



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

**OBTENCIÓN DE APERITIVOS DE  
MANZANA CON EFECTO PROBIÓTICO  
MEDIANTE IMPREGNACIÓN CON  
*LACTOBACILLUS RHAMNOSUS***

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**Autora:** Arantxa Carrascosa Morelló

**Tutora UPV:** Amparo Chiralt Boix

**Tutora externa:** Helena Núñez

**Cotutor Externo:** Ricardo Simpson

**Curso académico 2018-2019**

**Valencia, julio de 2019**

# OBTENCIÓN DE APERITIVOS DE MANZANA CON EFECTO PROBIÓTICO MEDIANTE IMPREGNACIÓN CON *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS*

Valencia, julio 2019

## RESUMEN

Las frutas y las verduras son alimentos que juegan un papel fundamental en una dieta saludable. En primer lugar por su gran aporte de vitaminas y minerales; y, en segundo lugar porque contienen gran cantidad de agua, fibra y antioxidantes naturales. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un consumo mínimo de 400 g diarios de estos alimentos. Sin embargo, se estima que solo el 15% de la población consume 5 o más porciones de fruta y verdura al día, como es recomendado.

Para hacer frente al bajo consumo de este tipo de alimentos, se ha decidido desarrollar un snack saludable de manzana para ser consumido como aperitivo a cualquier hora del día. Además, dado que el snack está impregnado con *Lactobacillus Rhamnosus*, este aperitivo puede contribuir a prevenir o tratar diversas enfermedades gastrointestinales, dado los efectos beneficiosos para la salud de los probióticos.

Con el objetivo de obtener los snacks, se cortaron discos de manzana y se impregnaron con una solución de agua peptonada con *L. Rhamnosus*. La impregnación se llevó a cabo por inmersión en el cultivo de las muestras con y sin aplicación previa de perforación láser, para fomentar la porosidad y la incorporación de microorganismos, y con y sin aplicación de vacío en el proceso de inmersión. Posteriormente, las muestras se secaron para obtener los snacks, con una actividad de agua inferior a 0,4 y una humedad inferior al 12%, mediante tres métodos: secado convencional con aire caliente, secado convencional a vacío y secado en ventana refractiva, los dos primeros a 45°C y el último a 70°C.

Los recuentos de microorganismos obtenidos en las muestras impregnadas antes del secado no reflejaron diferencias significativas debidas a los distintos pretratamientos, con lo que ni la microperforación ni la impregnación a vacío mejoraron sensiblemente la carga en probióticos del producto ( $5,2 \times 10^8$  UFC/g de sólidos del producto). La comparación de los tres tipos de secado reflejó una mejor preservación de la carga total de microorganismos en el secado convencional con aire caliente ( $2,6 \times 10^7$  UFC/g de sólidos del producto).

## Palabras clave

Probióticos, manzana, impregnación, perforación láser, secado, *Lactobacillus Rhamnosus*.

**Autora:** Arantxa Carrascosa Morelló

**Tutora UPV:** Amparo Chiralt Boix

**Tutora externa:** Helena Núñez

**Cotutor externo:** Ricardo Simpson

# OBTENCIÓ D'APERITIUS DE POMA AMB EFECTE PROBIÒTIC PER MITJÀ D'IMPREGNACIÓ AMB *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS*

València, juliol 2019

## RESUM

Les fruites i les verdures són aliments que juguen un paper fonamental en una dieta saludable. En primer lloc per la seua gran aportació de vitamines i minerals; i, en segon lloc perquè contenen gran quantitat d'aigua, fibra i antioxidants naturals. Per aquest motiu, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) recomana un consum mínim de 400 g diaris d'aquests aliments. No obstant això, s'estima que només el 15% de la població consumix 5 o més porcions de fruita i verdura al dia, com es recomanat.

Per a fer front al baix consum d'este tipus d'aliments, s'ha decidit desenvolupar un snack saludable de poma per a ser consumit com a aperitiu a qualsevol hora del dia. A més, atés que el snack està impregnat amb *Lactobacillus Rhamnosus*, aquest aperitiu pot contribuir a previndre o tractar diverses malalties gastrointestinals, dau els efectes beneficiosos per a la salut dels probiòtics.

Amb l'objectiu de realitzar els snacks, es van tallar discos de poma i es van impregnar amb una solució d'aigua peptonada amb *L. Rhamnosus*. La impregnació es va dur a terme per immersió en el cultiu de les mostres amb i sense aplicació prèvia de perforació làser, per a fomentar la porositat i la incorporació de microorganismes, i amb i sense aplicació de buit en el procés d'immersió. Posteriorment, les mostres es van assecat per a obtindre els snacks, amb una activitat d'aigua inferior a 0,4 i una humitat inferior al 12%, per mitjà de tres mètodes: assecat convencional amb aire calent, assecat convencional a buit i assecat en finestra refractiva, els dos primers a 45°C i l'últim a 70°C.

Els recomptes de microorganismes obtinguts en les mostres impregnades abans de l'assecat no van reflectir diferències significatives degudes als distints pretractaments, amb la qual cosa ni la microperforació ni la impregnació a buit van millorar sensiblement la càrrega en probiòtics del producte ( $5,2 \times 10^8$  UFC/g de sòlids del producte). La comparació dels tres tipus d'assecat va reflectir una millor preservació de la càrrega total de microorganismes en l'assecat convencional amb aire calent ( $2,6 \times 10^7$  UFC/ g de sòlids del producte).

## Paraules clau

Probiòtics, poma, impregnació, perforació làser, assecat, *Lactobacillus Rhamnosus*.

**Autora:** Arantxa Carrascosa Morelló

**Tutora UPV:** Amparo Chiralt Boix

**Tutora externa:** Helena Núñez

**Cotutor externo:** Ricardo Simpson

OBTAINING APPLE SNACKS WITH PROBIOTIC EFFECT BY IMPREGNATION WITH  
*LACTOBACILLUS RHAMNOSUS*

Valencia, July 2019

**ABSTRACT**

Fruits and vegetables are foods that play a fundamental role in a healthy diet. First because of its great contribution of vitamins and minerals; and, secondly because they contain a large amount of water, fiber and natural antioxidants. For this reason, the World Health Organization (WHO) recommends a minimum consumption of 400 g per day of these foods. However, it is estimated that only 15% of the population consumes 5 or more pieces of fruit and vegetables per day, as recommended.

To cope with the low consumption of this type of food, it has been decided to develop a healthy apple snack to be consumed as an appetizer at any time of the day. In addition, since the snack is impregnated with *Lactobacillus Rhamnosus*, this snack can help us prevent or treat various gastrointestinal diseases, given the beneficial health effects of probiotics.

In order to obtain the snacks, apple discs were cut and impregnated with a peptonade water solution containing *L. Rhamnosus*. The impregnation was carried out by immersion in the culture of the samples with and without prior application of laser drilling, to promote porosity and the incorporation of microorganisms, and with and without application of vacuum in the immersion process. Subsequently, the samples were dried to obtain the snacks, with a water activity of less than 0,4 and humidity of less than 12%, by three methods: conventional drying with hot air, conventional drying under vacuum and drying in a refractive window, the first two at 45°C and the last at 70°C.

The counts of microorganisms obtained in the samples impregnated before drying did not reflect significant differences due to the different pretreatments, so that neither microperforation nor vacuum impregnation significantly improved the probiotic load of the product ( $5,2 \times 10^8$  CFU/g solids of the product). The comparison of the three types of drying reflected a better preservation of the total microorganism load in conventional drying with hot air ( $2,6 \times 10^7$  CFU/g of product solids).

**Key words**

Probiotics, apple, impregnation, laser drilling, drying, *Lactobacillus Rhamnosus*.

**Author:** Arantxa Carrascosa Morelló

**UPV tutor:** Amparo Chiralt Boix

**External tutor:** Helena Núñez

**External cotutor:** Ricardo Simpson

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a todas las personas que de una forma u otra me han ayudado a realizar mi trabajo final de grado.

En primer lugar a mis tutoras, Helena y Amparo, por su dedicación y por la confianza que han depositado en mí desde el primer día.

Agradecer también al departamento de ingeniería química ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María y al CREAS (Centro Regional de Estudios en Alimentos Saludables) por haberme permitido usar sus instalaciones.

A mis compañeros de laboratorio, a Juan sobre todo, por la compañía que me han dado estos meses y por la ayuda prestada. Ha sido un placer trabajar con vosotros.

A mis compañeros de intercambio. A Teresa y Maleles por seguir estando a mi lado a pesar de la distancia. Y a Tomás, Celia, Jérémie y Andrea, por haber estado a mi lado durante mi realización del trabajo. Sin vosotros todo habría sido mucho más complicado.

Y por último a mi familia y amigos, por su preocupación e interés, y por sus palabras de ánimo día a día. Gracias por haberme apoyado desde que comencé la universidad y haberme hecho ver lo que podía ser capaz de conseguir con mi esfuerzo.

Gracias.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
<b>3. ANTECEDENTES GENERALES</b> .....	2
3.1.Microperforación láser .....	2
3.2.Impregnación a vacío y sin vacío.....	2
3.3.Deshidratación de alimentos .....	3
3.3.1.Secado Convencional con Aire Caliente (SAC).....	4
3.3.2.Secado Convencional a Vacío (SV) .....	4
3.3.3.Secado en Ventana Refractiva (VR).....	4
3.4.Determinaciones analíticas.....	5
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	5
4.1.Preparación de las muestras .....	6
4.2.Microperforación láser .....	7
4.3.Impregnación con bacterias probióticas .....	8
4.4.Deshidratación de alimentos .....	8
4.4.1 Secado Convencional con Aire Caliente (SAC).....	8
4.4.2 Secado Convencional a Vacío (SV) .....	9
4.4.3 Secado en ventana refractiva (VR).....	9
4.5. Determinaciones analíticas.....	10
4.5.1 Humedad.....	10
4.5.2 Actividad de agua.....	10
4.5.3 Recuento de microorganismos.....	11
4.5.4 SEM (Microscopio Electrónico de Barrido).....	12
4.5.5 Análisis estadístico .....	13
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	13
5.1.Características de la materia prima .....	13
5.2. Características del secado y de las muestras secas.....	13
5.2. Contenido en microorganismos para los diferentes tratamientos.....	16
5.3.SEM (Microscopía Electrónica de Barrido).....	18
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Escala McFarland.....	11
<b>Tabla 2.</b> Tiempos de secado, % de humedad promedio y $a_w$ promedio de cada tratamiento.....	16
<b>Tabla 3.</b> Análisis de la varianza comparando los pretratamientos en las muestras sin secar .....	17
<b>Tabla 4.</b> Análisis de la varianza comparando los tres tipos de secado .....	18
<b>Tabla 5.</b> Análisis de la varianza comparando los cuatro tipos de pretratamiento.....	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema completo de los experimentos realizados.....	6
<b>Figura 2.</b> Manzanas variedad <i>Granny Smith</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> Imagen microscópica de muestra microperforada .....	7
<b>Figura 4.</b> Configuración panel.....	7
<b>Figura 5.</b> Baño termostático utilizado para la impregnación de las manzanas .....	8
<b>Figura 6.</b> Estufa de secado a vacío (SV) .....	9
<b>Figura 7.</b> Sistema de secado en ventana refractiva (VR) .....	9
<b>Figura 8.</b> Ecuación para el cálculo del contenido en humedad .....	10
<b>Figura 9.</b> Higrómetro utilizado para la medición de actividad de agua .....	10
<b>Figura 10.</b> Patrones para la preparación de la escala McFarland desde el más concentrado (izquierda) al menos concentrado (derecha) .....	11
<b>Figura 11.</b> Recta de calibrado para cálculo de microorganismos en función de la absorbancia. 12	
<b>Figura 12.</b> Ecuación para el cálculo de las UFC por gramo .....	12
<b>Figura 13.</b> Muestras secadas mediante secado por aire caliente (SAC). Los pretratamientos son, de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4 .....	13
<b>Figura 14.</b> Muestras secadas mediante secado convencional a vacío (SV). Los pretratamientos son, de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4. ....	14
<b>Figura 15.</b> Muestras secadas mediante secado en ventana refractiva (VR). Los pretratamientos son, de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4 .....	14
<b>Figura 16.</b> Curva de secado convencional por aire caliente (SAC).....	15
<b>Figura 17.</b> Curva de secado en ventana refractiva (VR) .....	15
<b>Figura 18.</b> Ejemplo de recuento de colonias según la dilución .....	16
<b>Figura 19.</b> Promedio de las UFC/ g ss obtenidas para las muestras previamente al secado y después de los diferentes tratamientos de secado .....	17
<b>Figura 20.</b> Imagen SEM de una muestra microperforada, impregnada a vacío y secada con ventana refractiva (VR4) .....	19
<b>Figura 21.</b> Imagen SEM de una muestra sin perforación, impregnada sin vacío y secada con ventana refractiva (VR1) .....	20
<b>Figura 22.</b> Imagen SEM de una muestra microperforada, impregnada sin vacío y secada con ventana refractiva (VR2) .....	20
<b>Figura 23.</b> Imagen SEM de una muestra microperforada, impregnada a vacío y secada con secado a vacío (SV4) .....	21
<b>Figura 24.</b> Imagen SEM de una muestra sin perforación, impregnada a vacío y secada con aire caliente (SAC3) .....	21

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el ámbito de la nutrición se encuentra en constante cambio y cada vez es más grande el interés por los temas relacionados con la alimentación y las enfermedades crónicas. El consumidor está en constante búsqueda de productos alimenticios que contribuyan a mejorar su estilo de vida y su propio bienestar. Siguiendo esta tendencia, ha aumentado la cantidad de estrategias de marketing que las empresas siguen para dar a conocer productos que ejercen un beneficio sobre la salud o que pueden reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Los alimentos que consiguen esto fueron denominados alimentos funcionales (AF) a principio de los 80's en Japón y su definición podría ser: "Los alimentos funcionales son aquellos que además de sus efectos nutricionales habituales, tienen compuestos biológicos (nutrientes o no nutrientes), con efecto selectivo positivo añadido sobre una o varias funciones del organismo y que presentan efectos beneficiosos para la salud, mejorándola o reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades" (Cruz, 2012).

Dentro del mercado de alimentos funcionales, los productos probióticos son altamente estudiados. La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) utiliza el término probiótico para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. Fundamentalmente son dos géneros de bacterias los utilizados en los alimentos (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) puesto que son capaces, aparte de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, de resistir a la exposición a los jugos gástricos.

Las frutas son alimentos con un alto potencial para el desarrollo de alimentos funcionales debido a su alto contenido en nutrientes, fibra y antioxidantes. Sin embargo, la incorporación de microorganismos en estos productos alimenticios es un gran desafío para las empresas dado que existen multitud de factores como pueden ser la composición del alimento, los factores externos o los tratamientos necesarios para alargar la vida útil de los mismos, que pueden limitar la viabilidad de los microorganismos.

El tiempo de conservación de los alimentos probióticos va a depender de diversos índices de estabilidad del mismo, como pueden ser la actividad de agua o la humedad. La actividad de agua es un factor determinante en el progreso de los fenómenos deteriorativos en los alimentos y en concreto el deterioro por la acción de microorganismos, quedando muy limitado el crecimiento de patógenos por debajo de 0,4.

El continuo auge de este tipo de alimentos en el mercado fue el punto de partida para realizar una investigación encaminada al desarrollo de un snack de manzana que pudiera considerarse como un alimento funcional. Se eligió el *Lactobacillus Rhamnosus* como bacteria para ejercer el efecto probiótico y para estudiar la viabilidad del producto se decidió llevar a cabo tres tipos de secado sobre las muestras de manzana cargadas con los microorganismos: secado convencional con aire caliente (SAC), secado convencional a vacío (SV) y secado con ventana refractiva (VR). Para la carga de microorganismos en la manzana fresca se eligieron la impregnación por inmersión en caldo de cultivo con y sin aplicación de vacío, así como la microperforación láser del tejido para promover la porosidad donde se pudieran albergar las células microbianas. El efecto de estos pretratamientos de la muestra sería analizado en aras de determinar las condiciones del proceso más adecuadas para aumentar la cantidad de microorganismos en las muestras.

Para el presente estudio se han tenido en cuenta estudios previos sobre desarrollo de productos probióticos de manzana (Akman y col., 2019) y sobre la aplicación de la microperforación con láser de CO<sub>2</sub> para favorecer la impregnación con azúcar de arándanos congelados (Fujimaru y col., 2012).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general fue desarrollar un aperitivo de manzana deshidratada impregnada con probióticos. Para ello se evaluó el uso de microperforaciones láser y de diferentes técnicas de secado para maximizar la retención de probióticos en el producto. Para alcanzar este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del proceso de secado de manzana con y sin impregnación a vacío como experimento control de las tecnologías seleccionadas mediante el uso de: secado convencional con aire caliente, secado convencional a vacío, secado con ventana refractiva.
- Estudio de la aplicación controlada de la microperforación como pretratamiento de la impregnación de rebanadas de manzana.
- Evaluación del impacto de las microperforaciones láser en el tiempo de secado y la viabilidad de los probióticos.
- Evaluación de la viabilidad de los probióticos en el producto sometido a las diferentes técnicas de secado.

## 3. ANTECEDENTES GENERALES

### 3.1. Microperforación láser

El término “láser” viene de las siglas en inglés *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* y es, en grandes términos, una fuente de luz. Lo que diferencia esta fuente de luz del resto es el mecanismo por el que se emite dicha luz, el cual se basa en la emisión estimulada. Este tipo de emisión confiere a la luz unas propiedades interesantes, como son la alta potencia, la frecuencia de emisión definida o la capacidad de emitirse en pulsos de muy corta duración.

A pesar de que existen multitud de tipos de láser, el utilizado en esta investigación ha sido el láser de CO<sub>2</sub>. Este tipo de láser de gas es uno de los más antiguos, pero todavía a día de hoy tiene una gran cantidad de aplicaciones dado su alta potencia y su razonable coste. Se utiliza principalmente en la industria para el corte y la soldadura. También se utiliza en cirugía y en la industria de alimentos porque trabaja en una longitud de onda muy bien absorbida por el agua.

### 3.2. Impregnación a vacío y sin vacío

Puesto que nuestro objetivo principal es obtener unos snacks que tengan efecto prebiótico y para ello es necesario que los mismos contengan una cierta cantidad de microorganismos, la impregnación es un pretratamiento necesario a llevar a cabo para que los microorganismos se adhieran a los snacks de manzana que posteriormente vamos a secar.

La impregnación a vacío de un producto poroso, consiste en el intercambio del gas interno y/o líquido ocluido en los poros abiertos por una fase líquida externa, debido a la acción de mecanismos hidrodinámicos promovidos por cambios de presión (Fito y col., 2001). La operación se lleva a cabo en dos etapas que comienzan cuando el alimento se sumerge en el líquido de impregnación. La primera de ellas se refiere al momento en el que se impone en un sistema cerrado una presión inferior a la atmosférica. Esto tiene como consecuencia la extracción del aire que se encuentra en los poros del alimento ya que el gas intenta equilibrarse con la presión impuesta.

Una vez transcurrido el tiempo necesario de impregnación con vacío se da paso a la segunda etapa que consiste en restituir la presión atmosférica, creando así un gradiente de presiones en el sistema que es la fuerza impulsora para que el líquido que envuelve los discos de manzana penetre en los poros que contenían previamente el aire.

Por otro lado, la impregnación sin vacío consiste simplemente en sumergir el alimento en el líquido de impregnación y dejarlo el tiempo suficiente para que el alimento absorba toda la cantidad necesaria de este líquido. Como es de suponer, la cantidad de líquido de impregnación que penetrará en la manzana que se impregna sin vacío será menor que aquella que penetra en la que se impregna a vacío.

### **3.3. Deshidratación de alimentos**

La deshidratación puede entenderse como la acción de eliminar la humedad de un producto con el fin de dar mayor estabilidad a los alimentos cuyos procesos de deterioro microbiológico, enzimático o químico son muy dependientes de la actividad de agua ( $a_w$ ). Este proceso de conservación lo ha llevado a cabo el hombre desde los inicios de los tiempos para alargar la vida útil de los alimentos como solución a su búsqueda por la supervivencia.

En el proceso de deshidratación se lleva a cabo tanto una transferencia de masa como una transferencia de energía. Por un lado, la transferencia de masa se refiere a la transferencia del agua que contiene el alimento desde la parte interna hacia la superficie, donde es evaporada. Esta evaporación, sin embargo, se da porque el alimento se encuentra en un ambiente donde hay una transferencia de energía en forma de calor que provoca la evaporación superficial. Cabe destacar que el comportamiento particular del sólido durante la deshidratación depende de muchos factores, tales como la superficie expuesta, la densidad de carga y la porosidad, entre otros (Vega y col., 2007).

Dentro de la amplia gama de productos alimenticios que se pueden encontrar en el mercado, las frutas y las verduras han sido desde siempre un grupo problemático a la hora de su conservación. Esto se debe a la gran cantidad de humedad que presentan, hecho que favorece el crecimiento de microorganismos causantes de deterioro o patógenos, haciendo que se reduzca así su vida útil y que cambien tanto sus propiedades organolépticas como su seguridad para el consumidor. Por tanto, la deshidratación es un buen método de conservación para aumentar la vida útil de este tipo de alimentos.

Dentro del mundo de la deshidratación de alimentos, existen multitud de métodos que se han ido desarrollando y mejorando a lo largo de los años. Se pueden encontrar desde los más antiguos como es el secado al sol de los alimentos como los más novedosos, por ejemplo, la combinación de microondas y vacío.

En este estudio, se han utilizado tres tipos de secado: el secado convencional con aire caliente (SAC), el secado convencional a vacío (SV) y el secado en ventana refractiva (VR). En los tres métodos se han procesado muestras de manzana sin microorganismos para determinar los tiempos de secado que mejor se ajustaban a los parámetros objetivo de  $a_w < 0,4$ .

### **3.3.1. Secado Convencional con Aire Caliente (SAC)**

En la actualidad, la deshidratación convencional sigue siendo una de las formas de conservación de alimentos más utilizada a nivel industrial (Vega y col., 2006). El secado con aire caliente es uno de los métodos más comunes de deshidratación utilizados, sin embargo, posee la limitante de requerir altos consumos específicos de energía y un largo tiempo de procesamiento (Ortiz y col., 2013).

Durante este tipo de secado, una corriente de aire caliente es generada por ventiladores dentro de una cámara cerrada. Esta corriente entra en contacto con la superficie del alimento, haciendo que, mediante un mecanismo de convección, el agua superficial del alimento sea evaporada.

### **3.3.2. Secado Convencional a Vacío (SV)**

La tecnología de secado a vacío consiste en el secado de alimentos en una cámara cerrada (estufa) a una temperatura dada, aplicando una presión inferior a la presión atmosférica. Este tipo de secado se lleva a cabo para evaporar los líquidos volátiles del interior del producto utilizando temperaturas inferiores a la temperatura de ebullición del líquido, ya que se aprovecha la depresión de la misma al disminuir la presión.

Este tipo de tratamiento de deshidratación presenta las ventajas del uso de bajas temperaturas de secado, previniendo la oxidación de los alimentos y acelerando el secado debido al establecimiento de un mayor gradiente de temperatura entre el producto (con menor temperatura de evaporación) y el medio exterior. Sin embargo, el secado a vacío requiere de un equipo de vacío que genera un consumo adicional de energía.

### **3.3.3. Secado en Ventana Refractiva (VR)**

El método de secado mediante ventana refractiva es un método de secado rápido y novedoso que fue patentado por MCD Technologies, Inc. (Washington, EE.UU.) hace apenas 33 años, en 1986. Este método permite secar alimentos sensibles al calor sin variar de manera drástica sus propiedades organolépticas. Se basa en la utilización del agua como medio principal de transmisión de energía. La radiación térmica proveniente del agua caliente pasa, a través de una película plástica, a las muestras que están en contacto con la misma.

La película plástica utilizada es una lámina Mylar® (Melinex), que es resistente a temperaturas extremas y al desgaste, es transparente para espesores bajos y permite el paso de energía infrarroja. Además, es flexible y puede ponerse en contacto con los productos alimenticios.

Este tipo de secado presenta diversas ventajas: posee bajos costos de operación y de mantenimiento, es una eficiente alternativa en la deshidratación de alimentos por su alta velocidad de secado y permite conservar las propiedades organolépticas de los mismos.

### 3.4. Determinaciones analíticas

Los productos desarrollados de baja humedad requieren de la verificación del contenido en humedad final y del valor de su actividad de agua. Este último parámetro es un índice de estabilidad del alimento ya que define sus posibilidades de deterioro debido al crecimiento de microorganismos, así como reacciones enzimáticas, de pardeamiento u oxidación.

La actividad de agua es un parámetro que indica de manera indirecta la cantidad de agua disponible en un alimento. A mayor agua disponible en el alimento, mayores posibilidades de la misma para participar en diferentes reacciones deteriorativas y en el crecimiento microbiano. Dicho valor depende de la composición, la temperatura y el contenido en agua del producto. Por su parte la humedad del producto es un factor primordial en las características organolépticas del alimento, tales como la textura, el sabor, el color o el valor nutricional.

Por otro lado, dado la potencial funcionalidad probiótica del producto desarrollado, es relevante la determinación de las UFC por g de producto que se dan en función del proceso aplicado. Los probióticos son microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso para la salud cuando se administran en dosis adecuadas. Estas dosis varían entre países según la legislación de cada uno, pero generalmente, un producto probiótico debería contener entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g o entre  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/dosis de células viables.

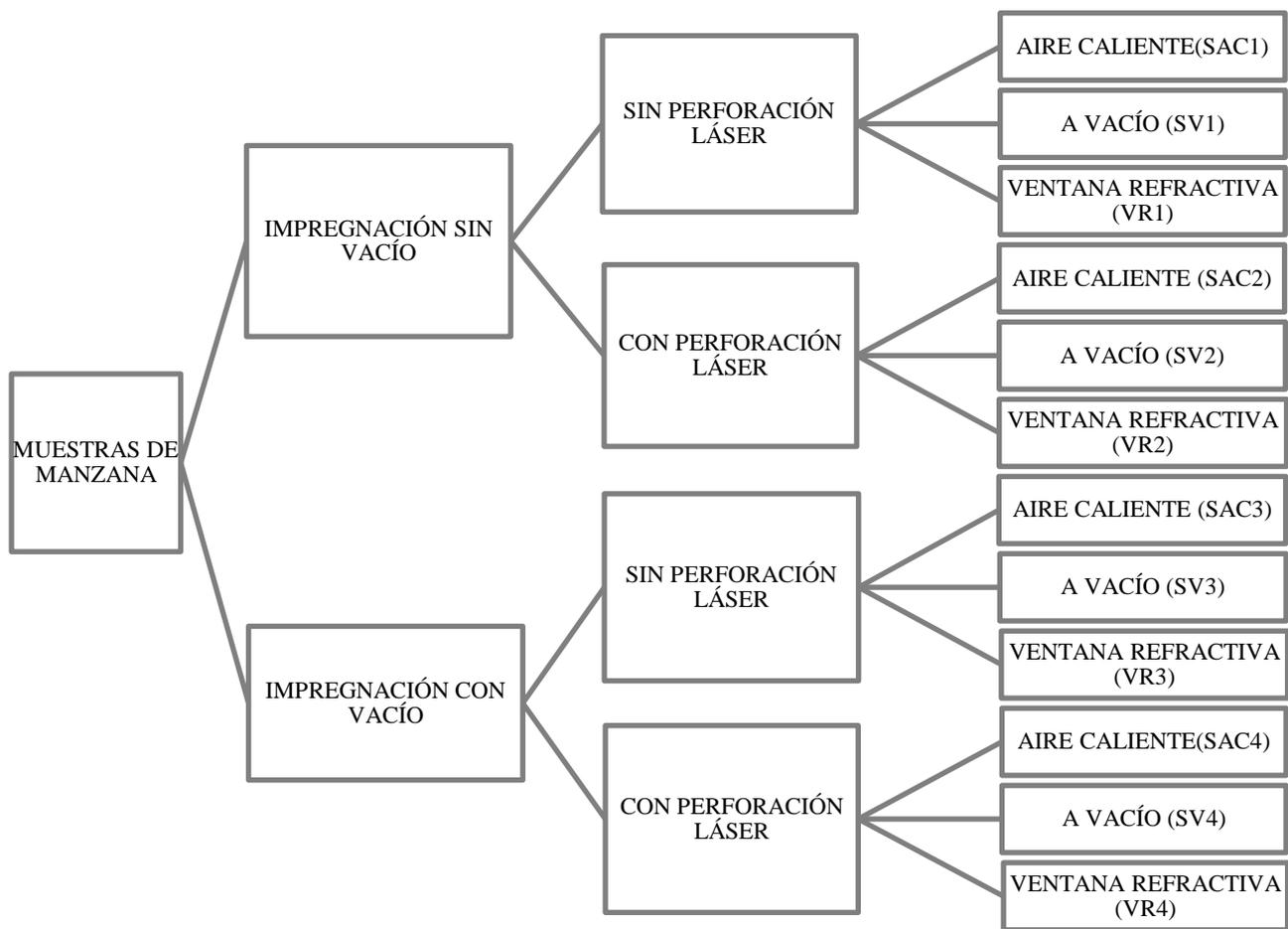
También es interesante realizar imágenes de la superficie del alimento para poder captar al microscopio la presencia de microorganismos. La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica capaz de producir imágenes de alta resolución basándose en la utilización de un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formarlas.

Por último, para poder comparar los resultados de las diferentes técnicas de secado y los diferentes pretratamientos es necesario llevar a cabo un análisis de la varianza que nos muestre si hay diferencias significativas o no entre ellos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo doce tratamientos de secado según el esquema de la *Figura 1* con el objetivo de obtener un producto deshidratado con una actividad de agua menor a 0,4 en el tiempo de secado. Muestras impregnadas sin (1 y 2) y con (3 y 4) vacío y sin (1 y 3) y con (2 y 4) perforación láser se sometieron a cada uno de los tres tipos de secado (SAC, SV y VR).

Los doce experimentos del esquema se hicieron por duplicado, en primer lugar un experimento control sin adición de microorganismos para establecer los tiempos de secado que se ajustaran a nuestra  $a_w$  objetivo, y en segundo lugar los tratamientos con el uso de microorganismos para su posterior recuento.



**Figura 1.** Esquema completo de los experimentos realizados

#### 4.1. Preparación de las muestras

Las manzanas frescas utilizadas para este trabajo fueron obtenidas en los supermercados Líder o Jumbo (Valparaíso, Chile), eligiendo para ello manzanas de variedad *Granny Smith* que tuvieran ausencia de daño microbiológico. Las mismas se almacenaron en un refrigerador a 2°C hasta la realización de las experiencias de secado. Llegado el momento, se lavaron y cortaron en discos de 4 mm de grosor y 40 mm de diámetro.



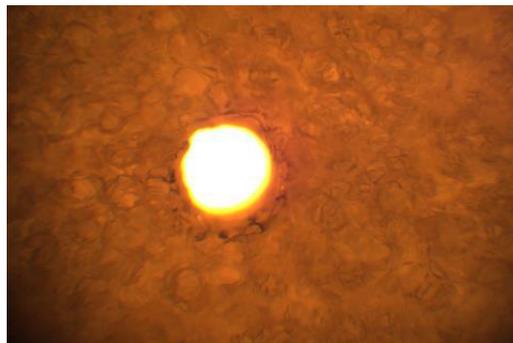
**Figura 2.** Manzanas variedad *Granny Smith*.

## 4.2. Microperforación láser

Se ha utilizado la microperforación con láser de CO<sub>2</sub> como tratamiento previo a la impregnación de las manzanas con el fin de mejorar la entrada del líquido a través de los poros creados en el proceso y así potenciar la entrada de microorganismos y comprobar si se favorece su supervivencia adecuada durante el secado.

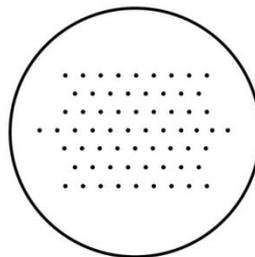
El láser de tipo CO<sub>2</sub> es interesante principalmente porque permite conseguir un pequeño tamaño de poro, penetrando en la manzana en forma de finos agujeros debido a la alta potencia y a la alta velocidad de los pulsos, lo que provoca la fusión y evaporación de la manzana perforada. Esta característica permite disminuir tanto el daño físico como el microbiológico causado en comparación con el ocasionado por cualquier otro tipo de corte o tratamiento mecánico.

El equipo utilizado es una máquina de marcado láser conectada a un ordenador que contiene el programa WinMarkPro Laser Marking. A través del mismo se modifican diferentes parámetros como son la forma, la potencia del láser, la duración de pulso y la cantidad de los mismos. En primer lugar se realizaron pruebas con diferentes parámetros, en concreto se perforaron 7 muestras a las que posteriormente se les midió el diámetro de poro por triplicado mediante un microscopio electrónico (Hund typ: 600/12 230V-50-60 Hz) y utilizando el programa Image-pro Plus (*Figura 3*), teniendo en cuenta que el tamaño de poro objetivo era de 200 µm de diámetro para albergar a los microorganismos.



*Figura 3.* Imagen microscópica de muestra microperforada.

Tras los ensayos previos, los parámetros utilizados fueron: 10% de potencia, duración de pulso de 1 ms y 120 pulsos, con configuración de tipo panel (*Figura 4*).



*Figura 4.* Configuración panel.

### 4.3. Impregnación con bacterias probióticas

Para la impregnación de rodajas de manzana se utilizó como probiótico un cultivo de *L. Rhamnosus*. El stock de *L. Rhamnosus* se mantuvo en MRS Agar (BIOKAR Diagnostics, Beauvais, France) incubándose a 34°C por 48h. Posteriormente, se cultivó en caldo MRS a 34°C durante 24h. El tiempo de cultivo fue obtenido por determinación de la densidad celular utilizando la escala de Mcfarland. El inóculo se preparó transfiriendo desde el caldo MRS (BIOKAR Diagnostics, Beauvais, France) a agua peptonada al 1% (LOBA Chemie, Mumbai, India), con un nivel de inoculación de  $10^9$ - $10^{10}$  log UFC/mL. Para la impregnación se utilizó un desecador, el cual había sido esterilizado previamente.

Las rodajas de manzana se impregnaron en la solución en una proporción de (1:5 manzana/solución de impregnación) durante 10 minutos dentro de un baño termoregulado con sistema de agitación a 21°C y 30 rpm (JEIO TECH modelo BS-21).



**Figura 5.** Baño termoregulador utilizado para la impregnación de las manzanas.

Además, para el método de impregnación a vacío, se utilizó una presión de 60 mbar durante 30 segundos previo a la inmersión del desecador en el baño termoregulado, dejando las muestras en el líquido de impregnación durante 10 min más tras la restitución de la presión atmosférica. Por otro lado, la solución de impregnación con los microorganismos utilizada ha sido la siguiente: por cada gramo de manzana se han utilizado 3,75 ml de agua peptonada y 1,25 ml de caldo MRS el cual había sido incubado en estufa a 34°C durante las 24h previas a su utilización.

### 4.4. Deshidratación de alimentos

#### 4.4.1 Secado Convencional con Aire Caliente (SAC)

La estufa de aire caliente marca MEMMERT (UF, Alemania) de aire forzado, fue utilizada como equipo deshidratador a una temperatura de 45°C. Las muestras se colocaron en su interior en bandejas cubiertas con papel aluminio y se dejaron secar hasta completar el tiempo de secado previamente establecido para cada tipo de tratamiento.

#### 4.4.2 Secado Convencional a Vacío (SV)

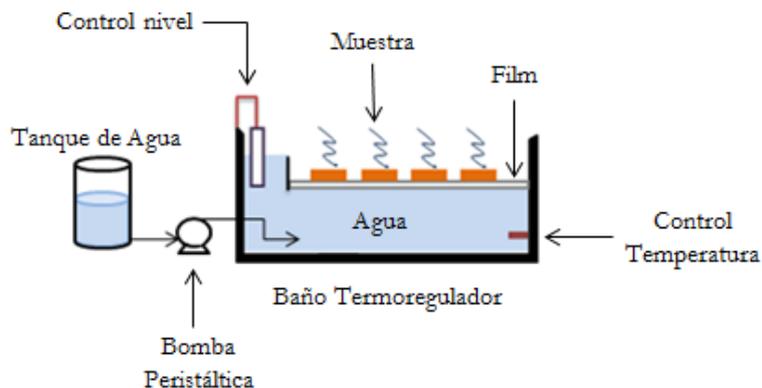
Para este, se utilizó una estufa marca MEMMERT (FRG, Alemania) conectada a una bomba de vacío que permitía alcanzar una presión de entre 380 y 460 mbar y una temperatura de 45°C. Además, todas las muestras, tanto con impregnación a vacío como a presión atmosférica, así como las perforadas y no con láser se dejaron secar durante un total de 24h.



*Figura 6.* Estufa de secado a vacío (SV).

#### 4.4.3 Secado en ventana refractiva (VR)

El equipo utilizado para el secado en ventana refractiva fue un baño termostático de acero inoxidable marca MEMMERT (WNB22, Alemania), de 60L de capacidad. Se utilizó una película plástica marca MYLAR de 2 mm de espesor, con una superficie de secado de 150x470 mm<sup>2</sup>. La temperatura del agua se estableció en 70°C dado que experimentos previos a 45°C no permitieron alcanzar la  $a_w$  objetivo de 0,4. Para controlar el nivel de agua del baño, se utilizó un control de nivel de sonda y una bomba peristáltica conectada a un tanque de agua. Se controló además que en todo momento no se produjeran burbujas de aire entre la superficie del agua y la película plástica para que estas no interfirieran en el proceso de deshidratación. (Ochoa-Martínez y col., 2012). La instalación experimental se muestra en la *Figura 7*.



*Figura 7.* Sistema de secado en ventana refractiva (VR).

## 4.5. Determinaciones analíticas

### 4.5.1 Humedad

Se determinó la humedad inicial y final de las muestras de manzana, utilizando para ello el método AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). Este método se basa en pesar las muestras antes y después de su residencia en estufa a 60°C hasta alcanzar un peso constante (unas 48h). Posteriormente, el porcentaje de humedad se calculó con la ecuación mostrada a continuación (*Figura 8*).

$$\% \text{ Humedad} = M_1 - M_2 \cdot \frac{100}{M_1 - M_0}$$

*Figura 8.* Ecuación para el cálculo del contenido en humedad.

Donde  $M_0$  corresponde al peso de la placa Petri vacía,  $M_1$  al peso de la placa más la manzana húmeda y  $M_2$  al peso de la placa más la manzana seca.

Por otro lado, con excepción del secado a vacío, también se determinaron las curvas de humedad de las muestras a los diferentes tiempos de secado para conocer el comportamiento de las diferentes muestras al secado.

### 4.5.2 Actividad de agua

Existen diferentes métodos para medir la actividad de agua de un alimento. En este estudio se ha utilizado un higrómetro marca AQUALAB, modelo 4TE (Decagon Devices Inc., Pullman Washington USA), con una precisión de  $\pm 0,003$ , y una resolución de  $\pm 0,001$ . Este mide la  $a_w$  siguiendo la metodología de los sensores de punto de rocío. La muestra se equilibra dentro de una cámara sellada que contiene un espejo que permite detectar la condensación en él. En el punto de equilibrio la humedad relativa del aire en la cámara es el mismo que la  $a_w$  de la muestra. Una célula fotoeléctrica y un termistor detectan el punto exacto en el que se produce la condensación y la temperatura, respectivamente.



*Figura 9.* Higrómetro utilizado para la medición de actividad de agua.

### 4.5.3 Recuento de microorganismos

Para los recuentos de microorganismos, tanto en la solución de impregnación como en la manzana impregnada, se llevó a cabo la preparación de la escala McFarland. La escala consta de 11 patrones (preparados mezclando ácido sulfúrico 0,36M con una disolución de cloruro de bario 0,048M) cada uno de los cuales tiene una turbidez comparable a la de una suspensión bacteriana.



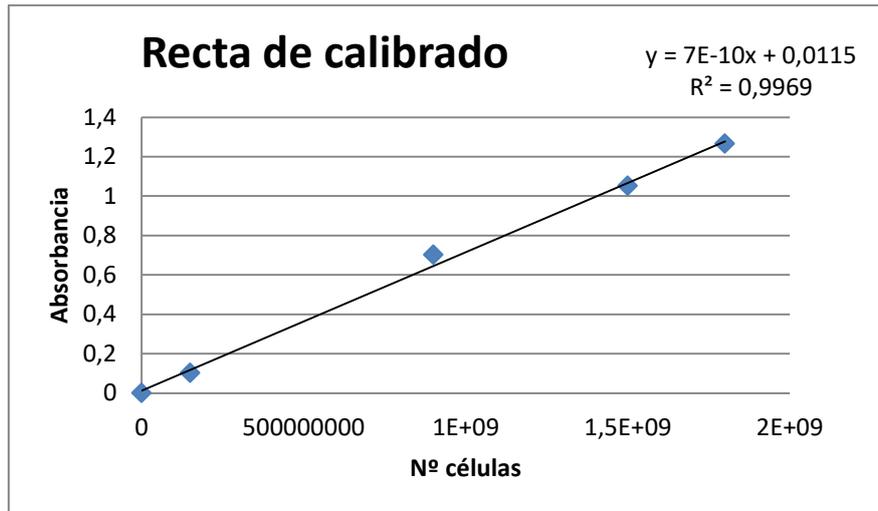
**Figura 10.** Patrones para la preparación de la escala McFarland desde el más concentrado (izquierda) al menos concentrado (derecha).

Una vez preparados los patrones, se midió la absorbancia de cada disolución con un espectrofotómetro marca Spectronic Instruments modelo 336001 (USA) a 550 nm. La escala McFarland sigue unos estándares de modo que a cada patrón le corresponde un número de bacterias por mililitro (Tabla 1).

**Tabla 1.** Escala McFarland.

Nº	$BaCl_2$ 0,048 M (ml)	$H_2SO_4$ 0,36M (ml)	Volumen final (ml)	Nº células
0,5	0,05	9,95	10	$1,5 \cdot 10^8$
1	0,1	9,9	10	$3 \cdot 10^8$
2	0,2	9,8	10	$6 \cdot 10^8$
3	0,3	9,7	10	$9 \cdot 10^8$
4	0,4	9,6	10	$12 \cdot 10^8$
5	0,5	9,5	10	$15 \cdot 10^8$
6	0,6	9,4	10	$18 \cdot 10^8$
7	0,7	9,3	10	$21 \cdot 10^8$
8	0,8	9,2	10	$24 \cdot 10^8$
9	0,9	9,1	10	$27 \cdot 10^8$
10	1	9	10	$30 \cdot 10^8$

A partir de la escala se obtuvo una recta de calibrado (Figura 11) que permite, conociendo la absorbancia del caldo de cultivo, determinar la cantidad de microorganismos en el medio.



**Figura 11.** Recta de calibrado para cálculo de microorganismos en función de la absorbancia.

El recuento de microorganismos en la manzana, sin embargo, se llevó a cabo mediante la homogenización de la muestra en agua de peptona y posterior recuento en placas por el método de dilución seriada. Para ello, 1g de manzana seca se cortó en pequeños trozos y se mezcló con 9 ml de agua peptonada. Tras agitación durante 2 minutos, se obtuvieron las diluciones seriadas de dicha solución utilizando pipetas estériles. De cada dilución se sembraron 0,1 ml en placas Petri de Agar MRS, por triplicado. Las placas sembradas se incubaron a 34°C durante 48h, tras las cuales se procedió al recuento de microorganismos de aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias. La cantidad de UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias) se calcularon utilizando para ello la ecuación de la *Figura 12*.

$$UFC/g = \bar{X} \cdot \frac{1}{dilución} \cdot \frac{1}{inóculo}$$

**Figura 12.** Ecuación para el cálculo de las UFC por gramo.

Siendo  $\bar{X}$  el promedio de colonias contadas; la dilución, aquella de la que se pudo hacer el recuento; y el inóculo los 0,1 ml inoculados en cada placa.

#### 4.5.4 SEM (Microscopio Electrónico de Barrido)

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO MA10. Las muestras secas se cortaron para la observación y se cubrieron con oro para proveerlas de conductividad.

El voltaje de aceleración (EHT) se fijó en 5,00 kV. La distancia de trabajo (Working Distance, WD) entre la pieza final de la lente a la muestra, varió entre 8,5 y 10,5 mm. Se obtuvieron imágenes a distinta magnificación, 100X y 5000X.

#### 4.5.5 Análisis estadístico

El test de significancia de los resultados fue realizado con el análisis de varianza (ANOVA), utilizando para ello el software STATGRAPHICS Centurion. La significancia estadística fue determinada con un nivel de probabilidad de 0,05 ( $p < 0,05$ ), y con un nivel de confianza del 95%.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Características de la materia prima

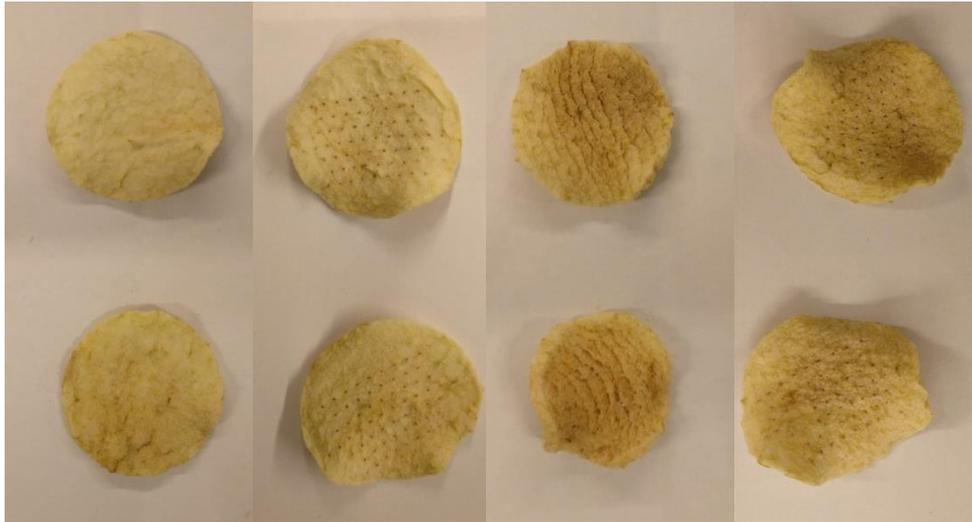
La humedad y actividad de agua de las manzanas frescas se determinó en cinco muestras, obteniendo un valor promedio de  $66,0 \pm 1,8$  g agua/100 gramos de fruta y una  $a_w$  promedio de  $0,975 \pm 0,006$ .

#### 5.2 Características del secado y de las muestras secas

Las fotografías de los discos de manzana se muestran a continuación. En la *Figura 13* se pueden observar las manzanas secadas mediante el método de secado convencional con aire caliente (SAC), mientras que en las *figuras 14* y *15* observamos las muestras secadas mediante vacío (SV) y ventana refractiva (VR), respectivamente. En los tres métodos las muestras están colocadas según el tipo de pretratamiento, mostrando desde la izquierda la condición 1 a la derecha la condición 4, de modo consecutivo.



**Figura 13.** Muestras secadas mediante secado por aire caliente (SAC). Los pretratamientos son, de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4.



**Figura 14.** Muestras secadas mediante secado convencional a vacío (SV). Los pretratamientos son, de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4.



**Figura 15.** Muestras secadas mediante secado con ventana refractiva (VR). Los pretratamientos son, de izquierda a derecha: 1, 2, 3 y 4.

Las curvas de secado de los experimentos realizados mediante secado por aire caliente (SAC) y secado en ventana refractiva (VR) se dan en las *figuras 16 y 17*. Para su obtención se registró el peso de tres muestras por experimento cada 15 minutos hasta dar por finalizado el secado. Las curvas de secado reflejan la pérdida de agua (perdida relativa de peso) a lo largo del tiempo de secado. Al comparar ambas figuras puede observarse que durante el SAC las muestras sometidas a los diferentes pretratamientos muestran un comportamiento similar. Sin embargo, en el VR se observan diferencias entre las muestras, siendo las muestras impregnadas sin vacío y con microperforaciones láser (VR2) las que presentaron menor velocidad de secado. Además, se observa también que el VR fue más efectivo en cuanto a velocidad de secado, requiriendo tiempos menores para alcanzar los mismos valores de humedad y actividad de agua.

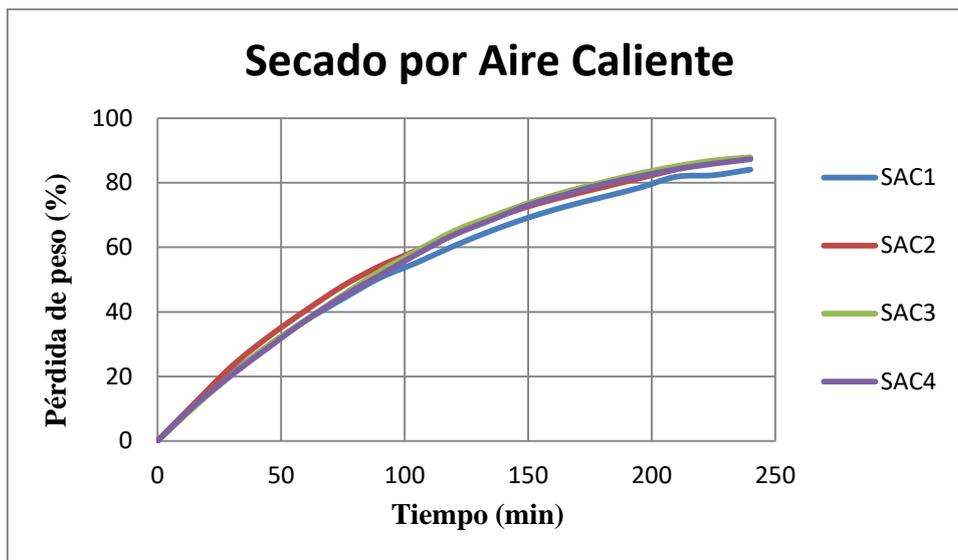


Figura 16. Curva de secado convencional por aire caliente (SAC).

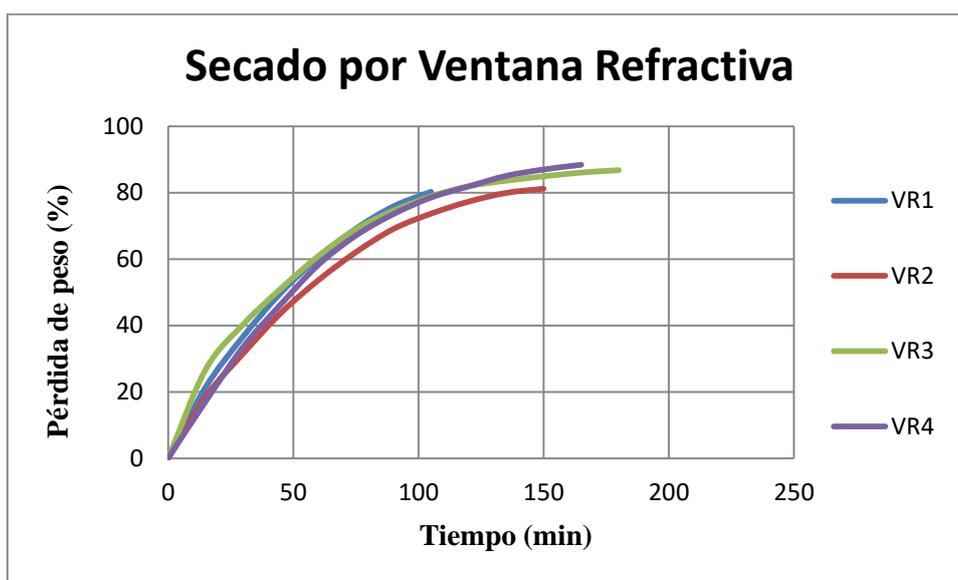


Figura 17. Curva de secado en ventana refractiva (VR).

La tabla 2 muestra los tiempos finales de secado obtenidos para los diferentes tratamientos para alcanzar una  $a_w$  inferior a 0,4 y una humedad inferior al 12% en el producto final, determinados en muestras sin microorganismos. Así mismo, la tabla 2 da los valores promedio de humedad final y  $a_w$  de las muestras con microorganismos. El contenido en humedad de las muestras secadas por SAC osciló entre 5 y 11%, mientras que en las secadas por SV fue menor (0,2-1,2%) debido al largo tiempo que se mantuvieron las mismas en estufa. Las muestras secadas por VR tuvieron humedades en el rango de las secadas por SAC. Todas tuvieron un contenido en humedad inferior al 12%, tal como se había establecido. Los valores de  $a_w$  fueron menores a 0,4 en todos los casos y variaron ligeramente en función del tratamiento, aunque teniendo en cuenta la variabilidad, no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

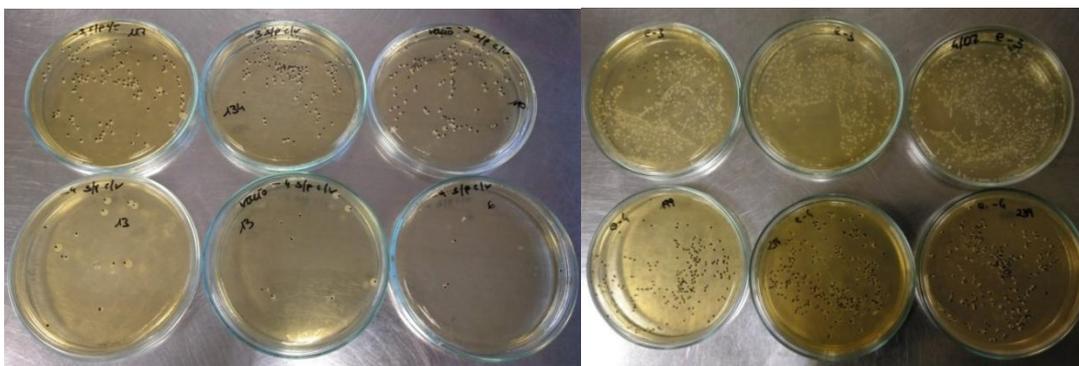
**Tabla 2.** Tiempos de secado, % de humedad promedio y  $a_w$  promedio de cada tratamiento.

Tratamiento	Tiempo secado (min)	% Humedad promedio final	$a_w$ promedio final
SAC1	240	7,60 ± 0,70	0,309 ± 0,121
SAC2	210	11,10 ± 2,00	0,322 ± 0,134
SAC3	255	5,40 ± 0,90	0,319 ± 0,057
SAC4	150	8,30 ± 2,10	0,305 ± 0,019
SV1	1440	0,20 ± 0,03	0,363 ± 0,017
SV2	1440	0,60 ± 0,08	0,355 ± 0,018
SV3	1440	1,10 ± 0,50	0,295 ± 0,075
SV4	1440	1,20 ± 0,08	0,289 ± 0,062
VR1	120	8,00 ± 1,30	0,259 ± 0,022
VR2	150	9,30 ± 0,40	0,203 ± 0,034
VR3	180	7,60 ± 1,20	0,321 ± 0,045
VR4	165	6,60 ± 0,10	0,298 ± 0,058

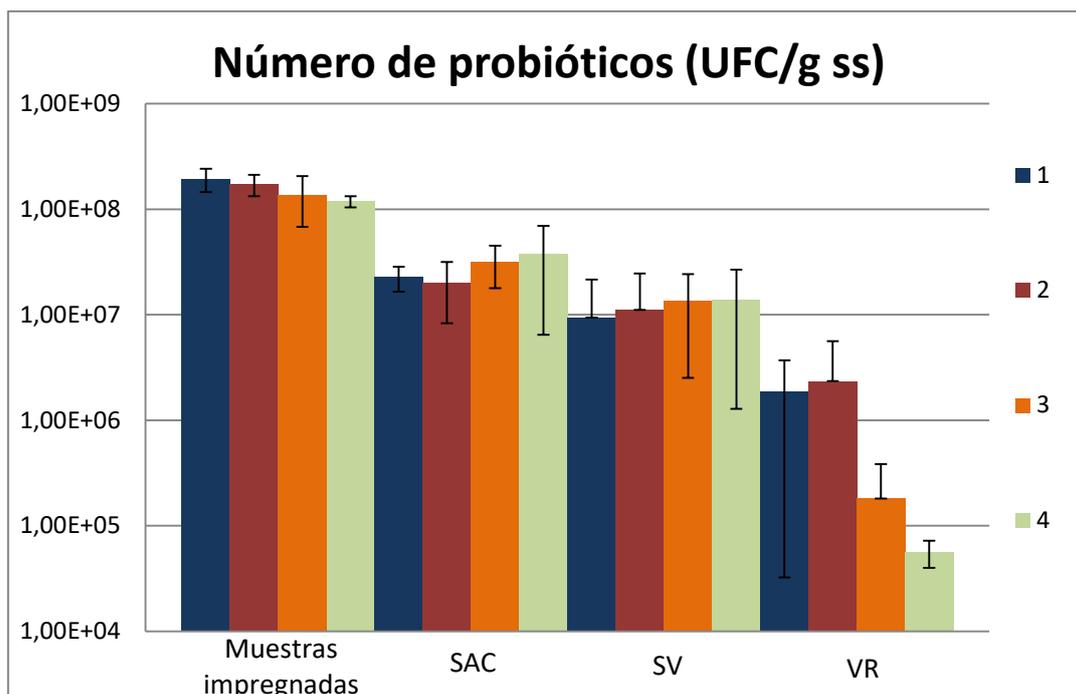
### 5.3 Contenido en microorganismos para los diferentes tratamientos

El valor medio de microorganismos en el caldo de cultivo fue de  $3,5 \times 10^9$  UFC/ml. Por otro lado, tras preparar la solución de impregnación con agua peptonada y caldo de cultivo, el recuento de microorganismos fue de  $1,8 \times 10^9$  UFC/ml.

Tras realizar la impregnación y el secado de las muestras por los diferentes métodos, el recuento de microorganismos se lleva a cabo en las placas con UCF entre 30 y 300 (*Figura 18*). Los valores de los recuentos se dan en la *Figura 19*.



**Figura 18.** Ejemplo de recuento de colonias según la dilución.



**Figura 19.** Promedio de las UFC/g ss obtenidas para las muestras previamente al secado y después de los diferentes tratamientos de secado.

Dado el diferente contenido en humedad de las distintas muestras, se han calculado las UFC/g de muestra seca a fin de poder comparar los diferentes tratamientos en términos de la viabilidad celular. En primer lugar, el ANOVA de los recuentos en las muestras antes del secado sometidas a los diferentes pretratamientos (*Tabla 3*) no reflejó diferencias significativas entre ellos, lo que ya parece indicar que la carga inicial de probióticos en el tejido de manzana no estuvo afectada significativamente por el incremento de porosidad de las muestras (microperforación láser) ni por la acción de mecanismos hidrodinámicos asociados a la aplicación de vacío. Por tanto, la retención en la superficie de la fruta cortada parece ser el mecanismo predominante de fijación de microorganismos.

**Tabla 3.** Análisis de la varianza comparando los pretratamientos en las muestras sin secar.

Pretratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	3	6,55E8	9,20868E7	X
2	3	5,85667E8	9,20868E7	X
3	3	4,65E8	9,20868E7	X
4	3	4,02333E8	9,20868E7	X

Por otro lado, en general hubo un descenso significativo del número de células viables debido al tratamiento de secado, en relación con las muestras impregnadas. El tratamiento VR dio lugar a recuentos más bajos de microorganismos lo cual es atribuible a la mayor temperatura de secado (70°C). A pesar de que los tiempos de secado fueron menores, la viabilidad de los microorganismos disminuyó por la exposición prolongada a alta temperatura.

Así mismo, el tratamiento de secado a vacío (SV) también supuso un menor recuento de microorganismos viables en las muestras, lo cual podría asociarse a la exposición prolongada a vacío, a pesar de su baja temperatura de secado (45°C). La acción del vacío durante el secado podría además implicar un cierto nivel de vaciado del líquido impregnado con los microorganismos en los poros superficiales del tejido quedando más expuestos en la superficie o incluso siendo expulsados de la muestra.

La *Tabla 4* muestra los parámetros del ANOVA con el factor tipo de secado donde puede observarse la falta de homogeneidad en los recuentos para los distintos tipos de secado, así como las diferencias significativas comentadas en cuanto a la viabilidad de los microorganismos en cada tipo de secado.

Además, el ANOVA no reflejó diferencias significativas en el contenido en células viables asociadas a los diferentes pretratamientos (aplicación o no de perforación láser y de impregnación a vacío), tal como refleja la *Tabla 5*; los recuentos en las cuatro combinaciones de los pretratamientos fueron un grupo estadísticamente homogéneo. Esto podría indicar que los microorganismos no se introducen en la estructura porosa interna del tejido ni por la acción de los mecanismos hidrodinámicos asociados a la acción del vacío ni por fomentar la porosidad de las muestras mediante perforaciones láser, tal como se observó en las muestras pre-tratadas antes de su secado.

**Tabla 4.** Análisis de la varianza comparando los tres tipos de secado.

<i>Método de secado</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
SAC	12	2,57667E7	3,21695E6	X
SV	12	1,18814E7	3,21695E6	X
VR	12	1,01802E6	3,21695E6	X

**Tabla 5.** Análisis de la varianza comparando los cuatro tipos de pretratamiento.

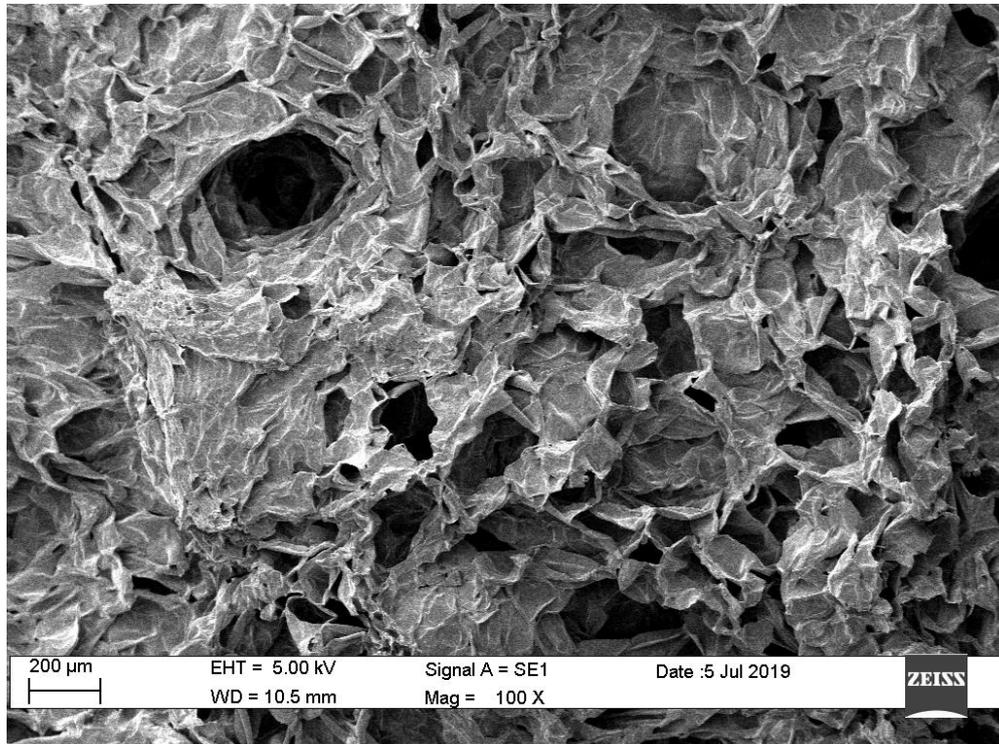
<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	9	1,0645E7	5,12534E6	X
2	9	1,0303E7	5,12534E6	X
3	9	1,43782E7	5,12534E6	X
4	9	1,62286E7	5,12534E6	X

En base a los resultados, el secado convencional por aire caliente, con la inmersión directa de la fruta en el caldo de cultivo de los microorganismos, sería el método recomendado para obtener la máxima viabilidad de microorganismos en la muestra, con un contenido promedio de  $2,6 \times 10^7$  UFC/g ss, equivalente a  $2,40 \times 10^7$  UFC/g de producto.

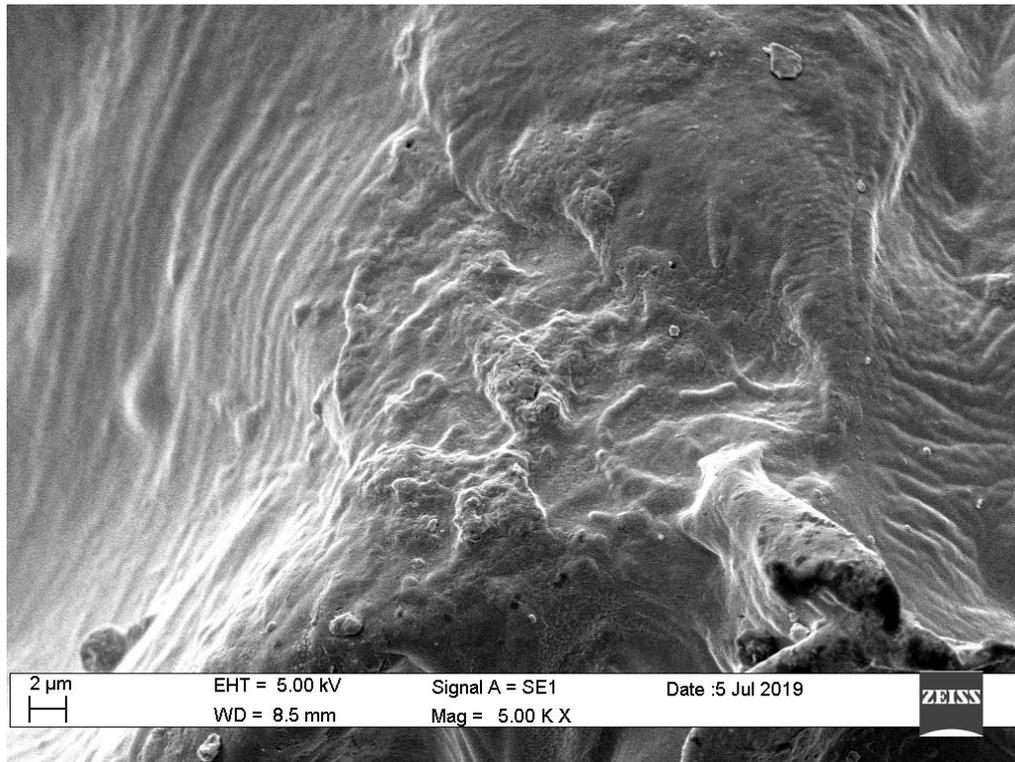
#### 5.4 SEM (Microscopía Electrónica de Barrido)

Solamente se tomaron imágenes SEM de 5 tipos de muestras distintas: SV4, VR1, VR2, VR4, SAC3. En diferentes muestras puede observarse la microperforación creada con el láser, además de la estructura porosa que tiene la manzana (Figura 20) y la presencia de *Lactobacillus Rhamnosus* en diferente proporción, dependiendo del campo de observación.

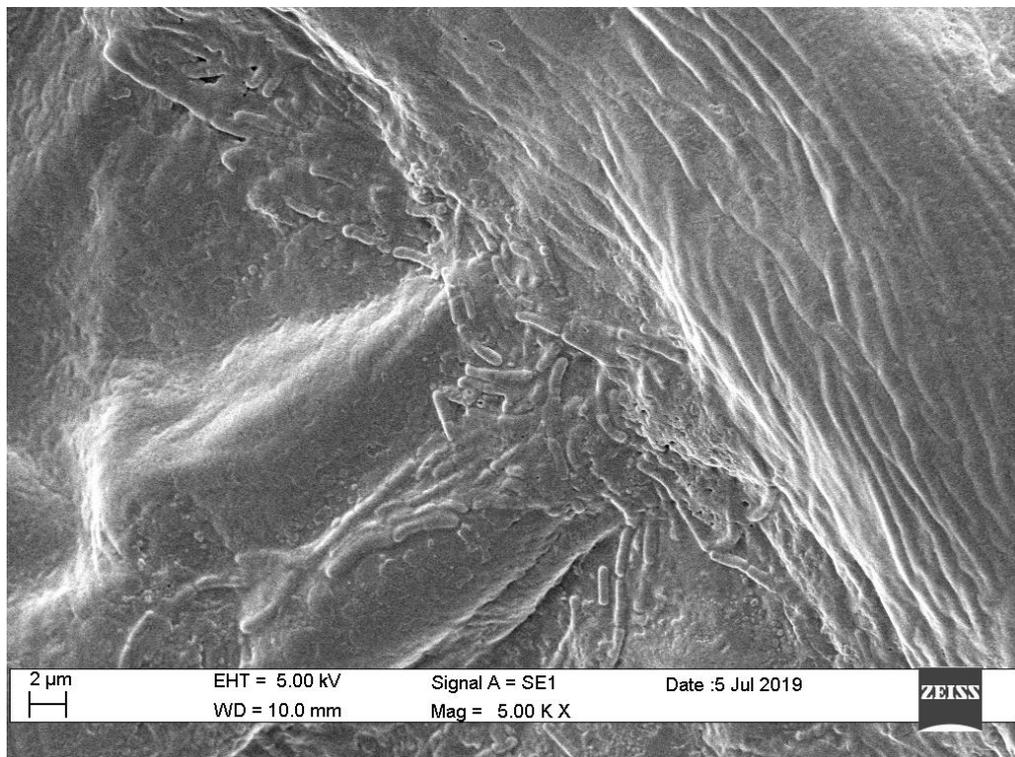
Es de mencionar que los diferentes pre-tratamientos de fijación de la muestra previa a su observación microscópica pudieron haber eliminado parte de las células. Por tanto, las observaciones son puramente cualitativas y únicamente evidencian la presencia de células en el tejido vegetal, tal como reflejan los recuentos realizados.



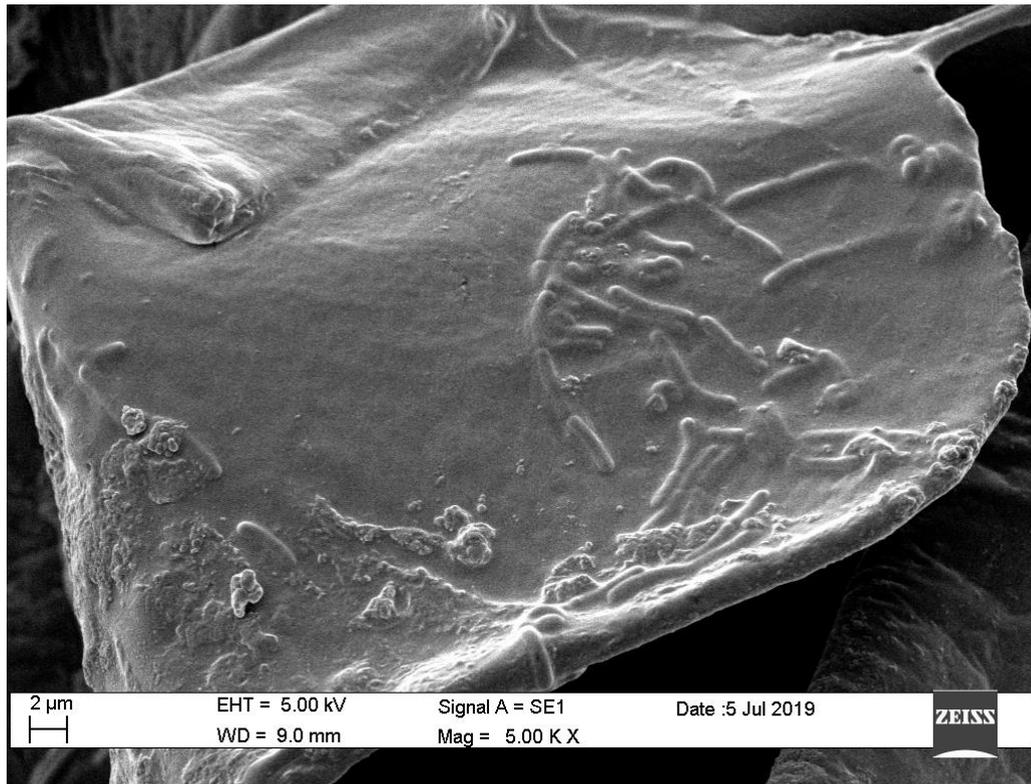
**Figura 20.** Imagen SEM de una muestra microperforada, impregnada a vacío y secada con ventana refractiva (VR4).



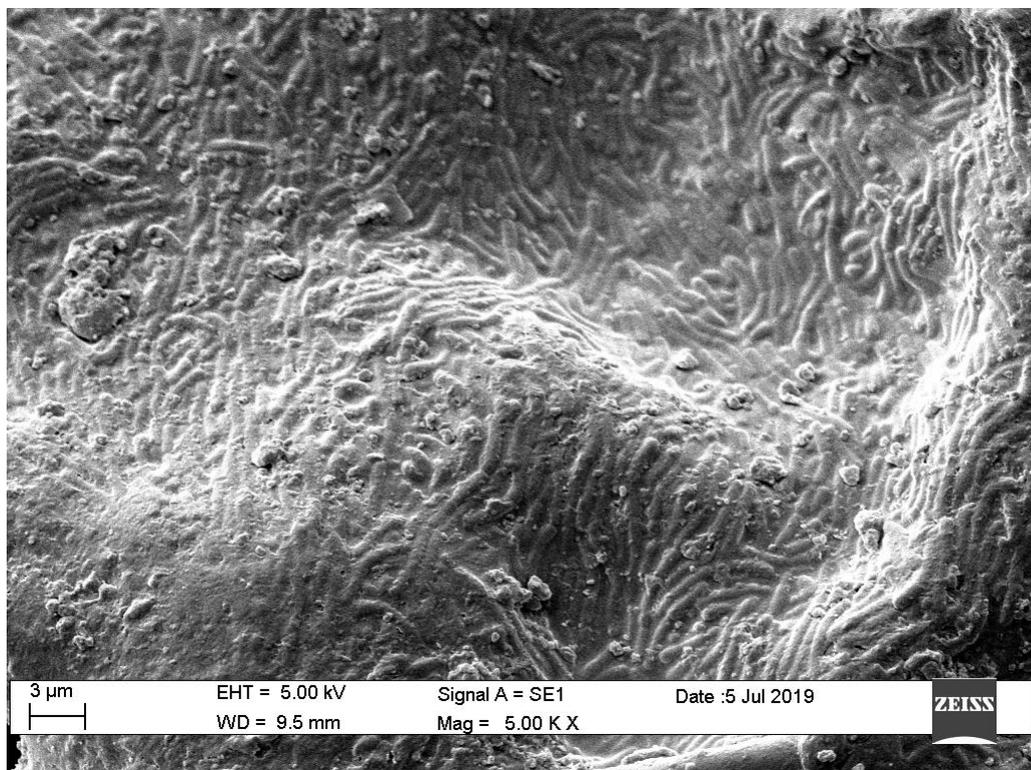
**Figura 21.** Imagen SEM de una muestra sin perforación, impregnada sin vacío y secada con ventana refractiva (VR1).



**Figura 22.** Imagen SEM de una muestra microperforada, impregnada sin vacío y secada con ventana refractiva (VR2).



**Figura 23.** Imagen SEM de muestra microperforada, impregnada a vacío y secada con secado a vacío (SV4).



**Figura 24.** Imagen SEM de una muestra sin perforación, impregnada a vacío y secada con aire caliente (SCA3).

## 6. CONCLUSIONES

1. La comparación de los tres tipos de secado refleja un mayor contenido en microorganismos en las muestras secadas por aire caliente que en el secado a vacío y por ventana refractiva. En este último caso se obtuvieron los menores recuentos de células viables en las muestras.
2. Por otro lado, los distintos pretratamientos con perforación láser o aplicación de vacío para la impregnación en la manzana no comportaron un incremento significativo del recuento de microorganismos en comparación con la inmersión simple de la muestra no perforada o no impregnada a vacío en el caldo de cultivo.

Por consiguiente, la inmersión directa en el caldo de cultivo y el secado por aire caliente de las muestras sería el método propuesto para la obtención del producto probiótico de fruta.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AKMAN, P. K.; UYSAL, E.; OZKAYA G. U.; TORNUK F. y DURAK M. Z. (2019). Development of probiotic carrier dried apples for consumption as snack food with the impregnation of *Lactobacillus paracasei*. *LWT – Food Science and Technology*, nº 103, pp. 60-68.
- CRUZ, I. (2012). Alimentos funcionales. *Conasi*. Visto el 18 de julio de 2019. <<https://www.conasi.eu/blog/consejos-de-salud/alimentos-funcionales/>>
- FITO, P.; CHIRALT, A.; BARAT, J; ANDRÉS, A.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J. y MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2001). Vacuum impregnation for development of new dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, vol. 49, nº 4, pp. 297-302.
- FUJIMARU, T.; LING, Q. y MORRISSEY, M. T. (2012). Effects of Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) Laser Perforation as Skin Pretreatment to Improve Sugar Infusion Process of Frozen Blueberries. *Journal of Food Science*, vol. 77, nº 2, pp. 45-52.
- OCHOA-MARTÍNEZ, C.I.; QUINTERO P.T.; AYALA, A.A. y ORTIZ M. J. (2012). Drying characteristics of mango slices using the Refractance Window technique. *Journal of Food Engineering*, vol. 109, nº1, pp. 69-75.
- ORTIZ, J.; LEMUS-MONCADA, R.; VEGA-GALVEZ, A.; AH-HEN, K.; PUENTE-DIAZ, L.; ZURA-BRAVO, L. y AUBOURG, S. (2013). Influence of air-drying temperature on drying kinetics, color, firmness and biochemical characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fillets. *Food chemistry*, vol 139, nº 1-4, pp. 162-169.
- VEGA, A.; TELLO, C. y LEMUS, R. (2007). Simulación matemática del proceso de secado de la Gracilaria Chilena (*Gracilaria Chilensis*). *Revista Chilena de Ingeniería*, vol. 15, nº 1, pp. 55-64.

VEGA, A.; CHACANA, M. y LEMUS, R. (2006). La Industria de los alimentos deshidratados y la importancia del control de procesos. *Revista Chilena para la Industria de Alimentos. Indualimentos*, vol. 9, n° 42, pp. 50-67.

### **Bibliografía de consulta**

ACOSTA, M y MÉNDEZ, J. (2013). Secado por ventana refractiva. *Prezi*. Visto el 16 de abril. <<https://prezi.com/jqgtacbnpbbf/secado-por-ventana-refractiva/>>.

ALBA, C. A.; RIVERA, R. M.; BON, J. C. y PARGA, F. J. (2015). *Secado: Operación y funcionamiento del secado de charola; Secado de materia solido en estufa; Cinética de secado de sólidos con secador solar. Informe de prácticas*. Aguascalientes: Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Aqualab Series 4 (s.f.). *LabFerrer*. Visto el 25 de marzo de 2019. <<https://www.labferrer.com/actividad-agua-isotermas/como-medir-la-actividad-de-agua-y-las-isotermas/aqualab-series-4.html>>.

ARAYA, H. y LUTZ, M. (2003). Alimentos funcionales y saludables. *Scielo* (versión On-line ISSN 0717-7518), vol. 30, n° 1.

Baño de agua WNB 22. *Memmert Experts in Thermostatics*. Visto el 8 de mayo de 2019. <<https://www.memmert.com/es/home/>>.

BERNAL, C.A.; DÍAZ-MORENO, C. y GUTIÉRREZ-CORTÉS, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Scielo* (Versión On-line ISSN 0717-7518), vol. 44, n° 4.

BRUMOVCKY, L. A. y HORIANSKI M. A. (2014). *Predicción y medición de la actividad de agua*. Trabajo práctico. Posadas: Universidad Nacional de Misiones.

DE LA CRUZ BORJA, P. (2017). *Diseño de una cámara de recirculación para deshidratar 5 toneladas de manzanas utilizando un sistema de refrigeración*. Tesis en Ingeniería Mecánica. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.

Escala de McFarland (2018). *Microbiologia671*. Visto el 28 de mayo de 2019. <<https://microbiologia671.wordpress.com/2018/02/21/practica-escala-de-mcfarland/>>.

FERNÁNDEZ AEDO, P. A. (2007). *Estudio de la impregnación a vacío de miel y su efecto en atributos de calidad de hojuelas de manzana (variedad Granny Smith) deshidratada*. Tesis en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Santiago de Chile: Universidad de Chile.

Herramientas de la nueva cocina-i: impregnación a vacío (2005). *La margarita se agita*. Visto el 17 de abril. <<https://lamargaritaseagita.com/index.php/2005/04/18/herramientas-de-la-nueva-cocina-i-impregnacion-a-vacio/>>.

La importancia de conocer la actividad de agua (2012). *Interempresas*. Visto el 10 de junio. <<http://www.interempresas.net/Quimica/Articulos/69770-La-importancia-de-conocer-la-actividad-de-agua.html>>.

Láser de dióxido de carbono (s.f.). *Wikipedia*. Visto el 10 de junio de 2019. <[https://es.wikipedia.org/wiki/Láser\\_de\\_dióxido\\_de\\_carbono](https://es.wikipedia.org/wiki/Láser_de_dióxido_de_carbono)>.

LUX, A. (s.f.). *Manual de microscopía electrónica ultraestructura y citología vegetal*. Colección Digital de la UNL. Bratislava, Checoslovaquia.

Magnificación en un microscopio (2014). *USB Microscopio Digital*. Visto el 17 de julio de 2019. <<https://usbmicroscopiodigital.com.mx/blog/noticias/magnificacion-en-un-microscopio/>>.

MICROANALÍTICA ARGENTINA SRL (s.f.) *Series 4 te*. Visto el 17 de abril. <<https://www.microanalitica.com.ar/series4te.html>>.

MUÑOZ, A (2019). Chile: el país productor de fruta que las come hasta un 50% menos que el mínimo recomendado. *BioBioChile*. Visto el 25 de marzo de 2019. <<https://www.biobiochile.cl/noticias/nacional/chile/2019/03/21/chile-el-pais-productor-de-fruta-que-las-como-hasta-un-50-menos-que-el-resto-del-mundo.shtml>>.

OCORO, M. U. y AYALA, A. A. (2012). Evaluación de la técnica de ventana de refractancia en el secado de puré de papaya (*Carica papaya* L.). *Vitae* (versión On-line), vol. 19, nº 1, S72-S74.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2019). *Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles*. Visto el 2 de mayo de 2019. <[https://www.who.int/elena/titles/fruit\\_vegetables\\_ncds/es/](https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/es/)>.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (s.f.). *Fomento del consumo mundial de frutas y verduras*. Visto el 2 de mayo de 2019. <<https://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/>>.

Preparación escala McFarland (2016). *ACAVMEN*. Visto el 28 de mayo de 2019. <<https://acavmen.wordpress.com/2016/05/31/microbiologia-practica-4/>>.

¿Qué es un láser? *Centro de láseres pulsados (CLPU)*. Visto el 8 de mayo de 2019. <<https://clpu.es/divulgacion/bits/que-es-un-laser>>.

SÁNCHEZ, M. T.; RUIZ, M. A. y MORALES, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica* (Versión On-line). Vol. 56, nº 1, pp 45-49.

SPRING K. R. y DAVIDSON M. W. (s.f.). Working Distance and Parfocal Length. *MICROSCOPYU*. Visto el 17 de Julio de 2019. <<https://www.microscopyu.com/microscopy-basics/working-distance-and-parfocal-length>>

SYNRAD, A NOVANTA COMPANY (s.f.). *ti Series: 60 W – 100 W Lasers*. Visto el 6 de julio de 2019. <<https://www.synrad.com/products/lasers/ti-series>>.

Técnicas novedosas de secado de alimentos (2015). *ESTUDIAREneUROPA*. Visto el 20 de marzo. <<https://ciencia.estudiareneuropa.eu/s/3969/76705-Agricultura/4049610-Tecnicas-novedosas-de-secado-de-alimentos.htm>>.

TIRADO, D. F.; ACEVEDO-CORREA, D. y MONTERO-CASTILLO, P. M. (2016). Secado de rodajas de fruto del árbol del pan mediante la técnica de Ventana Refractiva. *Tecno Lógica* (versión On-line), Vol. 19, no. 36, pp. 103-111.

UNIVERSIDAD DE ALICANTE (2012). *SEM-sesion*. Servicio de selección e información. Visto el 17 de julio de 2019. <<https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2012/especifica/tecnicas-instrumentales-en-el-analisis-de-superficie/sem-sesion-12-de-noviembre.pdf>>.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (s.f.). *Preparación de muestras para el microscopio de barrido*. Servicio de Microscopía Electrónica. Visto el 17 de julio de 2019. <<http://www.upv.es/entidades/SME/info/753330normalc.html>>.