

ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS OPERACIONES DE LIOFILIZACIÓN Y DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS Y LAS PROPIEDADES ÓPTICAS Y MECÁNICAS DE UN SNACK DE MANZANA (VAR *GRANNY SMITH*) CON UN ELEVADO CONTENIDO EN *LACTOBACILLUS SALIVARIUS SPP. SALIVARIUS*.

Laura Morales Benavides¹, Ester Betoret Valls¹, Noelia Betoret Valls¹, Cristina Barrera Puigdollers¹.

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el efecto de las operaciones de liofilización y deshidratación osmótica sobre la viabilidad de los microorganismos y las propiedades ópticas y mecánicas de un alimento probiótico desarrollado a partir de manzana (var. *Granny Smith*) y zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius spp salivarius*. Ambos métodos de estabilización se aplicaron sobre discos de manzana impregnados de 2.5 y 7 mm de espesor. La operación de liofilización se llevó a cabo durante períodos de 12 y 24 horas. Los ensayos de deshidratación osmótica se llevaron a cabo con disoluciones osmóticas cuyas concentraciones de sacarosa fueron de 35 y 55 °Bx. De acuerdo a los resultados obtenidos, las propiedades ópticas y mecánicas de las muestras liofilizadas se vieron afectadas por la duración del proceso. Por lo que respecta a las muestras deshidratadas osmóticamente, el contenido en sólidos solubles de su fase líquida no afectó considerablemente a las propiedades ópticas y mecánicas de las mismas. El contenido microbiano en el proceso de liofilización resultó del orden 10^8 y 10^9 UFC/g y en la deshidratación osmótica del orden de 10^7 y 10^8 UFC/g. En todos los casos, los productos obtenidos cumplen con las especificaciones de la International Dairy Federation para garantizar un efecto beneficioso contra la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat l'efecte de les operacions de liofilització i deshidratació osmòtica sobre la viabilitat dels microorganismes i les propietats òptiques i mecàniques d'un aliment probiòtic desenvolupat amb poma (var. *Granny Smith*) i suc de mandarina comercial inoculat amb *Lactobacillus salivarius spp salivarius*. Ambdós mètodes d'estabilització es van aplicar sobre discs de poma impregnats de 2.5 i 7 mm d'espessor.

¹Instituto de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo.
Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n 46022. Valencia. España.

L'operació de liofilització es va dur a terme durant períodes de 12 i 24 hores. Els assaigs de deshidratació osmòtica es van realitzar amb dissolucions osmòtiques les concentracions de sacarosa de les quals van ser de 35 i 55 °Bx. D'acord als resultats obtinguts, les propietats òptiques i mecàniques de les mostres liofilitzades es van veure afectades per la durada del procés. Pel que respecta a les mostres deshidratades osmòticament, el contingut en sòlids solubles de la seva fase líquida no va afectar considerablement les propietats òptiques i mecàniques de les mateixes. El contingut microbià en el procés de liofilització va resultar de l'ordre 10^9 i 10^8 UFC/g i en la deshidratació osmòtica de l'ordre de 10^8 i 10^7 UFC/g. En tots els casos, els productes obtinguts compleixen amb les especificacions de l'International Dairy Federation per garantir un efecte beneficiós contra la infecció ocasionada per *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

In this study, the effect of freeze drying operation and osmotic dehydration on the viability of microorganisms and optical and mechanical properties of one probiotic food developed from apple (var. Granny Smith) and commercial mandarin juice inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* was tested. Both stabilization methods were applied on apple disks impregnated with 2.5 and 7 mm thick. The freeze drying operation was carried out during periods of 12 and 24 hours. Osmotic dehydration tests were carried out with osmotic solutions which sucrose concentrations were 35 and 55 ° Bx. According to the results obtained, the optical and mechanical properties of freeze-dried samples were affected by the duration of the process. As regards, in the osmotically dehydrated samples, the soluble solids content of liquid phase does not significantly affect the optical and mechanical properties. The microbial content of the freeze drying process was on the order of 10^9 and 10^8 CFU/g and in osmotic dehydration operation on the order of 10^8 and 10^7 CFU/g. In all cases, the products obtained meet the specifications of the International Dairy Federation to ensure a beneficial effect against infection caused by *Helicobacter pylori*.

PALABRAS CLAVE: *Helicobacter pilory*, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, impregnación a vacío, liofilización, deshidratación osmótica, propiedades mecánicas y propiedades ópticas.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter Pylori es una bacteria patógena grampositiva que causa gastritis de tipo B, úlceras pépticas y gastritis crónica activa. Es una de las infecciones más comunes y depende en gran medida del nivel socioeconómico, llegando a afectar al 50% de la población en países desarrollados y al 90% de la población en países en desarrollo. Su asociación con la úlcera gastroduodenal y su inclusión por parte de la IARC (International Agency for Research on Cancer), en 1994, entre los agentes carcinógenos tipo I, la ha convertido en uno de los microorganismos de mayor interés en patología humana (Hunt et al., 1998).

Actualmente, los tratamientos para erradicar dicho patógeno se basan en dos o tres antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, claritromicina o metronidazol) más un inhibidor de bomba de protones (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol, esomeprazol) o antagonistas de los receptores H₂ (ranitidina, cimetidina, famotidina) durante un periodo comprendido entre 7 y 14 días. Aunque este tratamiento es efectivo en el 85% de los casos (Graham y Yamaoka, 2000), puede fallar por la aparición de resistencia o intolerancia de los pacientes a los antimicrobianos.

Como alternativa, se han desarrollado diversos estudios clínicos y modelos *in vitro* que demuestran que la asociación de bacterias del género *Lactobacillus* con antibióticos para el tratamiento de la infección ocasionada por *Helicobacter pylori* ejerce un efecto antagonista frente a este microorganismo y reduce los síntomas de intolerancia digestiva debidos a los antibióticos (Hamilton-Miller, 2003). En todos los casos se han empleado productos líquidos, en su mayoría lácteos, como fuente del microorganismo probiótico.

Por otra parte, la impregnación a vacío ha sido confirmada como una técnica eficaz en la incorporación de componentes con actividad fisiológica en la estructura porosa de determinados alimentos para, de esta forma, obtener alimentos funcionales de apariencia similar a la que presentan en estado fresco (Fito *et al.*, 2001a y b; Gras *et al.*, 2003; Betoret *et al.*, 2003; Barrera *et al.*, 2004; Alzamora *et al.*, 2005; Anino *et al.*, 2006).

Mediante la técnica de impregnación a vacío y el secado por aire caliente, el grupo de funcionales del IU-IAD ha desarrollado un producto a partir de manzana con un contenido en *Lactobacillus salivarius spp, salivarius* cercano a 10⁸ UFC/g. El estudio piloto con pacientes dispépticos demostró que la incorporación a la dieta del producto desarrollado ejerce un efecto positivo contra la infección ocasionada por *Helicobacter pylori* (Arilla, 2008; Betoret *et al.*, 2009). Sin embargo, la valoración sensorial del producto final por parte de los pacientes implicados en este estudio hizo recomendable una mejora en el aspecto y la consistencia del mismo. Concretamente la textura y el color fueron las características de calidad peor valoradas por los pacientes.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación de diversos métodos de conservación como son la liofilización y la deshidratación osmótica, sobre la viabilidad de los microorganismos y las propiedades mecánicas y ópticas de un alimento probiótico desarrollado a

partir de manzana (var *granny smith*) y zumo de mandarina con un elevado contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Recuperación del microorganismo liofilizado.

La cepa de cultivo puro de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia, España). De acuerdo a las instrucciones establecidas por la CECT para la recuperación del cultivo liofilizado, éste se resuspendió con 1-2 mL de medio de cultivo MRS (Man Rogosa and Sharpe, Scharlau Chemie ®, Barcelona, España) en condiciones de asepsia. A continuación, el líofilo estéril se colocó en 250 mL de medio específico MRS y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Medio de crecimiento y líquido de impregnación.

El medio de crecimiento empleado en este estudio fue zumo de mandarina comercial (Don Simón) adquirido en un supermercado local. Con el objeto de conseguir que el zumo reuniera las características adecuadas para el óptimo crecimiento del microorganismo, se adicionó levadura en una proporción de 5 g/L y bicarbonato sódico en una proporción de 9.8 g/L. Para evitar la competencia con la bacteria ácido-láctica y prevenir el excesivo oscurecimiento del medio, la levadura se esterilizó con parte de zumo a 121 °C durante 20 minutos. Cada litro de zumo se inoculó con 4 mL de medio MRS que contenía el microorganismo crecido y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Este medio fue empleado como líquido de impregnación. Tanto el zumo comercial como el medio de crecimiento y el líquido de impregnación se caracterizaron en términos de pH, densidad aparente, contenido en sólidos solubles y contenido microbiano.

Materia prima.

Se utilizaron manzanas de la variedad *Granny Smith*, en estado de madurez adecuado, que fueron adquiridas en un supermercado local. Para llevar a cabo los experimentos de impregnación a vacío, las manzanas se cortaron en discos de 2.5 y 7 mm de espesor y 65 mm de diámetro siguiendo la dirección del eje longitudinal y se descorazonaron con un sacabocados metálico de 20 mm.

Ensayos de impregnación a vacío (IV).

La operación de impregnación a vacío se llevó a cabo en un equipo construido a nivel de planta piloto en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (Fito *et al.*, 1996). En primer lugar, las muestras se sumergieron en el líquido de impregnación y se

aplicó una presión de vacío de 50 mbar durante 10 minutos. A continuación, se restauró la presión atmosférica, manteniendo las muestras sumergidas en el medio durante otros 10 minutos. En todos los casos, la relación entre la masa de líquido de impregnación y la masa de manzana fresca fue de 5 gramos de zumo por gramo de manzana fresca. Las muestras impregnadas fueron evaluadas en términos de humedad, contenido en sólidos solubles, actividad del agua, contenido microbiano, textura y color.

Ensayos de liofilización.

En los ensayos de estabilización por aplicación de la técnica de liofilización, las muestras de manzana impregnadas se congelaron durante 6 horas a -45° C en un ultracongelador Dycometal (Barcelona, España). Posteriormente, el agua contenida en las mismas se sublimó en un liofilizador LIOALFA 6-80 a una temperatura de -40° C y a una presión de vacío de 0.1 mbar, durante 12 y 24 horas. Las muestras liofilizadas se caracterizaron en términos de humedad, contenido microbiano, textura y color.

Ensayos de deshidratación osmótica.

En los ensayos de estabilización por aplicación de la técnica de deshidratación osmótica, las muestras de manzana impregnadas se sumergieron en disoluciones acuosas de sacarosa 35 y 55 Brix (relación 1:20 entre la masa de manzana impregnada y la masa de disolución osmótica), a temperatura ambiente, agitadas con una velocidad de 600 rpm para obtener una disolución homogénea. A diferentes tiempos a lo largo del proceso de deshidratación osmótica, las muestras se caracterizaron en términos de contenido en sólidos solubles y contenido microbiano. Dichos tiempos fueron establecidos de acuerdo a estudios previos de cinética en los que se analizó la variación en la composición de la fase líquida de las muestras hasta alcanzar el equilibrio composicional. Al final del proceso, cuando la composición de la fase líquida de las muestras se igualó a la de la disolución osmótica empleada, las muestras de manzana se evaluaron en términos de humedad, actividad del agua, textura y color.

Recuento de microorganismos: determinación de viables.

El contenido en microorganismos se determinó por duplicado por el procedimiento de siembra en placa, incubación y conteo. La siembra se realizó en profundidad y con doble capa de agar MRS (Scharlau Chemie ®, Barcelona, España) para garantizar condiciones anaerobias. Las placas resultantes se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Para determinar el contenido microbiano en las muestras sólidas, se mezcló una masa de muestra conocida con agua de peptona (Scharlau Chemie ®, Barcelona, España) en una proporción de 9 mL por gramo de muestra. La mezcla se trituró y homogeneizó en una bolsa stomacher. En el caso de las muestras liofilizadas, éstas fueron previamente rehidratadas

utilizando una relación de 50 mL de líquido (medio de crecimiento) por gramo de manzana y manteniendo las muestras sumergidas durante 24 horas y a temperatura ambiente.

El conteo del número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de zumo inoculado y por gramo de muestra sólida se llevó a cabo en las placas cuyo número de colonias se encontraba entre 30 y 300.

Determinaciones analíticas.

Todas las determinaciones analíticas descritas en este apartado se realizaron, al menos, por triplicado.

DENSIDAD APARENTE

La determinación de la densidad aparente se realizó con un picnómetro de líquidos a 25 °C y utilizando agua destilada como líquido de referencia.

Para calcular la densidad de los zumos (kg/m³) se utilizó la ecuación 1:

$$\rho_{\text{líquido}} = \rho_{\text{agua}} \frac{P_1 - P_0}{P_2 - P_0} \quad (1)$$

donde: P₀ = peso picnómetro vacío (g); P₁ = peso del picnómetro lleno del líquido a determinar su densidad (g); P₂ = peso del picnómetro lleno del líquido de referencia (g).

DETERMINACIÓN DEL pH

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro con sistema autocalibrante (pH Meter S20, METTLER TOLEDO SevenEasy) y capaz de trabajar con compensación automática de temperatura.

HUMEDAD

El contenido en agua de las muestras de manzana impregnadas, liofilizadas y deshidratadas osmóticamente se determinó según el método oficial 20.013 de la AOAC (2000) para frutas ricas en azúcar. Este método se basa en la determinación de la pérdida de peso que experimenta la muestra cuando se coloca en una estufa de vacío a 60 °C hasta alcanzar peso constante. La humedad de las muestras a partir de los pesos obtenidos se calcula con la ecuación 2:

$$x_w = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \quad (2)$$

donde: x_w = fracción másica de agua (kg agua/kg muestra); M₀ = peso del recipiente vacío (kg); M₁ = M₀ + peso de la muestra antes de su secado en estufa (kg); M₂ = M₀ + peso de la muestra tras su secado en estufa (kg).

ÍNDICE DE REFRACCIÓN Y CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES

La determinación del índice de refracción se realizó con un refractómetro (Abbe Atago 89553 marca Carl Zeiss) termostatado a 20 °C.

ACTIVIDAD DEL AGUA (a_w)

Las determinaciones se realizaron empleando un higrómetro (Water activity meter FA-st lab con sensibilidad del 0.001), que permite obtener una medida directa de la actividad del agua con un sensor infrarrojo de precisión superior al 2% introduciendo un volumen de muestra de aproximadamente 3 cm³ en la cámara de medida. Previamente a la toma de medidas, se calibró el equipo con una disolución salina saturada cuya actividad del agua es conocida: sulfato de potasio (K₂SO₄; $a_w = 0.973$).

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las muestras sólidas se evaluaron mediante un ensayo de punción llevado a cabo con un analizador de textura marca Stable Micro Systems, modelo TA.XT plus y software Texture Exponent 32 versión 2,0,6,0.

El ensayo se realizó con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 2 mm de diámetro a temperatura ambiente. Las condiciones del ensayo fueron: velocidad de avance del punzón de 2.0 mm/s, fuerza de activación de 0.04903 N, distancia recorrida por la sonda de 10 mm y celda de carga de 50 kg. Los datos obtenidos en cada ensayo fueron fuerza máxima (N), tiempo (min) y distancia (mm).

PROPIEDADES ÓPTICAS

El color de las muestras se midió con un espectrofotómetro Minolta modelo CM-3600d, utilizando un iluminante de D65 y un observador estándar con un ángulo de visión de 10° (UNE 40-080, 1984).

Las medidas de color se expresaron en base a las coordenadas CIE L*a*b*. A partir de las coordenadas de color CIE-L*a*b* se estimaron las coordenadas psicométricas tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*) (ecuaciones 3 y 4).

$$h_{ab}^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (3)$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (4)$$

Asimismo, se estimaron las diferencias de color entre las muestras de manzana deshidratadas y las impregnadas mediante la ecuación 5.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (5)$$

donde: L^* = medida de luminosidad; a^* = representa una medida del contenido de rojo o de verde de un color; b^* = representa una medida del contenido de amarillo o azul.

En el caso de las muestras impregnadas y deshidratadas osmóticamente, al tratarse de muestras traslúcidas se corrigieron los valores obtenidos de acuerdo con la teoría de Kubelka-Munk de dispersión de luz múltiple (Judd y Wyszecki, 1975; Hutchings,1999; Talens *et al.*, 2002) que describe las propiedades ópticas de una muestra a cualquier longitud de onda mediante un coeficiente de dispersión (S) y otro de absorción (K). En las muestras traslúcidas una parte de la luz se refleja y otra se transmite de tal manera que las propiedades de reflectancia pueden variar en función del espesor de la muestra y del fondo utilizado.

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} \quad (6)$$

$$R_{\infty} = a - b \quad (7)$$

$$a = \frac{1}{2} \left[R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right] \quad (8)$$

$$b = \sqrt{(a^2 - 1)} \quad (9)$$

donde: R_{∞} = reflectancia infinita; R = reflectancia de la muestra determinada sobre fondo blanco; R_g =reflectancia del fondo blanco; R_0 = reflectancia de la muestra determinada sobre fondo negro

Análisis estadísticos.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos consistió en un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización físico-química del zumo comercial y del líquido de impregnación.

En la TABLA 1 se muestran los valores de las principales propiedades físico-químicas analizadas en el zumo comercial y en el líquido de impregnación por su influencia sobre el desarrollo del microorganismo empleado y sobre el rendimiento de la operación de impregnación a vacío.

TABLA 1. Parámetros físico-químicos del zumo comercial y del líquido de impregnación. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

	pH	°Bx	Densidad (g/cm ³)
Zumo comercial	3.523 \pm 0.006	12.40 \pm 0.01	1.048 \pm 0.002
Líquido de impregnación	5.70 \pm 0.01	11.72 \pm 0.13	1.046 \pm 0.002

Como se puede observar, el pH del zumo de mandarina comercial resultó considerablemente inferior al recomendado para el crecimiento óptimo del microorganismo empleado (5.5.-6.2). Como se ha comentado en el apartado correspondiente de materiales y métodos, para elevar el pH del zumo de mandarina hasta un valor dentro del rango que, según estudios previos (Arilla, 2008; Betoret *et al.*, 2009), garantiza un mayor crecimiento del *Lactobacillus salivarius spp. salivarius*, ha sido necesario añadir bicarbonato sódico en una proporción de 9.8 gramos de NaHCO₃ por litro de zumo. En relación al contenido en sólidos solubles (°Bx), el descenso observado en el líquido de impregnación con respecto al zumo comercial se ha explicado teniendo en cuenta que el *Lactobacillus salivarius spp. salivarius* es una bacteria ácido-láctica que durante su crecimiento fermenta los azúcares presentes en el medio produciendo ácido láctico.

En cuanto a la densidad aparente, no se observaron diferencias entre los dos líquidos comparados, por lo que no se esperan diferencias en el intercambio gas-líquido o en la deformación que experimentan las muestras durante la etapa de impregnación a vacío.

Recuento de microorganismos en el líquido de impregnación.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que, para conseguir un efecto favorable contra la infección ocasionada por la bacteria *Helicobacter pylori*, la concentración de microorganismos en el alimento que se ingiere tiene que ser al menos de 10⁶ UFC/g de producto (International Dairy Federation, 1992) o de 10⁷ UFC/g de producto (Cruchet *et al.*, 2003).

El recuento de microorganismos realizado sobre el líquido de impregnación alcanzó el valor de (3.3 \pm 1.4) \times 10⁸ UFC/mL. Este crecimiento, tal y como se ha confirmado en estudios previos (Arilla, 2008; Betoret *et al.*, 2009), garantiza una concentración microbiana en los discos de manzana impregnada lo suficientemente elevada como para tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la infección ocasionada por *Helicobacter Pylori*.

Caracterización de las muestras impregnadas.

En la TABLA 2 se muestran, para los diferentes espesores estudiados, los valores de los parámetros físico-químicos y el contenido microbiano en los discos de manzana (var. *Granny Smith*) impregnados con el líquido de impregnación.

TABLA 2. Parámetros físico-químicos y contenido microbiano de las muestras impregnadas. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

Espesor (mm)	Parámetros físico-químicos			Contenido microbiano	
	x_w	a_w	$^{\circ}\text{Bx}$	UFC/g	Log (UFC/g)
2.5	0.86714 ± 0.00104	0.985 ± 0.002	12.3 ± 0.4	$(1 \pm 2) \times 10^8$	8.0 ± 0.4
7.0	0.862 ± 0.003	0.985 ± 0.002	12.2 ± 0.3	$(1 \pm 2) \times 10^8$	7.8 ± 0.4

Como era de esperar, los valores de humedad y actividad del agua de la manzana impregnada fueron elevados y similares a los que presenta la fruta fresca sin procesar, no observándose diferencias notables entre los diferentes espesores estudiados.

Respecto al contenido microbiano de las muestras impregnadas, éste resultó del orden de 10^8 UFC/g por lo que, de acuerdo con las especificaciones de la International Dairy Federation, podemos afirmar que cumplen con los requisitos necesarios para ejercer un efecto beneficioso contra la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*. Como en el caso de los otros parámetros analizados, el recuento de viables en las muestras impregnadas resultó ser independiente del espesor de las mismas.

Estudio del efecto de la operación de liofilización sobre el contenido microbiano y las propiedades mecánicas y ópticas de muestras de manzana impregnadas.

CONTENIDO MICROBIANO

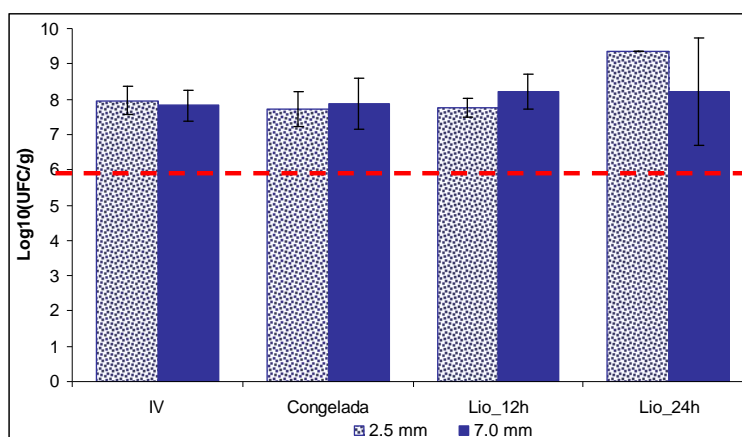


FIGURA 1. Evolución del contenido microbiano en las distintas etapas del proceso de liofilización.

En la figura 1 se muestran los valores de los recuentos efectuados sobre las muestras impregnadas, congeladas y liofilizadas durante 12 y 24 horas. Como se puede observar, la concentración de *L. salivarius spp. salivarius*

resultó en todos los casos del orden de 10^8 y 10^9 . Por lo tanto, ni los diferentes espesores ensayados ni los diferentes tratamientos aplicados influyeron de forma significativa sobre la supervivencia del microorganismo.

Además, de acuerdo con las especificaciones de la International Dairy Federation, es posible afirmar que los productos analizados ejercen un efecto beneficioso contra la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*.

PROPIEDADES MECÁNICAS

Tal y como se ha comentado en el apartado correspondiente de materiales y métodos, las propiedades mecánicas de las muestras impregnadas y liofilizadas se evaluaron mediante un ensayo de punción. Para cada muestra se representó la fuerza (N) en función de la distancia (mm) y se obtuvieron los valores de fuerza máxima (N), distancia que recorre el émbolo hasta la rotura de la muestra (mm) y se calculó el área comprendida bajo la curva (N·mm) (TABLA 4). Según Prothon *et al.* (2001), la fuerza máxima requerida para atravesar la muestra está relacionada con la resistencia del producto a la fractura o firmeza y el área encerrada bajo la curva está relacionada con la energía empleada en romper la muestra.

En la FIGURA 2 se muestra, para los diferentes espesores estudiados, un ejemplo de las curvas fuerza-distancia obtenidas en los ensayos de punción realizados sobre las muestras impregnadas y las muestras liofilizadas durante 12 y 24 horas.

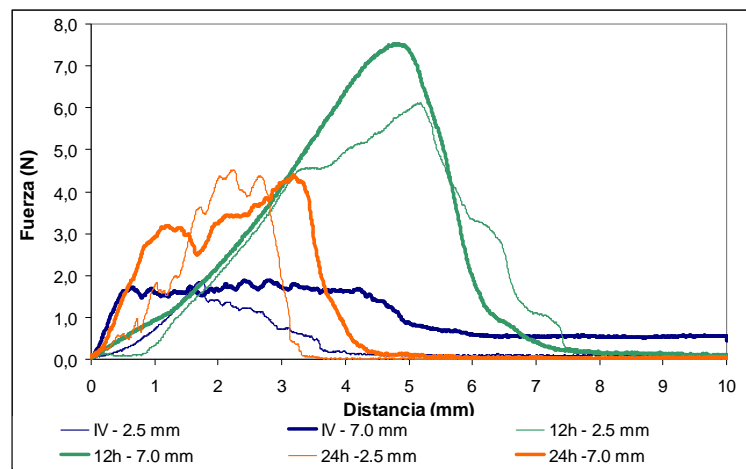


FIGURA 2. Curvas fuerza-distancia obtenidas en el ensayo de punción de las muestras impregnadas y liofilizadas.

Como se puede observar, tanto las curvas de las muestras impregnadas como las curvas de las muestras liofilizadas 24 horas presentaron múltiples fracturas y una mayor pendiente previa a éstas. Este comportamiento en las muestras impregnadas está probablemente asociado a la existencia de turgencia celular, mientras que en las muestras liofilizadas durante 24 horas se ha explicado en términos de la mayor cantidad de agua eliminada en el proceso, lo que probablemente les confiera una textura de tipo crujiente. Por

el contrario, las curvas de las muestras liofilizadas 12 horas presentaron una reducción en la fuerza tras una única fractura. Cabe resaltar, además, que las curvas de las muestras liofilizadas 12 horas experimentaron una mayor deformación previa a la fractura, lo que podría estar relacionado con el estado gomoso alcanzado por las mismas al final del proceso, especialmente en el caso de las muestras de mayor espesor.

TABLA 4. Efecto de la duración del proceso de liofilización y del espesor de las muestras sobre la humedad final y las propiedades mecánicas. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

Muestra	Espesor (mm)	Humedad x_w final	Fuerza (N)	Distancia (mm)	Área (N-mm)
IV	2.5	0.86714 \pm 0.00104	2.0 \pm 0.6 ^a	1.5 \pm 0.2 ^a	5 \pm 2 ^a
	7	0.862 \pm 0.003	1.82 \pm 0.13 ^a	2.77 \pm 1.05 ^b	9.9 \pm 0.6 ^b
Lio12_h	2.5	0.073 \pm 0.005	6.0 \pm 0.8 ^c	4.6 \pm 0.6 ^c	19 \pm 4 ^d
	7	0.123 \pm 0.005	7.74 \pm 1.03 ^d	7 \pm 2 ^d	27 \pm 4 ^e
Lio24_h	2.5	0.054 \pm 0.004	4.5 \pm 0.7 ^b	2.4 \pm 0.6 ^b	9 \pm 3 ^b
	7	0.056 \pm 0.002	4.6 \pm 0.9 ^b	2.6 \pm 0.9 ^b	13 \pm 2 ^c

Valores con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

El análisis múltiple de la varianza realizado con el objeto de determinar si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos puso de manifiesto que, con un nivel de confianza del 95%, los factores tiempo de liofilización y espesor de las muestras ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre las propiedades mecánicas evaluadas. Además, la existencia de interacciones dobles en el modelo indica que el efecto que un factor tiene sobre los valores obtenidos depende del resto de los factores.

En el caso concreto de la fuerza máxima se observa que las muestras liofilizadas necesitaron de una fuerza mayor para romperse, lo que es lógico pues la deshidratación implica pérdida de turgencia celular y de firmeza. Entre las muestras liofilizadas, el aumento en la duración del proceso se tradujo en un descenso en el valor de fuerza máxima, lo que se puede explicar en función de los valores de humedad más bajos alcanzados por dichas muestras conforme aumenta la duración del proceso.

En general, no son significativas, desde un punto de vista estadístico, las diferencias entre los parámetros analizados para un mismo tiempo de liofilización en función del espesor. Únicamente en el caso de las muestras procesadas durante 12 horas, cuando las diferencias entre los contenidos en agua de los dos espesores fue más acusado, las muestras más húmedas presentaron valores de fuerza máxima significativamente más elevados.

Con respecto a los demás parámetros evaluados, la variación de los mismos con el tiempo y el espesor de las muestras resultó muy similar al comentado para el caso de la fuerza máxima.

PROPIEDADES ÓPTICAS

Tal y como se ha comentado en el apartado correspondiente de materiales y métodos, se midió el color de las muestras impregnadas y liofilizadas durante 12 y 24 horas. En la TABLA 5 se muestran las coordenadas de color en el espacio CIE L*a*b*, así como las coordenadas psicrométricas croma (C^*_{ab}) y tono (h^*_{ab}).

TABLA 5. Efecto del tratamiento, la duración del proceso de liofilización y el espesor de las muestras sobre las propiedades ópticas de las mismas. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

Muestra	Espesor (mm)	L*	a*	b*	C* _{ab}	h* _{ab}
IV	2.5	55 \pm 2 ^b	-1.0 \pm 0.3 ^a	14.0 \pm 1.3 ^b	14.0 \pm 1.3 ^b	94.2 \pm 1.2 ^d
	7	34.4 \pm 1.4 ^a	-0.7 \pm 0.5 ^a	8.92 \pm 1.13 ^a	8.96 \pm 1.12 ^a	95 \pm 3 ^d
Lio12_h	2.5	85.7 \pm 1.3 ^c	5 \pm 2 ^d	47 \pm 3 ^d	47 \pm 3 ^d	84 \pm 2 ^a
	7	86 \pm 3 ^{c,d}	3.3 \pm 0.7 ^c	41 \pm 3 ^c	41 \pm 3 ^c	85.4 \pm 0.7 ^b
Lio24_h	2.5	88.0 \pm 1.4 ^d	0.6 \pm 0.3 ^b	39 \pm 2 ^c	39 \pm 2 ^c	89.1 \pm 0.4 ^c
	7	86.9 \pm 1.5 ^{c,d}	1.2 \pm 0.5 ^b	39 \pm 2 ^c	39 \pm 2 ^c	88.5 \pm 0.8 ^c

Valores con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Observando los valores de la tabla, puede afirmarse que hay dos grupos de muestras claramente diferenciados, las muestras impregnadas y las liofilizadas, presentando estas últimas mayores valores de las coordenadas de color en todos los casos.

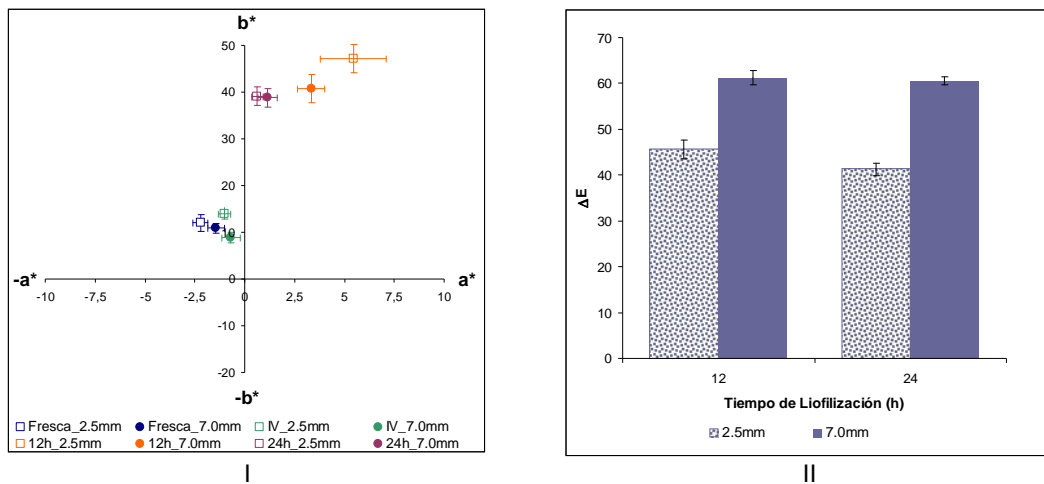


FIGURA 3 (I). Distribución de las coordenadas a* y b* de las muestras frescas, impregnadas y liofilizadas.

FIGURA 3 (II). Las diferencias globales de color de las muestras liofilizadas respecto a las muestras impregnadas.

En el caso de las muestras impregnadas, se registraron valores negativos de la coordenada a* y significativamente menores de la coordenada b*, lo que indica un color verdoso, más parecido al de la manzana fresca. Entre las muestras liofilizadas, las procesadas durante 12 horas presentaron valores

significativamente mayores de las coordenadas a^* y b^* , lo que pone de manifiesto que éstas alcanzaron un color más anaranjado al final del proceso (FIGURA 3(I)).

Por lo que respecta a la coordenada L^* , la liofilización produjo, con independencia de la duración del proceso y del espesor de las muestras, un aumento notable en la luminosidad. Esto puede deberse a que, después de la liofilización los espacios intercelulares que antes estaban llenos de líquido, ahora están llenos de aire, adquiriendo el tejido un aspecto más opaco que se traduce en un color más blanquecino.

En general, el efecto del espesor de las muestras sobre las propiedades ópticas analizadas resultó más evidente en aquellas muestras sometidas a tiempos cortos de procesado (muestras impregnadas y liofilizadas 12 horas).

Observando los valores obtenidos para las coordenadas psicométricas croma (C^*_{ab}) y tono (h^*_{ab}) puede afirmarse que, en el caso del croma, la tendencia de valores así como los grupos de muestras observados son los mismos que para las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, mientras que en el caso del tono estas diferencias se compensan.

En la FIGURA 3(II) se representan las diferencias globales de color evaluadas con respecto a las muestras impregnadas. El cambio de color observado se debe a la pérdida de agua que tiene lugar durante el proceso de liofilización. Como se puede comprobar, las diferencias observadas en este parámetro se deben únicamente al espesor de muestra y no a la duración del tiempo de liofilización.

Estudio del efecto de la operación de deshidratación osmótica sobre el contenido microbiano y las propiedades mecánicas y ópticas de muestras impregnadas.

El análisis de la composición de la fase líquida de las muestras (FIGURA 4) puso de manifiesto el efecto del espesor de las mismas en su evolución hacia el equilibrio composicional. Como cabía esperar, las muestras de mayor espesor tardaron más tiempo en igualar la composición de su fase líquida a la de la disolución osmótica exterior, siendo este fenómeno especialmente notable en el caso de las muestras procesadas con la disolución más concentrada.

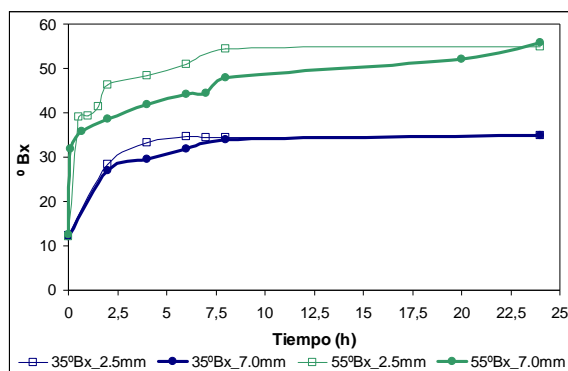


FIGURA 4. Evolución del contenido en sólidos solubles en la composición de la fase líquida de las muestras.

CONTENIDO MICROBIANO

La FIGURA 5 muestra los recuentos obtenidos a diferentes concentraciones de sacarosa alcanzadas en la fase líquida de las muestras. Colores de barras diferentes hacen referencia a las dos disoluciones osmóticas empleadas.

Como puede observarse, la concentración de *L. salivarius spp. salivarius* en las muestras deshidratadas osmóticamente resultó del orden de 10^7 y 10^8 en todos los casos. Además, ni el espesor de muestra ni las concentraciones de sacarosa alcanzadas en la fase líquida influyeron de forma significativa (con un nivel de confianza del 95%) en la supervivencia del microorganismo empleado. Del mismo modo, la presión osmótica inicial no afectó al contenido microbiano ya que, partiendo de dos disoluciones osmóticas diferentes, se obtuvieron los mismos resultados al alcanzarse los 35 °Bx en la fase líquida de las muestras.

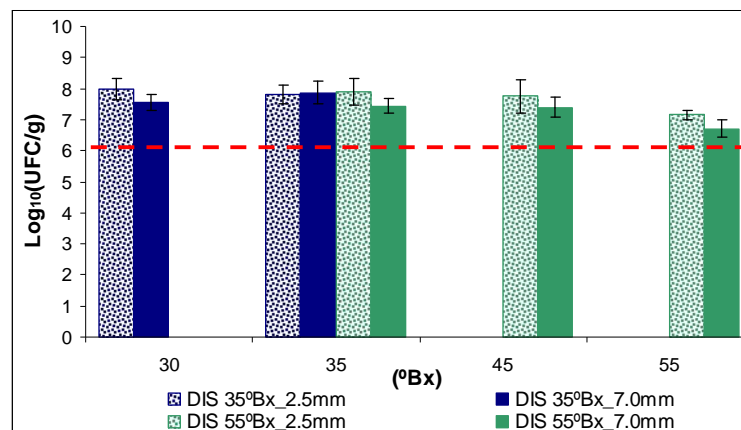


FIGURA 5. Evolución del contenido microbiano para las diferentes concentraciones de sólidos solubles (°Bx) en la fase líquida de las muestras deshidratadas osmóticamente.

Por último, cabe resaltar que, en todos los casos, las muestras presentaron un contenido microbiano suficiente para, de acuerdo con las especificaciones de la International Dairy Federation, garantizar un efecto beneficioso contra la infección ocasionada por el *Helicobacter pylori*.

PROPIEDADES MECÁNICAS

Tal y como se ha comentado en el apartado correspondiente de materiales y métodos, las propiedades mecánicas de las muestras impregnadas y deshidratadas osmóticamente se evaluaron mediante un ensayo de punción. La FIGURA 6 muestra, para las diferentes disoluciones y espesores estudiados, el comportamiento de las curvas fuerza-distancia de las muestras impregnadas y deshidratadas.

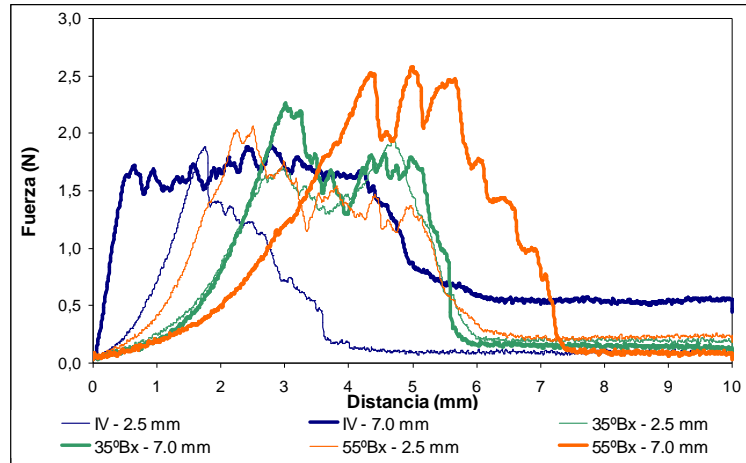


FIGURA 6. Curvas fuerza-distancia obtenidas en los ensayos de punción de las muestras deshidratadas osmóticamente.

Como se puede observar, el comportamiento de las curvas de las muestras impregnadas y deshidratadas osmóticamente en los espesores estudiados fue muy similar, presentando múltiples fracturas. Este resultado, unido al aumento en la distancia recorrida por el émbolo hasta que se produce la rotura de la muestra, pone de manifiesto que los cambios en las propiedades mecánicas asociados a la deshidratación osmótica afectaron fundamentalmente a las capas de tejido más próximas a la interfase, manteniendo el tejido interno la turgencia característica del tejido fresco.

Además, como cabía esperar, la deformación previa a la rotura resultó más elevada en las muestras deshidratadas con la disolución osmótica de mayor concentración por presentar éstas un mayor grado de alteración celular.

TABLA 7. Efecto de contenido de sólidos solubles y el espesor de las muestras deshidratadas osmóticamente sobre la humedad y las propiedades mecánicas de las mismas. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

°Bx	Espesor (mm)	Humedad	Fuerza (N)	Distancia (mm)	Área (N·mm)
IV	2.5	0.86714 \pm 0.00104	2.0 \pm 0.6 ^a	1.5 \pm 0.2 ^a	5 \pm 2 ^a
	7	0.862 \pm 0.003	1.82 \pm 0.13 ^a	2.77 \pm 1.05 ^b	9.9 \pm 0.6 ^c
35	2.5	0.679 \pm 0.004	2.1 \pm 0.9 ^a	2.6 \pm 0.8 ^b	6 \pm 3 ^a
	7	0.75 \pm 0.02	2.4 \pm 0.6 ^a	3.16 \pm 1.02 ^b	10 \pm 3 ^c
55	2.5	0.48 \pm 0.05	2.4 \pm 0.9 ^a	4.9 \pm 1.2 ^c	7 \pm 3 ^{a,b}
	7	0.496 \pm 0.009	2.5 \pm 0.8 ^a	4.6 \pm 1.2 ^c	8 \pm 2 ^b

Valores con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

En el caso concreto de la fuerza máxima, no se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos. Por otra parte, mientras que la distancia recorrida por el émbolo hasta romper la muestra se vio afectada

por el tratamiento empleado, aumentando conforme aumentaba el contenido en sólidos solubles de la fase líquida externa (muestras más deshidratadas y consecuentemente más gomosas), el área o energía empleada en romper la muestra se vio afectada únicamente por el espesor.

PROPIEDADES ÓPTICAS

Tal y como se ha comentado en el apartado correspondiente de materiales y métodos, se midieron las propiedades ópticas de las muestras impregnadas y deshidratadas osmóticamente. En la TABLA 8 se muestran las coordenadas de color en el espacio CIE $L^*a^*b^*$, así como las coordenadas psicrométricas croma (C^*_{ab}) y tono (h^*_{ab}).

TABLA 8. Efecto del contenido en sólidos solubles ($^{\circ}Bx$) y el espesor de las muestras sobre las propiedades ópticas de las mismas. Valores expresados como media \pm desviación estándar.

$^{\circ}Bx$	Espesor (mm)	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h^*_{ab}
IV	2.5	55 ± 2^b	-1.0 ± 0.3^b	14.0 ± 1.3^a	14.0 ± 1.3^a	94.20 ± 1.15^b
	7	$34,4 \pm 1.4^a$	-0.7 ± 0.5^b	8.92 ± 1.13^a	8.96 ± 1.12^a	95 ± 3^b
35	2.5	34 ± 4^a	-0.8 ± 0.7^b	12 ± 5^a	12 ± 5^a	93.2 ± 1.8^b
	7	30 ± 9^a	-1.5 ± 0.8^b	12 ± 7^a	12 ± 7^a	99 ± 4^b
55	2.5	40 ± 10^a	-0.4 ± 0.6^b	18 ± 3^b	18 ± 3^b	91 ± 2^b
	7	36 ± 6^a	-0.3 ± 0.7^a	13 ± 3^a	13 ± 3^a	89 ± 3^a

Valores con diferentes superíndices en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Observando los valores de la tabla, puede afirmarse que las muestras impregnadas y las muestras deshidratadas osmóticamente presentan valores similares de las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, así como de las coordenadas psicrométricas croma (C^*_{ab}) y tono (h^*_{ab}).

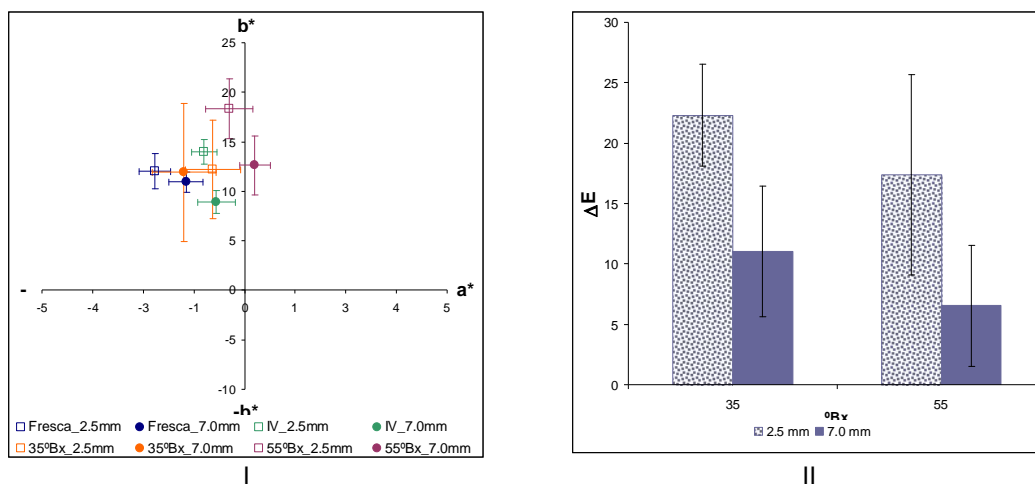


FIGURA 7 (I). Distribución de las coordenadas a^* y b^* de las muestras frescas, impregnadas y deshidratadas.

FIGURA 7(II). Las diferencias globales de color de las muestras deshidratadas respecto a las muestras impregnadas.

Después de realizar el análisis estadístico, se determinó, con un nivel de confianza del 95%, que el contenido en sólidos solubles de la fase líquida y el espesor de las muestras afecta de forma significativa a las coordenadas de color. Pero tal y como puede observarse en la TABLA 8 y en la FIGURA 7(I), estas diferencias son mínimas y no es posible establecer ninguna tendencia para los valores obtenidos.

En la FIGURA 7(II) se representan las diferencias globales de color evaluadas con respecto a las muestras impregnadas. Como se puede comprobar, las diferencias globales de color observadas se deben únicamente al espesor de muestra y no a la concentración de la fase líquida, presentándose las mayores diferencias de color para las muestras de menor espesor (2.5 mm), lo que es lógico puesto que a espesores más pequeños las variaciones de color son más notables.

CONCLUSIONES

Los dos métodos de deshidratación empleados en este trabajo son válidos para estabilizar las muestras de manzana impregnadas con zumo de mandarina inoculado con *L. salivarius spp. salivarius* y no afectan negativamente a las propiedades ópticas y mecánicas estudiadas. Si bien en ambos métodos se consiguen crecimientos microbianos suficientes para cumplir con las especificaciones de la International Dairy Federation y de este modo, ejercer un efecto beneficioso contra la infección ocasionada por la bacteria *Helicobacter pylori*, parece que en la liofilización es posible obtener crecimientos un poco más elevados.

Así pues, la elección de una operación de estabilización u otra dependerá de las características buscadas en el producto final en cada caso concreto.

REFERENCIAS

- Alzamora, S.M., Salvatori, D.M., Tapia, M.S., López-Malo, A., Welti-Chanes, J. y Fito, P., 2005. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2): 205-214.
- Anino, S.V., Salvatori, D.M. y Alzamora, S.M., 2006. Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts. *Food Research International*, 39(2): 154-164.
- AOAC Official Methods of Analysis, 2000. Fruits and fruit products. Chapter 37.
- Arilla, A., 2008. Combinación de las técnicas de impregnación a vacío y secado por aire caliente en la obtención de alimentos probióticos a partir de manzana con efecto contra la infección por *Helicobacter Pylori*. Universidad Politécnica de Valencia. (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos). Trabajo fin de carrera.
- Barrera, C., Betoret, N. y Fito, P. (2004). Ca^{2+} and Fe^{2+} influence on the osmotic dehydration kinetics of apple slices (var. Granny Smith). *Journal of Food Engineering*, 65(1): 9-14.

- Betoret, E., Arilla, A., Bennár, M., Betoret, N. y Fito, P., 2009. Combining of vacuum impregnation and hot air drying techniques to obtain a probiotic food from apple (var. *Granny Smith*) with effect against the infection caused by *Helicobacter Pylori*. *Food and Function* 2009, 14-15.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M.J., Pagán, M.J., García, M.J., Gras, M.L., Martínez-Monzó, J. y Fito, P., 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3): 273-277.
- Cruchet S., Obregon M.C., Salazar G., Diaz E., Gotteland M., 2003. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition*; 19:716-721.
- Fito P., Andrés A., Chiralt A., Pardo P., 1996. Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous foodliquid systems. *J Food Eng*; 27: 229.240.
- Fito, P., Chiralt, A., Barat, J.M., Andrés, A., Martínez-Monzó, J. y Martínez-Navarrete, N., 2001a. Vacuum impregnation for development of new dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 297-302.
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret, N., Gras M., Cháfer, M., Martínez-Monzó, J., Andrés, A. y Vidal, D., 2001b. Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering. Application in functional fresh food development. *Journal of Food Engineering*, 49(2-3), 175-183.
- Graham, D.Y. y Yamaoka, Y., 2000. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter*, 5(Suppl.1): S3-S9.
- Gras, M.L., Vidal, D., Betoret, N., Chiralt, A. y Fito, P., 2003. Calcium fortification of vegetables by vacuum impregnation. Interactions with cellular matrix. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3): 279-284.
- Hamilton-Miller, J.M., 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 360-366.
- Hunt R., Thomson A.B., 1998. Canadian *Helicobacter pylori* consensus conference. Canadian Association of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*; 12: 31-41.
- Hutchings, J., 1999. Food color and appearance. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- International Dairy Federation (IDF/ FIL), 1992. Physiological and functional properties of probiotics. *Bulletin of the International Dairy Federation*; 272: 17-22.
- Judd, D., Wyszecski, G., 1975. Colour in Business. Science and Industry. New York: John Wiley and Sons, INC.
- Prothon F., Ahrné L., Funebo T., Kidman S., Langton M., Sjöholm I., 2001. Effects of combined osmotic and microwave dehydration of apple on texture, microstructure and rehydration characteristics. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 34, 95-101.
- Talens, P., Martínez-Navarrete, N., Fito, P., Chiralt, A., 2002. Changes in optical and mechanical properties during osmohydrofreezing of kiwifruit. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3: 191-199.
- UNE 40-080, 1984. Determinación de las magnitudes cromáticas CIE. Norma Española. Madrid: Instituto Español de Normalización (IRANOR).