup>h</sup>	0,107 (0,005) <sup>ab</sup>	0,119 (0,004) <sup>def</sup>	0,119 (0,002) <sup>def</sup>	0,115 (0,002) <sup>cd</sup>
	<b>48h</b>	0,1053 (0,0006) <sup>a</sup>	0,1063 (0,0006) <sup>a</sup>	0,106 (0,003) <sup>a</sup>	0,1052 (0,0008) <sup>a</sup>	0,104 (0,004) <sup>a</sup>	0,1085 (0,0013) <sup>ab</sup>

Entre paréntesis, desviación estándar de tres medidas: a,b,c,...letras diferentes para una misma propiedad indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

En la Tabla 6 se muestra la capacidad antioxidante total de los zumos de lulo medida por los métodos DPPH y ABTS. En ambos casos se obtuvieron valores muy similares, lo que indica que los dos métodos empleados presentan una sensibilidad parecida por los compuestos con actividad antioxidante presentes en el zumo de lulo. Como se puede observar, los valores obtenidos por el método DPPH siguieron una tendencia similar a la comentada anteriormente para el contenido en fenoles totales, alcanzando valores máximos tras 24 h de fermentación y en los zumos ajustados a pH 5,5. Sin embargo, la capacidad antioxidante medida por el método del radical ABTS disminuyó con el tiempo de fermentación, con la homogeneización y con la cantidad de bicarbonato de sodio añadida al zumo.

En comparación con los valores publicados por otros autores, la capacidad antioxidante medida por el método del radical ABTS tomó valores ligeramente inferiores a los obtenidos por Contreras-Calderón y col. (2011) en lulo fresco (en torno a  $3,1 \pm 0,2$  mg ET/g de muestra fresco) y a los obtenidos por Martínez (2017) en zumo de lulo homogeneizado y sin homogeneizar (en torno a  $1,8 \pm$  mg ET/g). Respecto a la capacidad antioxidante medida por el método DPPH, Vasco y col. (2008) obtuvo también en el fruto de lulo valores superiores a los mostrados en este trabajo (en torno a  $0,8 \pm 0,2$  mg TE/g de muestra fresca). Tal y como se ha comentado anteriormente para los compuestos fenólicos, la elaboración y el ajuste del pH del zumo de lulo a partir del fruto tiene un efecto negativo sobre su capacidad para secuestrar radicales libres.

**TABLA 6.** Actividad antioxidante total de los zumos de lulo sin inocular y tras 24 y 48 h de incubación.

		SIN HPH		HPH 100 MPa		HPH 150 MPa	
		pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
DPPH (mg ET/g)	0	0,458 (0,015) <sup>c</sup>	0,369 (0,018) <sup>a</sup>	0,453 (0,012) <sup>c</sup>	0,405 (0,011) <sup>abc</sup>	0,38 (0,02) <sup>ab</sup>	0,44 (0,03) <sup>c</sup>
	24h	0,624 (0,014) <sup>d</sup>	0,446 (0,009) <sup>c</sup>	0,623 (0,08) <sup>d</sup>	0,58 (0,10) <sup>de</sup>	0,538 (0,013) <sup>d</sup>	0,52 (0,03) <sup>d</sup>
	48h	0,46 (0,04) <sup>c</sup>	0,550 (0,002) <sup>d</sup>	0,52 (0,03) <sup>d</sup>	0,522 (0,016) <sup>cd</sup>	0,45 (0,03) <sup>c</sup>	0,429 (0,018) <sup>bc</sup>
ABTS (mg ET/g)	0	0,63 (0,05) <sup>k</sup>	0,488 (0,018) <sup>gh</sup>	0,617 (0,016) <sup>k</sup>	0,50 (0,06) <sup>ghi</sup>	0,42 (0,04) <sup>ef</sup>	0,578 (0,007) <sup>jk</sup>
	24h	0,55 (0,08) <sup>hij</sup>	0,46 (0,08) <sup>fg</sup>	0,484 (0,007) <sup>gh</sup>	0,21 (0,04) <sup>a</sup>	0,27 (0,04) <sup>abc</sup>	0,31 (0,02) <sup>c</sup>
	48h	0,56 (0,04) <sup>ijk</sup>	0,39 (0,03) <sup>de</sup>	0,426 (0,016) <sup>ef</sup>	0,319 (0,012) <sup>cd</sup>	0,23 (0,02) <sup>ab</sup>	0,296 (0,003) <sup>bc</sup>

Entre paréntesis, desviación estándar de tres medidas. <sup>a,b,c,...</sup>letras diferentes para una misma propiedad indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el zumo de lulo es un medio adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* CECT 925T, especialmente cuando su pH se ajusta a 5,5, y que la homogeneización previa a la inoculación solo mejora los recuentos cuando el pH del zumo se ajusta a 6. Al aumentar de 24 a 48 h el tiempo de incubación los recuentos apenas varían (en el caso de los zumos a pH 5,5) o aumentan significativamente (en el caso de los zumos a pH 6).

Respecto a las propiedades fisicoquímicas de los zumos, éstas se vieron afectadas en mayor o menor medida según el mayor o menor crecimiento microbiano. En términos generales, los zumos con un mayor contenido en células vivas resultaron más turbios, presentaron un tamaño medio de partícula más elevado y un mayor contenido de sólidos sedimentables, además de experimentar mayores cambios en el color. El crecimiento microbiano en los zumos también mejoró el contenido en fenoles y flavonoides totales, junto a la capacidad antioxidante total medida por el método DPPH.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del laboratorio de Alimentos Funcionales del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo de la Universitat Politècnica de València, y en especial a Leidy Indira Hinestroza por toda su dedicación.

## REFERENCIAS

- Albornoz-López, R. & Pérez-Rodrigo, I. (2012). Nutrición y síndrome metabólico. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 32(3), 92-97.
- Baker, R.A. (1977). Process to control juice cloud. Symposium of the International Society of Citriculture. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 751-755.
- Basson, A., Flemming, L.A. & Chenia, H.Y. 2007. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecology* 55, 1-14.
- Betoret, E., Betoret, N., Carbonell, J.V. & Fito, P. (2009). Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering* 92, 18-23.

- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N. & Fito, P. (2012). Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering* 111, 28–33.
- Betoret, N., Hinestroza, L.I., Seguí, L. & Barrera, C. (2019). Probiotics and Other Bioactive Compounds with Proven Effect Against Obesity and Hypertension: Food Design Opportunities from Lulo Fruit (*Solanum quitoense*). In: *Nutraceuticals: Past, Present and Future*. IntechOpen.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology* 28(1), 25-30.
- Bron, P.A., Kleerebezem, M., Brummer, R.J., Cani, P.D., Mercenier, A., MacDonald, T.T., ... & Wells, J.M. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition* 117(1), 93-107.
- Carle, R., Jauss, A. & Fuesser, H. (1998). Cloud stability of pulp-containing tropical fruit nectars. *Fruit Processing* 8(7), 266-268, 270-272.
- Casas, I.A. & Dobrogosz, W.J., (2000). Validación del concepto de probiótico: El *Lactobacillus reuteri* confiere protección de amplio espectro contra la enfermedad en seres humanos y animales. *Ecol. Microb. Salud Enf.* 12, 247–285.
- Castagnini, J.M. (2014). Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International* 44, 2047–2053.
- Crandall, P.G. & Davis, K.C. (1991). Viscosity reduction and reformation of structure in orange concentrate as affected by homogenization within commercial taste evaporators. *Journal of Food Science* 56, 1360–1364.
- Dahiya, D.K., Puniya, M., Shandilya, U.K., Dhewa, T., Kumar, N., Kumar, S., ... & Shukla, P. (2017). Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: a review. *Frontiers in microbiology* 8, 563.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* second edition. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- DiBaise, J.K., Zhang, H., Crowell, M.D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G.A., & Rittmann, B.E. (2008). Gut microbiota and its possible relationship with obesity. In: *Mayo clinic proceedings* (Vol. 83, No. 4, pp. 460-469). Elsevier.
- Farías, M.M., Silva, C., & Rozowski, J. (2011). Microbiota intestinal: rol en obesidad. *Revista chilena de nutrición* 38(2), 228-233.
- Forero, D.P., Masatani, C., Fujimoto, Y., Coy-Barrera, E., Peterson, D., & Osorio, C. (2016). Spermidine Derivatives in Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) Fruit: Sensory (Taste) versus Biofunctional (ACE-Inhibition) Properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 64, 5375–5383.
- Gancel, A.L., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Ruales, J. & Vaillant, F. (2008). Identifying carotenoids and phenolic compounds in naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. puyo hybrid), an andean fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11890–11899.
- Gómez, P.L., Welti-Chanes, J. & Alzamora, S.M. 2011. Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 2, 447-465.
- Guacho, M.B. (2018). Fermentación de zumo de clementina con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063): efecto de la trehalosa y la homogeneización sobre el contenido en compuestos antioxidantes. Trabajo Fin de Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad Alimentaria. Universitat Politècnica de València.
- Hole, A., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J. & Sahlstrom, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 6369-6375.
- Igual, M., Ramires, S., Mosquera, L.H., & Martínez-Navarrete, N. (2014). Optimization of spray drying conditions for lulo (*Solanum quitoense* L.) pulp. *Powder Technology* 256, 233–238.
- International Dairy Federation (IDF), 1992. Physiological and functional properties of probiotics. *Bulletin of International Dairy Federation* 272, 17-22.
- Kupper, P.L., Moore, K.L. & Swaine, R.L. (1987). Fruit juice containing diet beverage. US Patent 4690827.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)* 25(4):726-732.

- Lee, H.S. & Coates, G.A. (2004). Pigment extraction system and method. United States patent US20040258809-A1.
- Lortkipanidze, R.K., Anikeichik, N.M., Yakobashvili, R.A., Bolkovadze, M.K. (1972). Homogenizer in citrus juice production line. *Konservnaya i Ovoshchesushil'naya Promyshlennost* 7, 9-10.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K., Dexter, D. & Aruoma, O. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanicins in Mauritian black teas. *Food Research International* 38, 357-367.
- Mai, V., McCrary, Q.M., Sinha, R., & Gleib, M. (2009). Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutrition journal* 8(1), 49.
- Marsh, K.B., Friel, E.N., Gunson, A., Lund, C. & MacRae, E. (2006). Perception of flavour in standardised fruit pulps with additions of acids or sugars. *Food Quality and Preference* 17(5), 376-386.
- Martínez, A.L. (2017). Caracterización del fruto de lulo (*Solanum quitoense* Lam) y efecto de las altas presiones de homogenización sobre las propiedades del zumo. Posibilidades de utilización en el desarrollo de alimentos funcionales de interés en el departamento del Chocó (Colombia). Trabajo Fin de Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos. Universitat Politècnica de València
- Moraga, G., Igual, M., García-Martínez, E., Mosquera, L.H. & Martínez-Navarrete, N. (2012). Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. *Journal of Food Engineering* 112(3), 191-199.
- Patrignani F., Vannini L., Leroy S., Lanciotti R. & Guerzoni M.E. (2009). Effect of high pressure homogenization on *S. cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology* 136, 26–31.
- Pot, B., Tsakalidou, E., 2009. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. En *Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic. presentes en productos lácteos*. *Ars Pharmaceutica* 41(3), págs.287-292. probiótico. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politècnica de Valencia.
- Rad, A.H., Torab, R., Mortazavian, A.M., Mehrabany, E.V., y Mehrabany, L.V. (2013). Can probiotics prevent or improve common cold and influenza? *Nutrition* 29, 805–806.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., & Adams, M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43, 1–7.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27, 1–11.
- Santacruz, L.A. (2011). Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.
- Stratil, P., Klejdus, B. & Kubán, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 607-616.
- Tabanelli, G., Burns, P., Patrignani, F., Gardini, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J. & Vinderola, G. (2012). Effect of a non-lethal high-pressure homogenization treatment on the *in vivo* response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology* 32, 302-307.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111(4), 816–823.
- Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of Apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 609-614.