



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DISEÑO DE BEBIDAS SIMBIÓTICAS VEGETALES EN POLVO

MÁSTER GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Esperanza Correia Calpe

Directoras: Dra. M^a Jesús Pagán Moreno

Dra. Purificación García Segovia

Director experimental: Carlos Alberto de Jesús de Barros

Grupo CUINA. Dto. Tecnología de Alimentos. UPV.

Septiembre 2013.

DISEÑO DE BEBIDAS SIMBIÓTICAS VEGETALES EN POLVO.

Correia-Calpe, Esperanza; De Jesús, Carlos; García Segovia, Purificación; Pagán Moreno, M^a Jesús.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue obtener bebidas simbióticas en polvo a base de productos vegetales (chufa, soja, quínoa, melón, papaya y remolacha) con prebiótico (inulina o maltodextrina) y probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). Para la obtención del producto en polvo se utilizaron dos técnicas: el secado por aspersión y la liofilización, siendo esta última la técnica de elección. En el caso de los licuados vegetales, los productos con mayor carga probiótica (superior a 10^8 ufc/ mL) fueron los elaborados con soja y quínoa mediante la incorporación de maltodextrina al 20%. Los productos de elección a base de pulpas vegetales, por su contenido probiótico (superior a 10^7 - 10^8 ufc/ mL) fueron los obtenidos a partir de papaya con un 20% de inulina, melón con 10% de inulina y remolacha con 10% de maltodextrina. Tras la evaluación sensorial, la bebida con mejor aceptabilidad global es la elaborada con melón y un 10% de inulina con una adición del 5% de azúcar.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus acidophilus*, soja, chufa, quínoa, melón, papaya, remolacha, inulina, maltodextrina.

RESUM

L'objectiu del treball va ser obtenir begudes simbiòtiques en pols a base de productes vegetals (xufa, soja, quinoa, meló, papaia i remolatxa) amb prebiòtic (inulina o maltodextrina) i probiòtic (*Lactobacillus acidophilus*). Per a l'obtenció del producte en pols es van utilitzar dues tècniques: l'assecatge per aspersió i la liofilització, sent aquesta última la tècnica d'elecció. En el cas dels líquats vegetals els productes amb més càrrega probiòtica (superior a 10^8 ufc/mL) van ser els elaborats amb soja i quinoa mitjançant la incorporació de maltodextrina al 20%. Els productes d'elecció a base de polpes vegetals, pel seu contingut probiòtic (superior a 10^7 - 10^8 ufc/mL) van ser els obtinguts a partir de papaia amb un 20% de inulina, meló amb 10% de inulina i remolatxa amb 10% de maltodextrina. Després de l'avaluació sensorial, la beguda amb millor acceptabilitat global és l'elaborada amb meló i un 10% de inulina amb una addició del 5% de sucre.

PARAULES CLAU: *Lactobacillus acidophilus*, soja, xufa, quínoa, meló, papaia, remolatxa, inulina, maltodextrina.

ABSTRACT

The objective was to obtain powdered symbiotic drinks based of vegetable products (tigernut, soybean, quinoa, melon, papaya and beets) with prebiotic (inulin or maltodextrin) and probiotic (*Lactobacillus acidophilus*). To prepare the powdered product two drying techniques were used: spray and freeze-drying, the latter being the preferred technique. In the case of liquefied vegetable products the one with more probiotic load (above 10^8 cfu/mL) were made from soy and quinoa by incorporating 20% maltodextrin. Selected

vegetable pulps based products, by their probiotic content (greater than 10^7 - 10^8 cfu/mL) were obtained from papaya with 20% inulin, melon with 10% inulin and 10% beet maltodextrin. After sensory evaluation, the overall acceptability drink is best made with melon and 10% inulin with an addition of 5% of sugar.

KEYWORDS: *Lactobacillus acidophilus*, soy, tigernut, quinoa, melon, papaya, beet root, inulin, maltodextrin.

INTRODUCCIÓN

Cada vez es mayor la concienciación social de la relación directa entre alimentación, hábitos y salud: el exceso de azúcares refinados y grasas animales deriva en enfermedades como obesidad, diabetes, cáncer, o incremento del riesgo cardiovascular, entre otras. Esto ha llevado a que la demanda de los consumidores haya cambiado considerablemente en las últimas décadas, por lo que las industrias alimentarias se han decantado por una innovación mayor en alimentos funcionales (Betoret et al., 2011), es decir, “cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado, que pueda proporcionar un beneficio a la salud superior al de los nutrientes tradicionales que contiene” (Thomas & Earl, 1994). En la actualidad tienen gran importancia los alimentos funcionales con propiedades prebióticas y probióticas, debido a los importantes beneficios para el consumidor. Este tipo de alimentos se emplea con la finalidad de reducir el riesgo de padecer enfermedades concretas (Jones, 2002).

Los prebióticos se definen como ingredientes alimentarios no digeribles que benefician al hospedador estimulando el crecimiento o la actividad de una o varias bacterias del colon mejorando la salud (Gibson & Roberfroid, 1995; Özer et al., 2005; Kolida & Gibson, 2007). Así, la proliferación de determinadas bacterias, promovida por la presencia de prebióticos, puede inhibir la colonización del intestino por microorganismos patógenos. La fermentación de los prebióticos puede además promover algunas funciones específicas así como colaborar en el control de procesos como la proliferación de la mucosa intestinal, inflamación, carcinogénesis, absorción de minerales y eliminación de compuestos nitrogenados. Además existen más beneficios sistémicos asociados al metabolismo lipídico y a la reducción de factores de riesgo cardiovascular (Moral et al., 2003). Entre los prebióticos que se emplean de modo habitual en la formulación de alimentos funcionales destacan la inulina y la maltodextrina. La inulina incluye un amplio rango de fructanos con cadenas entre 3-60 unidades, mientras que la maltodextrina está constituida por maltooligosacáridos con un grado de polimerización entre 3 y 9 unidades (Siok-Koon & Min-Tze, 2010). Algunos estudios indican la posible inhibición de enfermedades como cáncer de colon mediante la ingesta de fructanos como la inulina, puesto que son susceptibles de ser fermentados por las bacterias del colon (Reddy, 1999). Otros estudios relacionan la inulina con una inhibición del desarrollo de tumores y procesos metastásicos, además de tener efecto sinérgico en tratamientos de quimioterapia y potenciar los efectos de la radioterapia

(Taper & Roberfroid, 2005). Además, se ha visto que la administración simultánea de probióticos como *Lactobacillus acidophilus* y prebióticos como la inulina posee un efecto aditivo, pero no sinérgico, en la reducción de la incidencia de tumores malignos de colon (Femia et al., 2002). La maltodextrina es un oligosacárido de dulzor moderado, producido a partir de la hidrólisis de cualquier tipo de almidón, generalmente de maíz. Se clasifica de acuerdo con su equivalencia de dextrosa (DE) y se presenta como un polvo blanco altamente higroscópico. La maltodextrina es ampliamente utilizada en la obtención de productos en polvo para mejorar su manejo y conservación (Silva et al., 2006; Mosquera et al., 2010). También se emplea como humectante, espesante, estabilizante, para dispersar ingredientes secos y favorecer el secado en zumos (Sablani et al., 2008).

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, ingeridos en determinadas cantidades, ejercen beneficios en la salud del hospedador” (Gibson & Roberfroid, 1995a; Guarner & Schaafsma, 1998; Siok-Koon & Min-Tze, 2010; Nualkaekul & Charalampopoulos 2011). En general se suelen recomendar una concentración de 10^5 ufc/g de producto probiótico como mínimo terapéutico, y cantidades diarias en torno a 10^6 - 10^9 ufc para desarrollar efectos beneficiosos (Lee & Salminen, 1995). Los microorganismos más empleados con esta finalidad pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Entre los beneficios de los probióticos en el organismo humano destacan el incremento de la tolerancia y digestión de la lactosa, mejora de la microbiota intestinal, reducción del pH intestinal (lo que mejora su funcionamiento), reducción de los niveles de colesterol, reducción del amoníaco y otros compuestos tóxicos, producción de vitaminas del grupo B (B9), restauración de la flora intestinal tras tratamientos con antibióticos, tratamiento y prevención de diarrea aguda provocada por rotavirus y estimulación de la respuesta del sistema inmunitario (Gibson & Roberfroid, 1995a; Guarner & Schaafsma, 1998). De la combinación de prebióticos y probióticos, en un mismo alimento, se obtienen los productos simbióticos; en ellos, mejora la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos seleccionados (Gibson & Roberfroid, 1995b).

Debido a su composición, los productos vegetales son especialmente adecuados para la obtención de alimentos funcionales por su elevado contenido en fibra, vitaminas y antioxidantes (Klewicka et al., 2009). Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de bebidas funcionales a base de éstos, que pueden complementarse con ingredientes pre y probióticos (Prado et al., 2008). Desde este punto de vista, existen varias alternativas: frutas poco ácidas (melón, papaya), raíces (remolacha), semillas (soja), cereales o pseudocereales (quínoa) o tubérculos (chufa), entre otros. La composición de estos productos se muestra en la tabla 1.

TABLA 1. Composición nutricional por 100g de alimento

	Melón	Remolacha	Papaya	Soja	Chufa	Quínoa
Energía (Kcal)	26	31	38	374	369.39	350
Proteínas (g)	0.6	1.3	0.5	35.9	8.07	13
Carbohidratos	6	6.4	8.8	15.8	30.0	71
Grasa (g)	Tr	Tr	0.1	18.6	24.3	6.1
Fibra (g)	1	3.1	2.3	15.7	24.0	4
Calcio (mg)	14	23	23	240	100	104
Potasio (mg)	17	300	200	1730	486.0	1193
Fósforo (mg)	18	31	13	660	219.0	468.9
Hierro (mg)	0.4	0.8	0.5	9.7	4.12	5.2
Carotenos (µg)	21	Tr	810	12	120	0.12-0.53
Tiamina (mg)	0.04	0.03	0.03	0.61	-	0.05-0.6
Riboflavina (mg)	0.02	0.05	0.04	0.27	-	0.2-0.46
Niacina (mg)	0.5	0.3	0.4	7.7	-	0.16-1.6
Ácido ascórbico (mg)	25	10	60	Tr	7.30	0-8.5

Tr: Trazas. Fuentes: Ekeanyanwu and Ononogbu, 2010. Moreiras et al., 2009. FAO, 2011. Repo-Carrasco et al., 2003; Repo-Carrasco-Valencia, 2011.

En los últimos años la remolacha (*Beta vulgaris*) ha sido objeto de numerosos estudios, puesto que las betaínas, pigmentos responsables de su coloración, son potentes antioxidantes que han ganado interés como aditivo e ingrediente en la industria alimentaria. Además, su gran actividad antioxidante se asocia con la protección frente a diversas enfermedades, entre ellas diversos tipos de cáncer (Kapadia et al., 1996), e incluso se les atribuye la capacidad de reducir la angiogénesis y promover la apoptosis de células cancerígenas con interesantes resultados (Zhang et al., 2012).

Por otra parte, la papaya (*Carica papaya*) ha crecido en popularidad gracias a su elevado contenido en carotenoides, compuestos con actividad antioxidante y en algunos casos con actividad de provitamina A; se trata también de un fruto rico en compuestos fenólicos y enzimas con gran interés en la industria alimentaria, como la papaína, con actividad proteolítica (Rivera-Pastrana et al., 2010)

En cuanto al melón (*Cucumis melo*) destaca por su contenido en azúcares y baja acidez. Se consume como fruta fresca, pero también en ensaladas, zumos, dulces e incluso acompañamientos. Es rico en vitaminas B y C, por lo que favorece el correcto funcionamiento del sistema nervioso y, además, por su elevado contenido en potasio se le atribuyen propiedades diuréticas (FAO, 2006).

El licuado de soja (*Glycine max*), muy consumido en la actualidad, contiene una elevada proporción de proteínas de calidad, además de una composición adecuada para poder ser fermentada por bacterias acidolácticas. Es rica en isoflavonoides, compuestos vegetales similares a los estrógenos, con capacidad para regular el ciclo menstrual. Numerosos estudios asocian la duración de los ciclos menstruales con el riesgo de padecer cáncer de mama, relacionando el consumo de isoflavonas de soja con una menor incidencia de la enfermedad (Setchell & Cassidy, 1999). Por

otra parte, el licuado de soja puede actuar como prebiótico puesto que contiene sacarosa, rafinosa y estaquiosa, azúcares que fermentan la mayor parte de las bifidobacterias (Scalabrini et al., 1998) y que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud, y además es mencionado en diversos estudios como prebiótico, que incluso puede suplementarse con oligofructosa e inulina (Prado et al., 2008).

La chufa (*Cyperus esculentus*) es un tubérculo rico en azúcares (algunos de los cuales tienen actividad prebiótica) y grasas insaturadas, muy popular debido a la horchata, bebida tradicional valenciana. Su fracción grasa, alrededor del 30% de la chufa, contiene un 75% de ácido oleico y 9-10% de ácido linoleico. Los principales aminoácidos que contiene son arginina y ácido glutámico y aspártico; excepto por su contenido en histidina, los aminoácidos esenciales contenidos en la horchata son superiores que las cantidades diarias recomendadas propuestas por la FAO/OMS para los adultos (Cortés et al., 2005).

La quínoa (*Chenopodium quinoa*) es un pseudocereal ampliamente cultivado y conocido en regiones andinas, muy resistente a condiciones ambientales extremas. Los granos de quínoa son ricos en aminoácidos esenciales, como lisina y metionina, deficientes en otros cereales, lo que incrementa su interés nutricional. Además, es rica en vitaminas y minerales. Tradicionalmente se emplea para hacer harinas, sopas o cereales de desayuno, así como batidos o bebida vegetal (Bhargava et al., 2006). La FAO ha designado el presente año 2013 como año internacional de la quínoa. Ante el desafío de elevar la producción de alimentos de calidad para alimentar a la población del planeta en un contexto de cambio climático, la quínoa aparece como una alternativa para aquellos países que sufren inseguridad alimentaria (FAO, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue elaborar unas bebidas simbióticas en polvo a base de productos vegetales. A tal efecto, se optó por utilizar melón papaya, remolacha, quínoa, soja y chufa, enriquecidos con *Lactobacillus acidophilus* (probiótico) y maltodextrina o inulina (prebióticos).

MATERIALES Y MÉTODOS

Plan de Trabajo

El plan de trabajo seguido constó de tres fases (figura 1) las cuales se detallan a continuación.

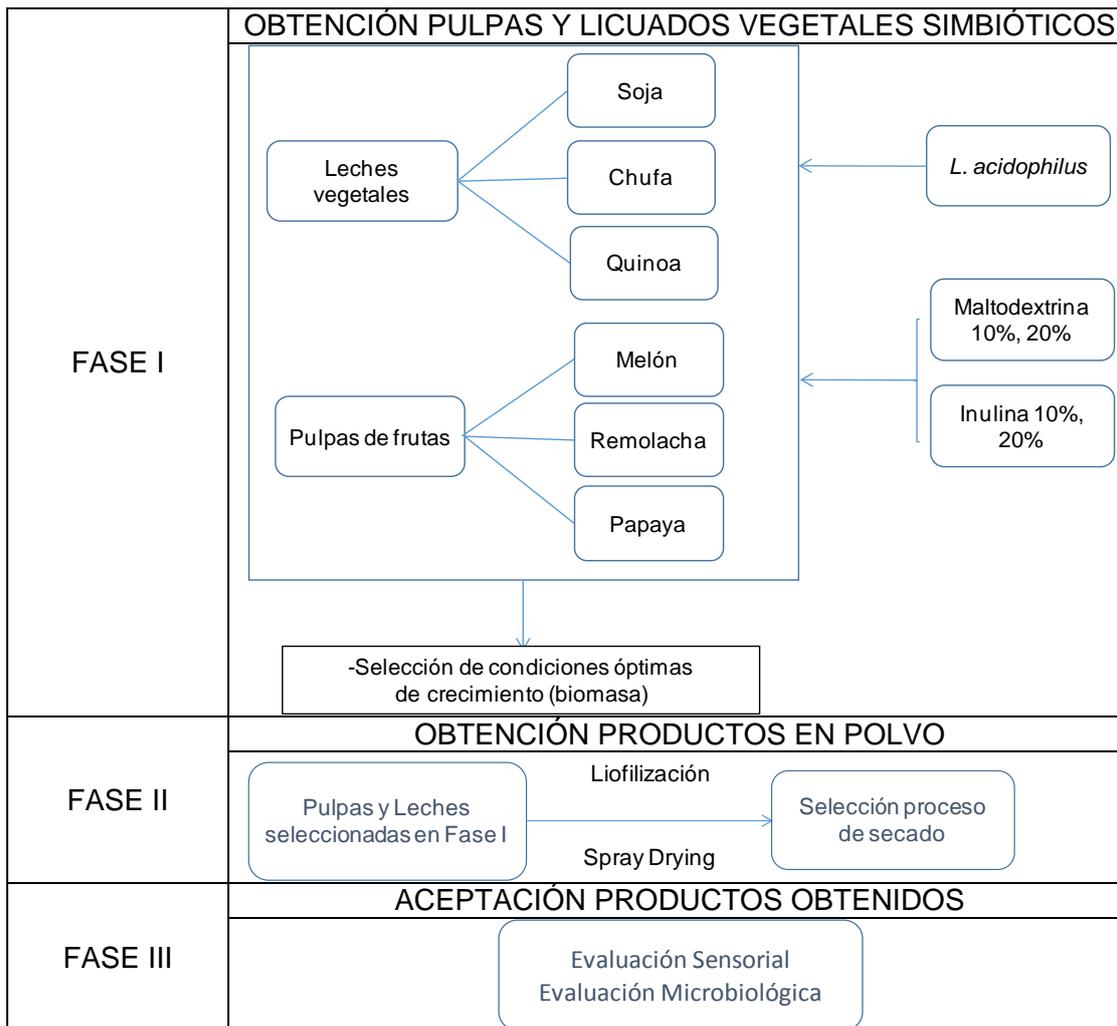


FIGURA 1: Plan de Trabajo.

Fase I. Obtención de pulpas y licuados vegetales simbióticos.

En esta primera fase del trabajo se elaboraron pulpas de frutas (melón, remolacha y papaya) y licuados vegetales (soja, chufa y quínoa). Posteriormente, los productos obtenidos, con y sin adición de prebióticos (maltodextrina e inulina) a diferentes concentraciones, se fermentaron, mediante inoculación de *L. acidophilus*. El objetivo perseguido en esta fase fue determinar las condiciones óptimas de crecimiento en los diferentes medios testados para lograr una máxima biomasa. La nomenclatura empleada a lo largo del presente trabajo es la que se muestra en la tabla 2.

Fase II. Obtención de productos en polvo.

Una vez seleccionados los productos vegetales fermentados en los que se alcanzaba una máxima densidad poblacional, la obtención de los productos en polvo se efectuó utilizando las técnicas de liofilización y el secado por aspersion (spray drying). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la técnica adecuada para la obtención del producto simbiótico en polvo.

Fase III. Aceptación de los productos obtenidos.

Finalmente se caracterizaron los productos seleccionados y se evaluó su aceptación por parte de un panel de consumidores. Además, se estudió la supervivencia de los microorganismos probióticos.

TABLA 2. Codificación de los componentes y concentraciones empleados.

Componente	Código
Soja	S
Chufa	Ch
Quínoa	Q
Melón	M
Remolacha	R
Papaya	P
Concentración	Código
10%	10
20%	20
Prebiótico	Código
Maltodextrina	M
Inulina	In

MATERIALES

La cepa probiótica elegida fue *Lactobacillus acidophilus* (CECT 903) procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Los ingredientes utilizados para la formulación de los medios de crecimiento para el *L. acidophilus* fueron: soja amarilla (Sojabonen, Schiedam, Holanda), chufa (CRDO Chufa de Valencia, Alboraya, España), quínoa (Biocop, Barcelona, España), remolacha cocida y envasada al vacío, melón y papaya adquiridos en supermercado local.

Como componentes prebióticos se empleó inulina (Guinama, Valencia, España) y maltodextrina (Solegraells, Barcelona, España).

Para las determinaciones microbiológicas se empleó agua de peptonas (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) y el medio de cultivo utilizado fue agar MRS (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España). Para determinar la carga microbiana de partida se utilizó agar PCA (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España) y para comprobar la carga de mohos y levaduras agar Sabouraud Cloranfenicol (Scharlau, Chemie, S.A., Barcelona, España).

El paquete estadístico empleado para el análisis de los datos fue Statgraphics Centurion (Manugistics Corp., Rockville, EEUU).

METODOLOGÍA

Fase I. Obtención de pulpas y licuados vegetales simbióticos.

Los licuados vegetales (soja, chufa y quínoa) se obtuvieron en un equipo Sojamatic 1.3 (Barcelona, España), adicionándoles, posteriormente, los componentes prebióticos a concentraciones del 10% y 20% w/w. A continuación, las mezclas así obtenidas se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

Las pulpas se prepararon a partir de las frutas peladas triturando en un equipo Thermomix (Vorwerk & Co. KG; Wuppertal, Alemania) y añadiendo

agua hasta obtener una concentración de sólidos solubles de unos 7.5-8° Brix. Estos se sometieron a varios tratamientos térmicos diferentes, con la finalidad de seleccionar el más adecuado (121° C durante 15 minutos, 90° C durante 2 minutos, 65° C durante 30 minutos, 121° C durante 3 minutos). Los prebióticos se disolvieron en agua en concentraciones del 10% y 20%, y se esterilizaron 15 minutos a 121° C. A continuación estos se adicionaron a las pulpas. El pH inicial se mantuvo dentro del rango 4.9-6.5, siendo éste intervalo de pH adecuado para el crecimiento del *L. acidophilus* (Gupta et al., 1996; Gomes & Malcata, 1999).

Se determinó la carga inicial de cada muestra de pulpa de fruta, antes de inocular el microorganismo, mediante siembra en PCA e incubando a 30° C durante 72 h. También se comprobó la carga de mohos y levaduras con agar Sabouraud Cloranfenicol incubando a 25° C durante 3-5 días.

Una vez obtenidas las pulpas y licuados vegetales con prebióticos se inocularon con el microorganismo probiótico (*L. acidophilus*) a razón de una carga inicial, en los distintos medios de crecimiento en estudio, de 10² ufc/mL. Tras ello, se incubaron los medios durante 54 horas, tomándose muestras a los tiempos 0, 6, 24, 30, 48 y 54 horas, y se realizaron recuentos del microorganismo probiótico mediante siembra en doble capa en agar MRS. A partir de los resultados de los recuentos se obtuvieron las curvas de crecimiento de *L. acidophilus* en las pulpas y licuados vegetales utilizados en el presente estudio. Posteriormente, estas fueron modelizadas utilizando modelos cinéticos primarios (Baranyi & Roberts, 1995), considerando las ecuaciones de modelo completo, modelo sin fase lag y modelo sin fase asintótica, y las funciones lineales propuestas por Buchanan et al., (1997).

Los análisis fisicoquímicos realizados fueron:

- a) Sólidos solubles totales (°Brix): se determinaron con un refractómetro digital con control de la temperatura Peltier, modelo RFM 330 (Bellingham & Stanley Limited, Kent, U.K.)
- b) Contenido en humedad: se determinó mediante secado a 70° C en estufa de vacío (Vaciotem, Selecta Vacuum Oven, Barcelona, España).
- c) pH: se determinó con un pHmetro modelo Consort c-830, (Turnhout, Belgium).

Fase II. Obtención de productos en polvo.

Una vez establecidos los parámetros del proceso de fermentación (tipo y concentración de prebiótico y tiempo de incubación) para lograr una máxima densidad poblacional, se elaboraron aquellas pulpas y licuados vegetales con mayor capacidad probiótica. Estas fueron posteriormente sometidas a dos procesos de pulverización (spray drying y liofilización) con la finalidad de determinar la tecnología más adecuada. Para el secado en spray se empleó un equipo Buchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza), con una temperatura de entrada de 110-120° C, temperatura de salida 70-79° C, potencia de bomba del 30-40% y ciclo de limpieza o noozle 5-6. El proceso de liofilización se llevó a cabo en un equipo Telstar Lioalfa-6.

(Telstar, Barcelona, España), las condiciones en las que se llevó a cabo fueron 0.051 ± 0.013 mBar de presión y una temperatura de $-55.1 \pm 2.45^\circ$ C.

Fase III. Aceptación de los productos obtenidos.

a) Análisis Sensorial

Se realizaron dos evaluaciones sensoriales independientes: la primera para evaluar la aceptación de las bebidas a base de soja y quínoa, y la segunda para las bebidas de frutas.

Para la evaluación de los atributos, se utilizó una escala hedónica de 9 puntos (UNE EN-ISO 4121:2006) bipolar, que iban desde “1: totalmente rechazable” a “9: totalmente aceptable”, con un punto central neutro.

Se pidió a los catadores que hiciesen una primera evaluación por el aspecto visual y olfativo sin probar la muestra, y valorasen carácter apetecible, aroma, color y aspecto general. Tras esta primera valoración se probaba la muestra evaluándose sabor, textura, dulzor y aceptabilidad global.

El análisis sensorial se llevó a cabo en una sala de catas estandarizada con catadores no entrenados, pertenecientes al panel de catadores de la UPV. La entrega de muestras se realizó de forma monádica y aleatoria. Para el análisis estadístico se empleó la Comparación entre muestras independientes.

Para formular las bebidas se ajustó la composición según la capacidad probiótica del polvo y los °Brix de las bebidas vegetales comerciales, considerando, en un test organoléptico previo, que a la bebida de soja se debería añadir un 10% de azúcar y a la de quínoa un 7.5% de azúcar. Por tanto, para un volumen de 500 mL de agua, en el caso de la soja se añadieron 42 gramos de polvo simbiótico y 50 gramos de azúcar, mientras que en el caso de la quínoa a 500 mL de agua se adicionaron 42 gramos de polvo simbiótico y 37.5 gramos de azúcar. En el caso de las pulpas de frutas, se consideró que la concentración de azúcar más adecuada era del 5%, por tanto para la formulación de cada una de las bebidas a 500 mL de agua se añadieron 42 gramos de polvo simbiótico y 25 gramos de azúcar.

b) Estabilidad del componente probiótico

Para evaluar la estabilidad de los productos en polvo, se estudió la viabilidad del componente probiótico (ufc/mL) mediante recuento en placa en agar MRS. El estudio se realizó sobre muestras de polvo liofilizado conservadas a -18° C durante 5 y 15 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Obtención de licuados vegetales y pulpas probióticas.

Las características fisicoquímicas de partida de los licuados con y sin prebióticos, fueron las que se observan en la tabla 3.

TABLA 3. °Brix y pH de los licuados vegetales. Media ± DS.

Medio	°Brix	pH _{inicial}
S	4,07±0,06	6,51±0,03
S10In	10,07±0,38	5,53±0,01
S20In	19,03±0,15	5,98±0,04
S10M	10,50±0,70	5,53±0,01
S20M	19,93±0,06	6,07±0,03
Ch	4,77±0,06	6,25±0,07
Ch10In	13,73±0,57	5,59±0,01
Ch20In	19,57±0,21	5,59±0,01
Ch10M	15,13±0,12	5,61±0,01
Ch20M	22,5±0,15	5,61±0,01
Q	4,77±0,59	4,89±0,13
Q10In	9,73±0,90	5,45±0,03
Q20In	16,43±0,06	5,94±0,01
Q10M	9,30±0,10	5,66±0,09
Q20M	15,94±0,38	6,08±0,01

(Clave: S: soja; Q: quínoa; Ch: chufa; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

Los resultados indicaron diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto en los valores de pH como en los °Brix (tabla 3). En lo referente al pH, la leche de quínoa fue la que presentó valores más bajos, mientras que para los licuados de chufa y soja éstos fueron superiores. La adición de prebióticos modificó el pH de las licuados en estudio, incrementándolo (quínoa) o reduciéndolo (soja y chufa). En el caso de la leche de chufa, independientemente del tipo o cantidad de prebiótico adicionado los valores de pH se situaron en torno a 5.6. Para las licuados de soja y quínoa, la adición de 10% de prebiótico (inulina o maltodextrina) situó el pH en valores de 5.5-5.6, y con 20% este fue del orden de 5.9-6.1, dentro del rango de crecimiento óptimo para el *L. acidophilus* señalado por Hernández et Dubón (1992). Respecto a los °Brix, no se detectaron diferencias significativas entre las licuados vegetales ($p > 0.05$), pero la adición de prebiótico conllevó, como era de esperar, un incremento de estos. No obstante, el comportamiento difirió en función del tipo de licuado. Así, los mayores valores de °Brix se observaron en bebida de chufa y los menores en quínoa.

En la figura 2 se muestra el comportamiento de *L. acidophilus* en las distintas licuados vegetales en estudio, con y sin prebiótico. Los resultados obtenidos indican que el *L. acidophilus* creció siguiendo una curva sigmoideal en S20M, S20In, S10In y Q20In, y siguiendo una curva característica del crecimiento microbiano sin llegar a la fase estacionaria en Q20M, S, Ch20M, S10M y Ch20In. Por el contrario, cuando los medios empleados fueron Q, Q10M, Q10In, Ch, Ch10M y Ch10In no se observó desarrollo. Por tanto, en base a los resultados obtenidos cabe destacar que en el caso de las licuados vegetales de chufa y quínoa el *L. acidophilus* sólo creció cuando estas llevaban adicionado un 20% de prebiótico, inulina o maltodextrina. Mientras que en el caso de la leche de soja sí que se produjo crecimiento del microorganismo probiótico con o sin adición de prebiótico, aunque este varió en función del tipo y proporción de este último.

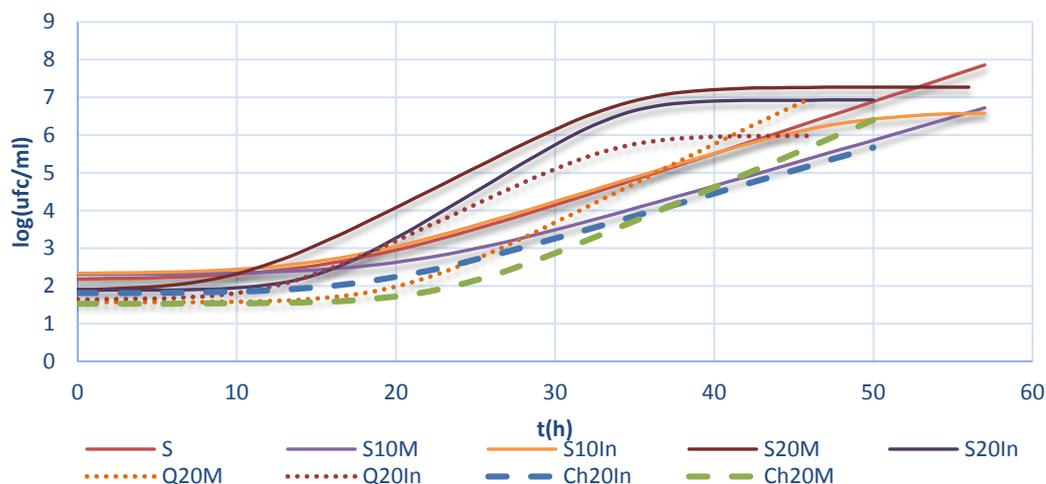


FIGURA 2. Crecimiento de *L. acidophilus* en licuados vegetales con y sin prebióticos.

A partir de los resultados anteriores y con la finalidad de poder analizar más exhaustivamente el comportamiento de *L. acidophilus* en aquellos medios en los que se observó desarrollo, se modelizaron las curvas anteriores y se obtuvieron los parámetros de crecimiento que se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. Parámetros de crecimiento del modelo de Baranyi y Roberts para *L. acidophilus* en licuados vegetales esterilizados con diferente concentración de prebiótico. Media \pm DS.

Medio	LAG (h)	Velocidad (ufc/mLh)	MDP (log ufc/mL)	SE	R ²
S	15,79 \pm 0,61	0,15 \pm 0,00	(**)	0,0940	0,9967
S10M	6,84 \pm 2,38	0,11 \pm 0,01	(**)	0,2223	0,9835
S20M	10,02 \pm 1,97	0,22 \pm 0,02	7,27 \pm 0,06	0,1516	0,9957
S10In	15,79 \pm 2,64	0,13 \pm 0,02	6,61 \pm 0,17	0,2600	0,9804
S20In	14,85 \pm 0,92	0,26 \pm 0,03	6,93 \pm 0,07	0,1775	0,9932
Ch20M	22,80 \pm 2,32	0,18 \pm 0,02	(**)	0,2448	0,9872
Ch20In	18,23 \pm 1,82	0,12 \pm 0,01	(**)	0,2244	0,9795
Q20M	20,07 \pm 1,73	0,21 \pm 0,02	8,52 \pm 5,97	0,2852	0,9839
Q20In	12,31 \pm 0,65	0,20 \pm 0,01	5,98 \pm 0,04	0,0847	0,9977

(*) Modelización sin fase Lag. (**) No se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento microbiano, MDP no determinada. (Clave: S: soja; Ch: chufa; Q: quínoa; M: maltodextrina; In: inulina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

En el caso de la bebida de soja, sin adición de prebiótico no se alcanzó la fase estacionaria tras 54h y la densidad poblacional resultó cercana a 10⁸ ufc/mL, la más elevada de las concentraciones obtenidas. La adición de 20% de prebiótico conllevó un incremento notable de la velocidad de crecimiento, más evidente cuando se utilizó inulina, y la estabilización de la MDP en valores en torno a 10⁷ ufc/mL. Además, en el caso de la utilización de maltodextrina la MDP fue algo superior y se observó una reducción de la fase de latencia. Cuando se utilizaron concentraciones de 10% de prebiótico, el comportamiento difirió en función del compuesto adicionado. Con 10% de maltodextrina no se alcanzó la fase estacionaria tras 54 h, y la MDP fue

inferior a 10^7 ufc/mL; con 10% de inulina la velocidad de crecimiento fue similar a la obtenida para la bebida de soja sin prebiótico y se alcanzó la fase estacionaria tras 40 h, con una MDP también inferior a 10^7 ufc/mL.

En el caso de la bebida de chufa, el microorganismo únicamente creció con adición de 20% de prebiótico sin alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, siendo mayor la densidad poblacional a las 50 horas cuando se empleó maltodextrina. Con el 20% de inulina los resultados fueron similares, aunque con menor tasa de crecimiento. La MDP alcanzada fue del orden de 10^6 ufc/mL.

En el caso del licuado de quínoa, al igual que para el de chufa, el *L. acidophilus* sólo se desarrolló con la adición de prebiótico al 20%, más rápidamente, como viene a reflejar la menor fase lag, cuando se utilizó inulina. Pero cabe destacar que la adición de maltodextrina, aunque inicialmente supuso un enlentecimiento del crecimiento, debido a la adaptación del microorganismo al medio, conllevó una mayor MDP, y esto sin alcanzar la fase estacionaria al cabo de 50 horas.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que la adición de prebiótico en una concentración del 20% aceleró el crecimiento de *L. acidophilus*, en el caso de la bebida de soja, y permitió que este microorganismo se desarrollase en licuados de quínoa y chufa. El efecto del prebiótico utilizado sobre el crecimiento de *L. acidophilus* dependió del tipo de licuado vegetal. En licuado de soja el uso de maltodextrina supuso un desarrollo más rápido del microorganismo y una MDP algo superior. En el caso de la bebida de chufa no se observaron grandes diferencias al utilizarse un prebiótico u otro. Para la bebida de quínoa la incorporación de inulina supuso un desarrollo mucho más rápido de la cepa probiótica que cuando se empleó maltodextrina, no obstante, la MDP se logró con la adición de esta última. Así, los medios en que se obtuvieron mejores valores para MDP fueron S20M y Q20M, superiores a 10^7 ufc/mL, por lo que fueron seleccionados para la obtención del producto en polvo. La chufa se rechazó debido a los bajos valores de velocidad de crecimiento y MDP (alrededor de 10^6 ufc/mL) alcanzados en todos los casos estudiados.

En el caso de los licuados vegetales el tratamiento de esterilización a 121° C durante 15 minutos no implicó modificaciones de las características organolépticas que conllevasen rechazo del producto por parte de los consumidores. Por lo tanto, este fue el tratamiento seleccionado.

Para las pulpas vegetales con y sin prebiótico la caracterización fisicoquímica ($^{\circ}$ Brix y pH) previa al tratamiento térmico se muestra en la tabla 5.

Respecto al pH, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto al tipo y porcentaje de prebiótico empleado, pero sí en función del tipo de pulpa ($p < 0.05$). Los valores más bajos se observaron para la papaya con 20% de prebiótico, casos en los que el pH se mantuvo entre 4.6-4.7, mientras que para el melón y la remolacha el pH se situó en 5.4-5.7, valores adecuados para el crecimiento de la cepa probiótica (Gupta et al., 1996). Respecto a los $^{\circ}$ Brix, no se detectaron diferencias significativas entre los prebióticos adicionados, sin embargo el tipo de pulpa sí que tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Por tanto, al igual que en los casos

de las licuados vegetales, la adición de prebiótico conllevó un esperado incremento de °Brix, sin embargo, el comportamiento varió según la pulpa. Así, los menores valores de °Brix se observaron en pulpa de melón, mientras que para la remolacha y la papaya éstos fueron mayores.

TABLA 5. °Brix y pH de las pulpas. Media \pm DS.

Medio	°Brix	pH _{inicial}
M	6,80 \pm 0,17	5,51 \pm 0,03
M10In	12,40 \pm 0,44	5,70 \pm 0,21
M20In	17,77 \pm 0,06	5,64 \pm 0,24
M10M	12,70 \pm 0,00	5,65 \pm 0,23
M20M	17,40 \pm 0,00	5,54 \pm 0,35
R	7,93 \pm 0,85	5,46 \pm 0,28
R10In	13,07 \pm 1,56	5,44 \pm 0,15
R20In	20,77 \pm 0,76	5,40 \pm 0,21
R10M	14,23 \pm 0,06	5,40 \pm 0,21
R20M	21,17 \pm 0,06	5,39 \pm 0,20
P	10,13 \pm 2,54	4,75 \pm 0,21
P10In	13,50 \pm 0,00	5,09 \pm 0,21
P20In	19,03 \pm 0,06	4,73 \pm 0,24
P10M	13,43 \pm 0,29	5,02 \pm 0,08
P20M	17,80 \pm 1,39	4,64 \pm 0,45

(Clave: M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

Las curvas de crecimiento del microorganismo probiótico en las pulpas esterilizadas (121° C, 15 min), con y sin prebiótico, se muestran en la figura 3. En todos los casos estudiados, el *L. acidophilus* siguió un crecimiento sigmoideal, con excepción de la papaya, sin adición de prebióticos, donde este no se desarrolló.

Para un mejor análisis de los resultados obtenidos se modelizaron las curvas de crecimiento anteriores y se obtuvieron los parámetros de crecimiento, mostrados en la tabla 6.

Como se observa, el mayor crecimiento se dio en el melón con adición de prebiótico, alcanzando en todos los casos una concentración en torno a 10⁸ ufc/mL, respecto a los 10⁷ ufc/mL del melón solo. La adición de inulina permitió obtener valores ligeramente mayores de MDP, sin embargo la fase de adaptación del microorganismo fue mayor que en el caso de adición de inulina.

En el caso de la remolacha, la adición de prebiótico incrementó notablemente la fase lag, pero los valores de MDP aumentaron ligeramente respecto a la remolacha sola, excepto en el caso de R20In, donde dicho valor fue algo inferior. La adición de maltodextrina permitió alcanzar la fase estacionaria más rápidamente que la inulina y mayor velocidad de crecimiento; los valores más elevados de MDP y velocidad de crecimiento se obtuvieron con 20% de maltodextrina, mientras que la adición de inulina no produjo mejoras en el crecimiento respecto a la remolacha sola.

En el caso de la papaya la adición de prebiótico permitió el desarrollo de la cepa probiótica. Con la adición de maltodextrina se observó una menor fase lag lo que indica una adaptación más rápida del microorganismo al

medio. Sin embargo, la velocidad de crecimiento apenas se vio influida por la concentración y el tipo de prebiótico. Los valores de MDP en todos los casos fueron superiores a 10^7 ufc/mL.

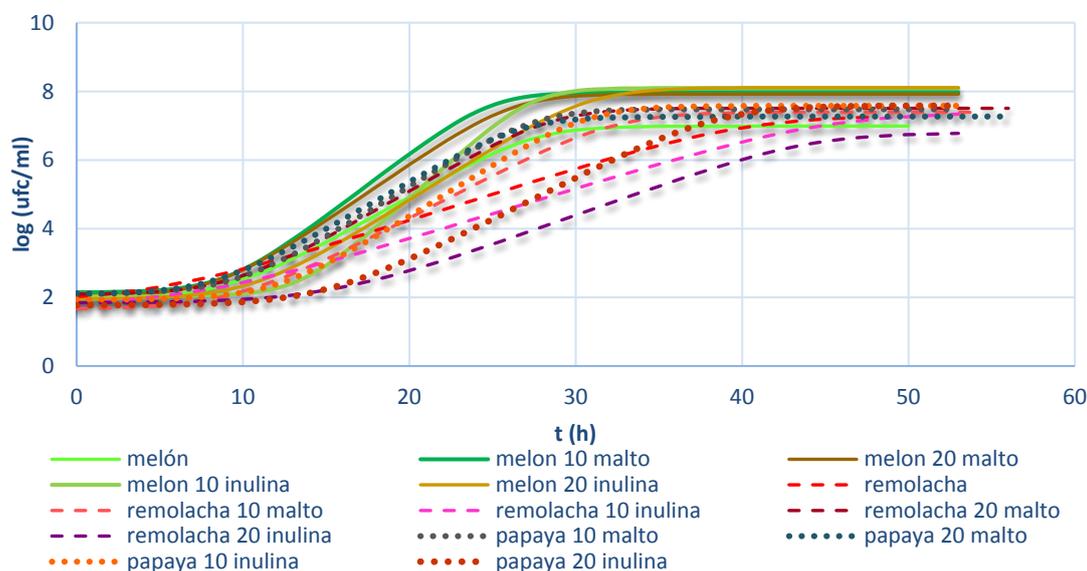


FIGURA 3. Crecimiento de *L. acidophilus* en frutas esterilizadas con y sin prebióticos.

TABLA 6. Parámetros de crecimiento del modelo de Baranyi y Roberts para *L. acidophilus* en pulpas esterilizadas (121° C, 15 min) con diferente concentración de prebiótico.

Medio	LAG (h)	Velocidad (ufc/mLh)	MDP (log ufc/mL)	SE	R ²
M	9,09 ±3,05	0,28 ±0,05	6,99 ±0,15	0,2962	0,9864
M10M	8,99±0,71	0,37±0,02	7,40± 0,02	0,0465	0,9997
M20M	8,47 ±1,17	0,33 ±0,02	7,92 ±0,04	0,0966	0,9987
M10In	13,44 ±1,03	0,44 ±0,04	8,1 ±0,02	0,0597	0,9995
M20In	10,67 ±0,73	0,31 ±0,01	8,11 ±0,02	0,0588	0,9995
R	5,53±1,04	0,15±0,01	7,31±0,08	0,1046	0,9969
R10M	9,57±1,29	0,25±0,02	7,40±0,04	0,1090	0,9981
R20M	9,26±1,29	0,28±0,02	7,51±0,04	0,0906	0,9986
R10In	7,41±1,36	0,15±0,01	7,40±0,07	0,0838	0,9987
R20In	15,36±1,44	0,17±0,02	6,80±0,01	0,1164	0,9971
P10M	9,53± 1,40	0,30± 0,03	7,48± 0,03	0,0823	0,9988
P20M	8,30± 1,26	0,28± 0,02	7,26± 0,04	0,0997	0,9983
P10In	11,99± 1,08	0,30± 0,02	7,58± 0,04	0,0914	0,9986
P20In	14,86± 0,96	0,25± 0,02	7,59± 0,04	0,0924	0,9987

(Clave: M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

De este modo, las mezclas en las que se obtuvieron mejores resultados con este tratamiento térmico fueron P20In, M20In o M10In y R20M.

El principal inconveniente que se observó con las pulpas anteriormente mencionadas (sometidas a un proceso de esterilización a 121° C durante 15 minutos) fue una alteración muy evidente de las características organolépticas (color, olor, sabor). Aunque esta fue inicialmente ligera, a lo

largo del proceso de fermentación fue empeorando, por lo que el producto final fue rechazado por los consumidores. Estos cambios, suelen estar asociados a alteraciones nutricionales (pérdida de vitaminas o inactivación de antioxidantes termolábiles como la betaína) (Patkai & Barta, 1996). Considerando que la carga inicial de las pulpas previamente al tratamiento térmico era elevada (presencia de aerobios mesófilos $6 \cdot 10^2$ ufc/mL para el melón, $8 \cdot 10^1$ ufc/mL para la papaya, $7.3 \cdot 10^2$ ufc/mL para la remolacha, además de mohos y levaduras) se procedió a aplicar dos tratamientos térmicos alternativos ($90^\circ\text{C} - 2$ minutos y $65^\circ\text{C} - 30$ minutos) con la finalidad de reducir dicha carga. Las características de los tratamientos aplicados a las pulpas vegetales y los recuentos microbianos obtenidos tras su aplicación se muestran en la tabla 7.

TABLA 7. Tratamientos térmicos aplicados a pulpas y cargas microbianas posteriores a dichos tratamientos.

Ufc/mL	90°C, 2 minutos		65°C, 30 minutos	
	ML	AM	ML	AM
R	$>10^2$	$>10^3$	Ausencia	Ausencia
M	$2 \cdot 10^2$	$5,21 \cdot 10^2$	Ausencia	Ausencia
P	nd	nd	Ausencia	Ausencia

(Clave: ML: Mohos y Levaduras; AM: Aerobios mesófilos; nd: no determinado. R: remolacha; M: melón; P: papaya).

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento a 90°C durante 2 minutos resultó insuficiente y no eliminó la presencia de mohos, levaduras y aerobios mesófilos de las pulpas. Por tanto, se aplicó el tratamiento térmico a 65°C durante 30 minutos.

Puesto que los resultados anteriores (esterilización a 121°C durante 15 minutos) indicaron que las pulpas sin prebiótico presentaban, generalmente, un menor desarrollo de la cepa probiótica se optó por proseguir el estudio con la adición de prebióticos.

Las curvas de crecimiento de *L. acidophilus* en frutas con tratamiento térmico de 65°C durante 30 minutos se muestran en la figura 4. En estos casos las curvas pudieron ajustarse tanto a modelos lineales como al modelo completo de Baranyi y Roberts. Así, para los medios compuestos por R10M y R10In éste último fue el modelo con mejor ajuste. Para el resto de casos estudiados se dio un ajuste sin fase lag, lo que indica una mejor adaptación del microorganismo al medio que en el caso de las pulpas esterilizadas, puesto que en estas se observó fase de latencia.

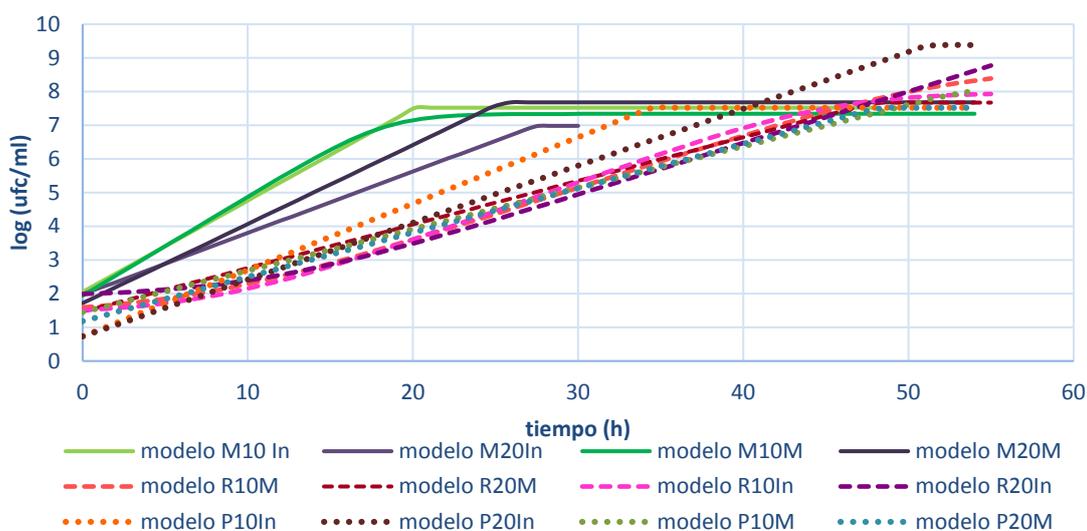


FIGURA. 4. curvas de crecimiento de *L. acidophilus* en pulpas de fruta con prebiótico con tratamiento térmico 65° C 30 minutos.

Los parámetros obtenidos a partir de las curvas modelizadas se observan en la tabla 8.

TABLA 8. Parámetros de crecimiento para *L. acidophilus* en frutas pasteurizadas (65° C, 30 minutos) con diferente concentración de prebiótico. Media ± DS.

Medio	Initial Value (log ufc/mL)	Maximum Rate (ufc/mLh)	tmax (h)	Lag (h)	Final value (logUfc/mL)	SE	R ²
R10M	1,59±0,18	0,16±0,02	(***)	7,64± 4,08	8,70±0,45	0,2486	0,9946
R20M	1,47± 0,14	0,13± 0,01	48,00± 2,01	(*)		0,2608	0,9929
R10In	1,52± 0,14	0,17± 0,02	(***)	816±3,07	7,98±0,19	0,2020	0,9962
R20In	1,99± 0,23	0,15± 0,02	(**)	10,79 ±7,40		0,3456	0,9891
P10M	1,44± 0,18	0,12±0,01	53,35± 2,76	(*)		0,3425	0,9854
P20M	1,18± 0,28	0,13± 0,01	48,20± 3,90	(*)		0,5589	0,9546
P10In	0,73±0,34	0,20± 0,02	34,42± 3,44	(*)		0,6138	0,9625
P20In	0,73± 0,23	0,17± 0,01	51,19± 2,70	(*)		0,4400	0,9895
M10M	1,94±0,18	0,29±0,04	7,34± 0,09	(*)		0,2576	0,9874
M20M	1,72± 0,19	0,23± 0,01	25,38± 1,17	(*)		0,3256	0,9843
M10In	1,94± 0,18	0,29± 0,04	(*)	(*)	7,33±0,09	0,2576	0,8740
M20In	1,98± 0,07	0,18± 0,01	27,44± 0,75	(*)		0,1279	0,9968

(*) Modelización sin fase Lag; (**) Modelización según ajuste no asintótico. (***) Modelización según el modelo completo de Baranyi y Roberts. (Clave: M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

Para la remolacha se alcanzó la fase estacionaria en los casos en los que se adicionó un 10% de componente prebiótico, con valores cercanos a 10⁸-10⁹ ufc/mL, mientras que para R20In los valores de MDP fueron algo menores, en torno a 10⁷ ufc/mL, y para R20M se obtuvieron valores de MDP algo superiores a 10⁸ ufc/mL, aunque sin alcanzar la fase estacionaria tras 54 horas. En cuanto a la velocidad de crecimiento, los resultados fueron similares en todos los casos.

En el caso de la papaya, la mayor carga probiótica se obtuvo para P20In, superior a 10^9 ufc/mL, mientras que con la adición de 10% de inulina la MDP alcanzada fue inferior a 10^8 ufc/mL. Respecto a la adición de maltodextrina a la papaya, en las concentraciones estudiadas, esto afectó a la velocidad de crecimiento del microorganismo, siendo inferior en ambos casos a la obtenida con la adición de inulina, y los valores de MDP obtenidos también fueron menores.

En el caso del melón el valor más alto de MDP, en torno a 10^7 ufc/mL, se obtuvo añadiendo un 20% de maltodextrina; la adición de 10% de prebiótico, inulina o maltodextrina, condujo a un ligero aumento en la velocidad de crecimiento del microorganismo aunque las cargas probióticas alcanzadas fueron similares.

Durante el crecimiento, en la remolacha y el melón se detectó presencia de *Bacillus spp.*, de modo que en estas frutas el tratamiento térmico aplicado fue ineficaz para eliminar los microorganismos esporulados. Por ello, a dichas pulpas se aplicó un tratamiento de esterilización de 121° C durante 3 minutos (tabla 9). En el caso de la papaya el tratamiento térmico a 65° C durante 30 minutos sí resultó ser eficaz para eliminar la carga inicial de la materia prima.

TABLA 9. Tratamiento térmico esterilización suave (121° C, 3 minutos).

121°C, 3 minutos		
Ufc/mL	ML	AM
R	Ausencia	Ausencia
M	Ausencia	Ausencia
P	nd	nd

(Clave: ML: Mohos y Levaduras; AM: Aerobios mesófilos; nd: no determinado. R: remolacha; M: melón; P: papaya).

Como se observa, con dicho tratamiento se consiguió eliminar la carga inicial, manteniendo las características organolépticas de las pulpas mencionadas. Para estos casos no se desarrollaron las curvas de crecimiento, sin embargo se obtuvieron los recuentos finales con cada mezcla. Así, los mejores resultados para el desarrollo de *L. acidophilus* en pulpas se obtuvieron para las mezclas M10In, P20In y R10M, siendo éstos los medios seleccionados para continuar con la obtención del producto en polvo.

Fase II. Obtención de productos en polvo

Se seleccionaron los medios en los que se obtuvo una mayor carga probiótica tras 48 horas de incubación (tabla 10) a fin de obtener los productos en polvo y realizar la evaluación sensorial de los mismos.

TABLA 10. Muestras seleccionadas por su mayor capacidad probiótica.

Medio	Concentración prebiótico	MDP (log(ufc/mL))
Melón	10% Inulina	7,76±0,34
Papaya	20% Inulina	8,59±0,01
Remolacha	10% Maltodextrina	7,77±0,02
Soja	20% Maltodextrina	8,24±0,16
Quínoa	20% Maltodextrina	8,34±0,01

(Clave: M: melón; P: papaya; R: remolacha; S: soja; Q: quínoa; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

A partir de estas mezclas se llevó a cabo el proceso de obtención del producto en polvo.

SELECCIÓN DEL MÉTODO DE SECADO

Obtención de Polvos mediante Spray Drying

Para la obtención del componente probiótico en polvo se efectuó un estudio preliminar. En este se sometieron algunas muestras sin incorporación de prebiótico, con la finalidad de establecer los parámetros iniciales del proceso de secado en spray. El rango de temperatura de trabajo del equipo se situó entre 100°C y 220°C, pero se empleó la mínima temperatura que permitiese el secado en condiciones adecuadas. Este parámetro es el limitante del proceso de deshidratación por repercutir en la supervivencia de los microorganismos que confieren a la bebida el carácter probiótico. El resto de parámetros de operación del aparato se fueron variando para optimizar el funcionamiento del equipo. Inicialmente se testaron los tres tipos de leche y la pulpa de melón. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

TABLA 11. Parámetros de secado en spray.

	T inlet (°C)	T outlet (°C)	Potencia bomba	Ciclo limpieza (nozzle)	Aspiración	Producto obtenido (g)	Rendimiento
Ch	110	73	30-40%	5	80%	0,43	1,29%
Q	120	79	20%	5	-	0,67	3,91%
S	110	70	30%	6	-	-	-
M	110	70	30%	5	-	0,094	1,4%

(Clave: Ch: chufa; Q: quínoa; S: soja; M: melón).

Como se comprueba, los rendimientos obtenidos fueron muy bajos. Además, durante el proceso de secado los licuados de soja y chufa experimentaron gran adherencia al condensador del equipo debido a la fracción lipídica de su composición. Se buscó solucionar este inconveniente mediante la dilución de la muestra y adición de maltodextrina como soporte de secado en una proporción de 1 g maltodextrina/°Brix. Sin embargo, estas medidas no resultaron efectivas ya que los problemas de adherencia continuaron y no varió el rendimiento posterior, por lo que se rechazó el Spray Drying como método de obtención del polvo probiótico.

Obtención de Polvos mediante Liofilización.

Una vez finalizado el período de incubación, las muestras se congelaron a -80°C durante al menos 24 horas e inmediatamente después se procedió a su liofilización durante 48 horas. Las condiciones en que se llevó a cabo el proceso fueron 0.051 ± 0.013 mBar de presión y $-55.1\pm 2.4^{\circ}\text{C}$. Finalizado el proceso, se envasaron a vacío y se almacenaron en congelación a -18°C . Los resultados obtenidos para los medios seleccionados por su mayor capacidad probiótica se muestran en la tabla 12.

TABLA 12. Rendimiento obtención de polvos mediante liofilización. Media \pm DS.

Medio	% Humedad	% Rendimiento
S20M	2,24 \pm 0,16	93,70%
Q20M	2,74 \pm 2,32	93,14%
M10In	3,33 \pm 0,57	93,21%
R10M	2,45 \pm 1,08	81,03%
P20In	1,39 \pm 0,08	86,71%

(Clave: S: soja; Q: quínoa; M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

El contenido en humedad obtenido mediante liofilización está dentro del rango de los obtenidos por Wang et al. (2004) para productos similares a base de soja. Como puede comprobarse, el rendimiento obtenido mediante este método fue muy superior al del proceso de secado en spray, y además permitió minimizar las pérdidas e incrementar la recuperación de producto en polvo, motivos por los que resultó ser el método elegido. Además, la liofilización es un procedimiento ampliamente utilizado en industrias alimentarias, adecuado para facilitar el almacenamiento, transporte y mantener una alta viabilidad del contenido probiótico (Wang et al., 2004).

Fase III. Aceptación de los productos obtenidos

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Para comprobar la estabilidad de los polvos probióticos, desde el punto de vista microbiológico, se determinó la carga residual de *Lactobacillus*. A tal efecto, se tomaron muestras a los 0, 5 y 15 días de almacenamiento en congelación a -18°C . Los resultados se muestran en la figura 5.

En el caso de las pulpas, la remolacha (R20M) fue la única cuyo contenido probiótico se mantuvo estable a lo largo de los 15 días de estudio ($p>0.05$). En el resto de las muestras (P20In y M10In) se detectó una reducción significativa ($p<0.05$) de los niveles de *Lactobacillus acidophilus*. Aunque cabe destacar que para el melón la carga de probiótico se estabilizó tras 5 días de almacenamiento, siendo esta superior a 10^6 ufc/mL. Mientras que para la papaya se observó una reducción de la carga de *L. acidophilus* durante todo el periodo de estudio, alcanzándose valores de 10^6 ufc/mL a los 15 días de almacenamiento.

En lo referente a los licuados vegetales, únicamente en la bebida de soja (S20M) se mantuvieron constantes los niveles de probióticos, al no

detectarse diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) a lo largo del período de almacenamiento. En resto de las muestras testadas (Q20M) los niveles de *L. acidophilus* experimentaron un descenso significativo ($p < 0.05$) y se situaron en torno a 10^6 ufc/mL tras 15 días de almacenamiento en congelación.

Por tanto, la supervivencia de los microorganismos probióticos en los polvos simbióticos tras 15 días en congelación se situó entre el 69% (Q20M) y cercana al 100% (S20M). En todos los casos estudiados, la carga probiótica residual tras 15 días en congelación fue cercana o superior a 10^6 ufc/mL. De modo análogo a Nualkaekul et al., (2012), puede decirse que las bebidas instantáneas a base de vegetales con adición de prebióticos constituyen un soporte adecuado para la supervivencia del *L. acidophilus*.

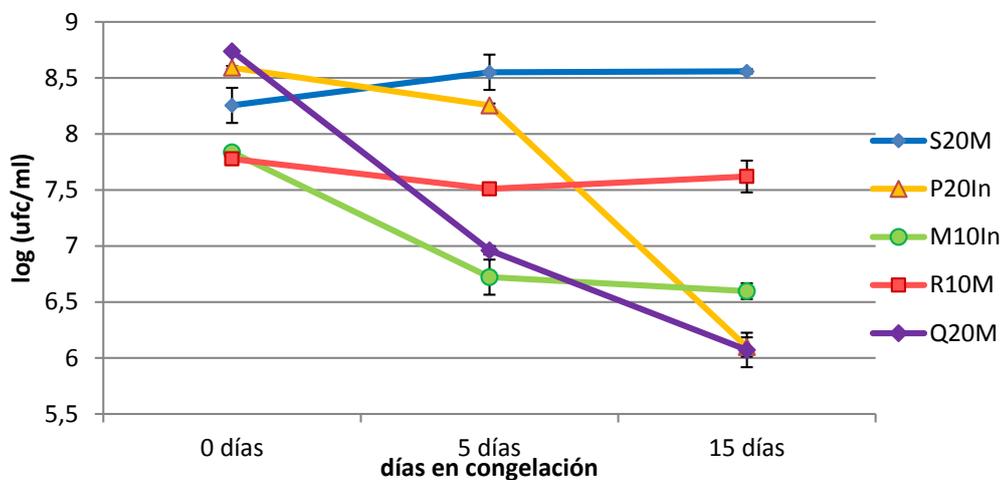


FIGURA 5. Estabilidad microbiológica de los productos liofilizados tras 5 y 15 días en congelación. (Clave: S: soja; Q: quínoa; M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

EVALUACIÓN SENSORIAL

El análisis sensorial se llevó a cabo realizando dos catas: por una parte los licuados vegetales y por otra las pulpas de frutas. En el caso de los licuados vegetales, el panel de cata estaba compuesto por 14 hombres y 36 mujeres, con una edad media de 33.5 años. Para la cata de bebidas de pulpas el panel de cata lo formaron 11 hombres y 42 mujeres con una edad media de 33.7 años. En la tabla 13 se muestran los °Brix resultantes tras la adición de las cantidades necesarias de azúcar a las bebidas reconstituidas.

TABLA 13. Porcentaje de azúcar y °Brix de las bebidas seleccionadas para su evaluación sensorial. Media ± DS.

Producto en polvo	% azúcar	°Brix
S20M	10	15,73±0,15
Q20M	7,5	13,15±0,44
M10In	5	11,87±0,06
R10M	5	13,17±0,11
P20In	5	12,43±0,06

(Clave: S: soja; Q: quínoa; M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

El carácter apetecible antes de probar las muestras se observa en la figura 6. La muestra mejor valorada antes de probar fue R10M, seguida por M10In, mientras que las peor valoradas fueron los licuados vegetales S20M y Q20M.

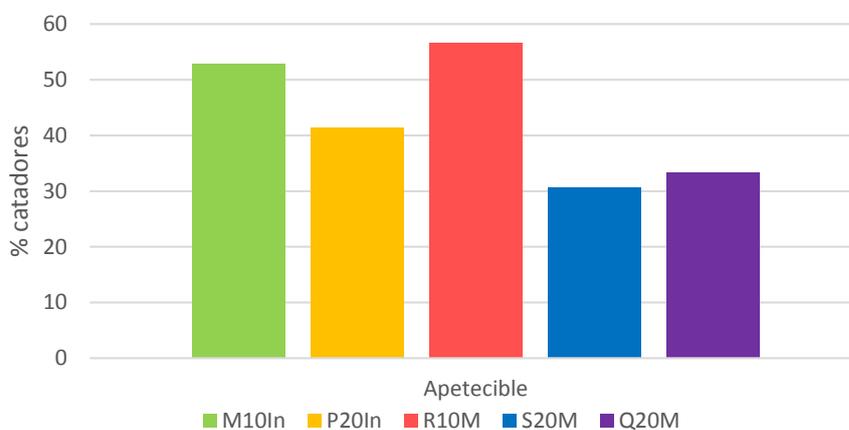


FIGURA 6: Carácter apetecible de las bebidas simbióticas según la valoración por los catadores antes de probar las muestras. (Clave: M: melón; P: papaya; R: remolacha; S: soja; Q: quínoa; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

Los atributos evaluados y los resultados obtenidos en ambas catas se muestran en la tabla 14.

En la fase visual y olfativa, en el atributo de aspecto general, la bebida que resultó mejor valorada por los catadores, fue la R10M mientras que la peor valorada fue S20M (para todos los atributos). La bebida de remolacha también fue la mejor valorada con respecto al color y la bebida de papaya la mejor valorada en el atributo aroma.

La muestra que obtuvo mayor aceptabilidad global fue M10In, siendo S20M la que obtuvo peor valoración. En el caso de las bebidas vegetales, Q20M obtuvo mayor aceptabilidad global que S20M, siendo mejor valorada en todos los atributos evaluados exceptuando la textura, para la cual S20M obtuvo mayor puntuación. En las bebidas de fruta (incluyendo la remolacha en este grupo) la mejor valorada en todos los atributos evaluados fue la M10In, mientras que la de remolacha exceptuando la textura fue la que recibió peores valoraciones.

En el caso de los licuados vegetales, Q20M obtuvo mayor aceptabilidad que S20M, siendo mejor valorada en todos los atributos evaluados exceptuando la textura, para la cual S20M obtuvo mayor puntuación. En las bebidas de fruta (incluyendo la remolacha en este grupo) la mejor valorada en todos los atributos evaluados fue la M10In, mientras que la de remolacha exceptuando la textura fue la que recibió peores valoraciones.

TABLA 14. Resultados evaluación sensorial. Media \pm DS.

	Atributo	S20M	Q20M	M10In	R10M	P20In
Antes de probar la muestra	Aroma	3,65 \pm 1,55	4,04 \pm 1,59	4,04 \pm 2,4	3,89 \pm 2,15	4,26 \pm 1,74
	Color	4,26 \pm 1,15	4,67 \pm 1,61	5,34 \pm 1,73	6,96 \pm 1,74	5,42 \pm 2,12
	Aspecto general	4,18 \pm 1,38	4,40 \pm 1,44	4,96 \pm 1,85	5,98 \pm 1,78	4,30 \pm 1,82
	Sabor	3,63 \pm 2,15	4,38 \pm 2,12	5,60 \pm 2,07	4,26 \pm 2,48	5,11 \pm 1,94
Después de probar la muestra	Textura	5,53 \pm 1,15	5,36 \pm 1,67	6,11 \pm 1,56	5,66 \pm 1,94	4,91 \pm 2,00
	Dulzor	4,92 \pm 2,14	5,38 \pm 2,07	5,83 \pm 1,98	4,92 \pm 2,29	5,43 \pm 1,93
	Aceptabilidad global	4,00 \pm 1,94	4,74 \pm 2,03	5,70 \pm 2,02	4,77 \pm 2,28	5,15 \pm 1,81

(Clave: S: soja; Q: quínoa; M: melón; R: remolacha; P: papaya; In: Inulina; M: maltodextrina. 10 y 20: 10% y 20% de componente prebiótico).

Con la finalidad de evaluar diferencias estadísticamente significativas, se realizó una comparación entre los siguientes atributos: aspecto general y aceptabilidad global, aroma y sabor, y color y sabor, obteniendo los siguientes resultados: tanto para S20M como para Q20M no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los pares de atributos comparados, es decir, tras probar el producto no se produjo una mejora significativa en su valoración. Para M10In se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el aroma y el sabor, resultando mejor valorado tras probarlo. En el caso de R10M se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el aspecto general y la aceptabilidad global, así como entre el color y el sabor; esto indica que el consumidor valoró mejor el producto antes de probarlo. Para P20In se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre aspecto general y aceptabilidad global, así como entre aroma y sabor, siendo en este caso mejor valorado el producto después de probarlo. Los resultados obtenidos en las catas pueden observarse en la figura 7.

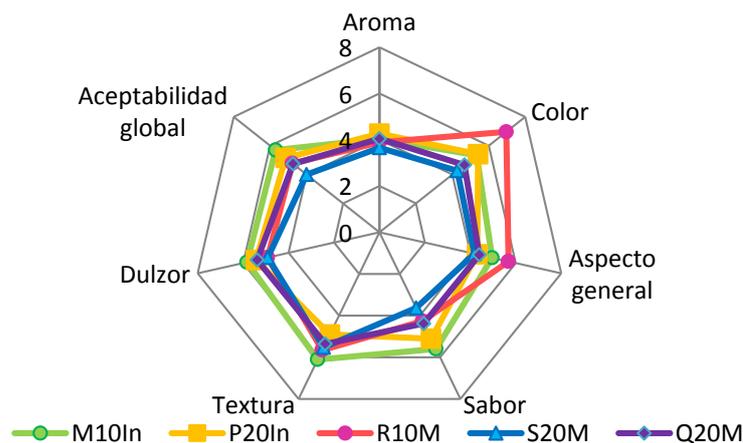


FIGURA 7. Valoración atributos bebidas simbióticas.

CONCLUSIONES

- Se pueden obtener productos simbióticos utilizando licuados (soja, chufa y quinoa) y pulpas vegetales (remolacha, melón y papaya) mediante la incorporación de prebióticos (inulina o maltodextrina) y probióticos (*L. acidophilus*) y utilizando la liofilización como técnica de secado.
- En el caso de los licuados vegetales los productos con mayor carga probiótica (superior a 10^8 ufc/ mL) son los elaborados con soja y quinoa mediante la incorporación de maltodextrina al 20%, aunque únicamente en el caso de la soja se mantienen constantes los niveles de *L. acidophilus* durante la conservación en congelación.
- Los productos obtenidos a base de pulpas vegetales requieren tratamientos térmicos específicos previos, al proceso de fermentación con el microorganismo probiótico, para evitar su alteración organoléptica durante dicho proceso. Los tratamientos de elección son 65°C durante 30 minutos para la papaya y 121°C durante 3 minutos para la remolacha y el melón. En este caso, por su contenido probiótico (superior a 10^7 - 10^8 ufc/ mL) son los obtenidos a partir de papaya con un 20% de inulina, melón con 10% de inulina y remolacha con 10% de maltodextrina. Cabe mencionar que los niveles de *L. acidophilus* únicamente permanecen estables en congelación en el caso de la pulpa de remolacha.
- Tras la evaluación sensorial, la bebida con mejor aceptabilidad global es la elaborada con melón y un 10% de inulina con una adición del 5% de azúcar.

BIBLIOGRAFÍA

- Baranyi, J., Roberts, T. a, 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International journal of food microbiology* 26, 199–218.
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., Fito, P., 2011. Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology* 22, 498–508.
- Bhargava, A., Shukla, S., Ohri, D., 2006. Chenopodium quinoa—An Indian perspective. *Industrial Crops and Products* 23, 73–87.
- Buchanan, R., Whiting, R., Damert, W., 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14, 313–326.
- Cortés, C., Esteve, M.J., Frígola, a., Torregrosa, F., 2005. Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life. *Food Chemistry* 91, 319–325.
- Ekeanyanwu, R.C., Ononogbu, C.I., 2010. Nutritive value of nigerian Tigernut (*Cyperus esculentus* L.). *Agricultural journal* 5, 297–302.
- Femia, A. Pietro, Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M., Caderni, G., 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 23, 1953–60.
- Gibson, G., Roberfroid, M.B., 1995a. Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of nutrition* 1401 – 1412.
- Gibson, G., Roberfroid, M.B., 1995b. Critical Review Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of nutrition* 1401–1412.
- Gomes, A., Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as as probiotics. *Food Science and Technology* 10, 139–157.
- Guarner, F., Schaafsma, G.J., 1998. Probiotics. *International journal of food microbiology* 39, 237–8.
- Gupta, P.K., Mital, B.K., Garg, S.K., 1996. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. *International journal of food microbiology* 29, 105–9.
- Hernández Haba, J., Dubón Pérez, F. *Sistemática Bacteriana*. 1992. Universidad Politécnica de Valencia.
- Jones, P.J., 2002. Clinical nutrition: 7. Functional foods-more than just nutrition. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 166, 1555–63.
- Kapadia, G.J., Tokuda, H., Konoshima, T., Nishino, H., 1996. Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer letters* 100, 211–4.
- Klewicka, E., Zduńczyk, Z., Juśkiewicz, J., 2009. Effect of *Lactobacillus* fermented beetroot juice on composition and activity of cecal microflora of rats. *European Food Research and Technology* 229, 153–157.
- Kolida, S., Gibson, G.R., 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of nutrition* 137, 2503S–2506S.
- Lee, Y.-K., Salminen, S., 1995. The coming age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 6, 241–245.
- Moral, A.M., Moreno-aliaga, M.J., Martínez, J.A., 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutrición Hospitalaria XVIII* (4), 181–188.
- Mosquera, L.H., Moraga, G., Martínez-Navarrete, N., 2010. Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec.) powder. *Journal of Food Engineering* 97, 72–78.
- Nuallkaekul, S., Charalampopoulos, D., 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International journal of food microbiology* 146, 111–7.
- Nuallkaekul, S., Deepika, G., Charalampopoulos, D., 2012. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International* 48, 627–633.

- Özer, D., Akin, S., Özer, B., 2005. Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in *Acidophilus-Bifidus* Yoghurt. *Food Science and Technology International* 11, 19–24.
- Patkai, G., Barta, J., 1996. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. *Nahrung* 40, 267–270.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Soccol, C.R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International* 41, 111–123.
- Reddy, B., 1999. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Possible Mechanisms by Which Pro- and Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth 1. *The Journal of nutrition* 129, 1478–1482.
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., Jacobsen, S.-E., 2003. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International* 19, 179–189.
- Repo-Carrasco-Valencia, R., 2011. Andean indigenous food crops: Nutritional value and bioactive compounds.
- Rivera-Pastrana, D.M., Yahia, E.M., González-Aguilar, G. a., 2010. Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. *Journal of the science of food and agriculture* 90, 2358–65.
- Sablani, S.S., Shrestha, A.K., Bhandari, B.R., 2008. A new method of producing date powder granules: Physicochemical characteristics of powder. *Journal of Food Engineering* 87, 416–421.
- Scalabrini, P., Rossi, M., Spettoli, P., Matteuzzi, D., 1998. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *International journal of food microbiology* 39, 213–9.
- Setchell, K.D.R., Cassidy, A., 1999. Dietary Isoflavones : Biological Effects and Relevance to Human Health. *The Journal of nutrition* 129, 758–767.
- Silva, M. a., Sobral, P.J. a., Kieckbusch, T.G., 2006. State diagrams of freeze-dried camucamu (*Myrciaria dubia* (HBK) Mc Vaugh) pulp with and without maltodextrin addition. *Journal of Food Engineering* 77, 426–432.
- Siok-Koon, Y., Min-Tze, L., 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the science of food and agriculture* 90, 267–75.
- Taper, H.S., Roberfroid, M.B., 2005. Possible adjuvant cancer therapy by two prebiotics-- inulin or oligofructose. *In vivo (Athens, Greece)* 19, 201–4.
- Thomas, Paul R., and Robert Earl, eds. *Opportunities in the nutrition and food sciences: research challenges and the next generation of investigators*. National Academies Press, 1994.
- Wang, Y.-C., Yu, R.-C., Chou, C.-C., 2004. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. *International journal of food microbiology* 93, 209–217.
- Zhang, Q., Pan, J., Wang, Y., Lubet, R., You, M., 2012. Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Molecular carcinogenesis* 1–6.