

ESTUDIO DEL EFECTO DE INCUBACIÓN Y DE LOS CICLOS DE LA IMPREGNACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE UN LÍQUIDO SIMBIÓTICO PARA DESARROLLO DE NUEVOS ALIMENTOS FUNCIONALES.

Monika Dabrowska, Indira Betalleluz Pallardel¹, Noelia Betoret Valls², Cristina Barrera Puigdollers²

RESUMEN

Los objetivos de la presente investigación fueron la evaluación del efecto de incubación con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* sobre las propiedades físico-químicas y funcionales de un líquido simbiótico y la evaluación de la reutilización del mismo líquido en 5 ciclos de impregnación a vacío. El líquido, formulado a partir de zumo de mandarina comercial con incorporación de oligofruktosa y levadura de cerveza, resultó un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo. La incubación tuvo un efecto significativo en la capacidad antioxidante, aumentando un 4,64% y un 26,7% los valores obtenidos por las metodologías de FRAP y DDPH respectivamente, y disminuyendo un 23% el valor obtenido por el método de ABTS. El contenido en ácido ascórbico descendió en un 4,5%, mientras que el contenido en flavanonas no presentó cambios significativos. Durante la reutilización del líquido en cinco ciclos de impregnación, las propiedades físicas presentaron cambios mínimos, se observaron cambios significativos en las propiedades funcionales con un descenso en la actividad antioxidante (10,6%, 2,5% y 7,5 % por FRAP, DPPH y ABTS respectivamente), en el contenido de ácido ascórbico (17,47%) y fenoles (4,6%). Sin embargo, no hubo cambios significativos en el contenido de flavanonas y oligofruktosa.

RESUM

Els objectius de la investigació van ser l'avaluació de l'efecte de la incubació amb *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* sobre les propietats fisicoquímiques i funcionals d'un líquid simbiòtic i l'avaluació de la reutilització del mateix en cinc cicles d'impregnació a buit. El líquid, formulat a partir de suc de mandarina comercial amb la incorporació d'oligofruktosa i llevat de cervesa, va resultar un medi adequat pel creixement del microorganisme. La incubació va tindre un efecte significatiu sobre la capacitat antioxidant que va augmentar un 4,64% i 26,7% amb l'anàlisi mitjançant les metodologies FRAP i DPPH respectivament; el mètode ABTS pel contrari, va evidenciar un descens del 23 %. El contingut d'àcid ascòrbic

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina. Avenida La Molina s/n La Molina. República del Perú.

²Instituto de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n 46022. Valencia. España.

va descendir un 4,5% mentre que el contingut de flavanones no va presentar canvis significatius. Durant la reutilització del líquid en cinc cicles d'impregnació, les propietats físiques presentaren canvis mínims però s'observaren canvis significatius en les propietats funcionals amb un descens significatiu de l'activitat antioxidant (10,6%, 2,5% i 7,5% amb FRAP, DPPH i ABTS respectivament), el contingut d'àcid ascòrbic (17,47%) i els fenols (4,6%). No va haver-hi canvis significatius en el contingut en flavanones i oligofructosa.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effect of incubation with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* on physicochemical and functional properties of a symbiotic liquid and reuse assessment of the same liquid for 5 cycles of vacuum impregnation. The liquid, formulated from commercial tangerine juice with addition of oligofructose and beer protein, was a suitable environment for the growth of the microorganism. The incubation had a significant effect on the antioxidant capacity where an increase of 4.64% and 26.7% was detected under FRAP and DDPH methodologies respectively, in contrast ABTS method showed a decrease of 23%. The content of ascorbic acid, fell by 4.5%, while the content of flavanones no presented significant changes. During the reuse of the liquid in several cycles of impregnation the physical properties showed minimum changes, significant changes were observed in the functional properties with a decrease in antioxidant activity (10.6%, 2.5% and 7.5% by FRAP, DPPH and ABTS respectively), the content of ascorbic acid (17.47%) and phenols (4.6%). Nevertheless, there were no significant changes in the content of flavanones and oligofructose.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, actividad antioxidante, oligofructosa, impregnación a vacío, flavanonas, compuestos fenólicos, probiotico, prebiótico, simbiótico

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios relacionan estrechamente la incidencia de enfermedades crónicas con una dieta desequilibrada. Ante esta situación aumenta el interés por desarrollar alimentos enriquecidos con compuestos bioactivos, dirigidos a colectivos con requerimientos específicos, entre los que se encuentran los probióticos, los prebióticos y los antioxidantes.

Los probióticos son microorganismos vivos que, suministrados en cantidades apropiadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor. Se trata en su mayoría de bacterias ácido-lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, capaces de mejorar la composición de la microflora del colon y aumentar la función barrera de la mucosa intestinal, por lo que estimulan la respuesta inmune y disminuyen la incidencia de trastornos del aparato digestivo, el nivel de colesterol en sangre y el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, entre otros efectos.

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de los alimentos que alcanzan intactos el colon donde estimulan selectivamente la proliferación y actividad de las bacterias beneficiosas presentes en la microbiota intestinal (Manning y Gibson, 2004). A este grupo pertenece la oligofructosa, cuyo consumo regular está asociado con un aumento en la absorción de minerales (Hawthorne y Abrams, 2008; Rastall, 2010), una mejora en la respuesta inmune (Seifert y Watzl, 2007; Macfarlane et al., 2008) y la prevención del cáncer colorectal (Asad et al., 2008).

Por otro lado, los antioxidantes tales como la vitamina C, los flavonoides, derivados polifenoles y carotenoides abundan en los zumos de frutas cítricas y están implicados en la reducción de la incidencia de cáncer, enfermedades cardíacas y enfermedades cerebro-vasculares (Temple, 2000; Sánchez-Moreno et al., 2003; Meléndez-Martínez et al., 2007). La manzana también es una buena fuente de fitoquímicos y antioxidantes en la dieta. Su consumo inhibe la proliferación de las células cancerosas (Dragsted et al., 1993; Waladkhani y Clemens, 1998), disminuye la oxidación lipídica y reduce significativamente el colesterol (Sablé-Amplis et al., 1983; Aprikian et al., 2001; Leontowicz et al., 2001; Salgado et al., 2008).

El equipo investigador ha desarrollado un procedimiento que permite incluir componentes con actividad fisiológica en el interior de una fruta u hortaliza sin modificar sus características estructurales naturales. El procedimiento desarrollado utiliza la operación de impregnación a vacío como método para modificar la composición de las frutas y hortalizas de una forma controlada (Fito et al., 1996). En este contexto, la presente investigación se planteó los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de incubación con el microorganismo probiótico *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, sobre las propiedades físico-químicas y funcionales de zumo de mandarina enriquecido con oligofructosa.
- Evaluar el efecto de la reutilización del líquido anterior durante varios ciclos de impregnación consecutivos sobre sus propiedades físico-químicas y funcionales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia Prima

Se utilizaron manzanas de la variedad *Granny Smith*, en estado de madurez adecuado y con calibre de 80 a 85 mm de diámetro aproximadamente. Se cortaron en discos de 65 mm de diámetro externo, 20 mm de diámetro interno y 5 mm de espesor.

Para la elaboración del líquido de impregnación se utilizó zumo de mandarina comercial marca Don Simón®.

Como fuente de prebiótico se utilizó oligofructano (Beneo™ P95 de ORAFTY, pureza 93,2%).

El microorganismo probiótico empleado fue *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia). La reactivación de los viales de la cepa almacenados en congelación se realizó mediante resuspensión e incubación en caldo MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), a 37 °C durante 24 horas.

Preparación del líquido de impregnación

Con la finalidad de adaptar el zumo de mandarina a las condiciones más favorables para el crecimiento del probiótico, y de acuerdo con estudios previos (Arilla, 2008; Betalleluz, 2012), el pH del zumo de mandarina se ajustó a pH 6 con bicarbonato de sodio, se enriqueció con 0,5% de levadura de cerveza y 5% de oligofructano comercial. Finalmente, el líquido fue inoculado con 0,4% del medio MRS que contenía el microorganismo crecido y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Ensayos de impregnación a vacío (IV)

La operación de impregnación a vacío se llevó a cabo en una cámara a vacío ILMVAE (Alemania). Las manzanas cortadas en rodajas se sumergieron en el líquido de impregnación y se aplicó una presión de vacío al sistema de 50 mbar durante 10 minutos. Posteriormente se restauró la presión atmosférica, manteniendo las muestras sumergidas en el líquido durante otros 10 minutos. Con el fin de determinar la posibilidad de reutilización del líquido de impregnación, se realizaron cinco ciclos de impregnaciones sucesivos.

Determinaciones analíticas

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius* se determinó por duplicado, tanto en el líquido de impregnación como en las muestras de manzana, por el procedimiento de siembra en placa establecido por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF 2000).

Para determinar el contenido microbiano en el líquido de impregnación, se partió de 1 mL de éste y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Para las muestras de manzana, se homogenizaron 5 g con 45 mL de agua de peptona tamponada y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . La siembra de las muestras se realizó en profundidad, con doble capa de agar MRS (Scharlau Chemie ®, Barcelona, España) para garantizar condiciones de micro anaerobiosis. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

El recuento del número de unidades formadoras de colonia (ufc) por mililitro de líquido de impregnación y por gramo de manzana se llevó a cabo en las placas cuyo número de colonias se encontraba entre 30 y 300 ufc.

HUMEDAD

La humedad de las muestras se determinó por triplicado según el método oficial 20.013 de la AOAC (1980) 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.

ACTIVIDAD DEL AGUA

Se midió la actividad del agua (a_w) a 25 °C y por triplicado utilizando un higrómetro de punto de rocío (DECAGÓN Aqualab CX-2, $\pm 0,003$).

SÓLIDOS SOLUBLES

El contenido de sólidos solubles para las muestras líquidas se determinó en un refractómetro (ABBE ATAGO, NAR T3, Japón) termostatado a 20 °C, mediante la lectura directa del índice de refracción en °Brix.

VISCOSIDAD APARENTE

La viscosidad aparente del líquido de impregnación se determinó con un reómetro rotatorio (marca HAAKE, modelo Rheo Stress RS1, Alemania) bajo un gradiente de velocidad de 100 s^{-1} . Se utilizó un sensor cilíndrico cónico (Z34 DIN Ti) y baño termostatado a 25 °C (marca HAAKE, modelo Phoenix 2).

PROPIEDADES ÓPTICAS

El color de las muestras se determinó midiendo reflectancia con un espectrofotómetro (Minolta modelo CM-3600d, Tokio, Japón), utilizando un iluminante D65 y un observador estándar con un ángulo de visión de 10° (UNE 40-080, 1984). Las muestras líquidas se depositaron en cubetas de plástico de 25 mL con paso óptico de 2 cm. Todas las medidas se realizaron sobre fondo blanco y negro. El carácter translúcido de las muestras se evaluó aplicando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión de luz múltiple

(Judd y Wyszecki, 1975; Hutchings, 1999; Talens et al., 2002). A partir de las coordenadas de color CIE-L*a*b* se estimaron las coordenadas psicométricas tono (h_{ab}^*) y croma (C_{ab}^*) (ecuaciones 1 y 2).

$$h_{ab}^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (1)$$

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

Con el fin de cuantificar los cambios globales de color, se calculó la diferencia de color (ΔE), mediante la ecuación 3.

$$\Delta E = \sqrt{|\Delta L^*|^2 + |\Delta a^*|^2 + |\Delta b^*|^2} \quad (3)$$

DENSIDAD APARENTE

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

pH

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro micropH CRISON, 2001, calibrado con buffer de pH 7,00 y 4,01. Como valor de pH se consideró la media de dos determinaciones efectuadas sobre la misma muestra, siempre y cuando la diferencia entre ellas fuera menor de 0,1 unidades.

DETERMINACIÓN DE ACIDO L. ASCÓRBICO

El ácido L-ascórbico fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el método propuesto por Sánchez-Moreno et al. (2003) y empleando como solvente de extracción una disolución acuosa con un 3% de ácido meta fosfórico y un 8% de ácido acético. Para evitar la oxidación del ácido ascórbico, la extracción se realizó en atmósfera de nitrógeno. El extracto fue filtrado con un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm . La separación del ácido ascórbico se realizó por HPLC (Alianza 1996-Water), usando una columna de fase inversa (Luna II Phenomenex) C18 (5 μm) de acero inoxidable (250 x 4.6 mm de d.i.) y un detector de diodos. La fase móvil empleada fue una disolución al 0,01% de H_2PO_4 ajustada a pH 2,5–2,6, bajo un sistema isocrático con un caudal fijo de 1,0 mL/min y 20 μL de volumen de inyección. La identificación del ácido ascórbico se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de absorción UV-visible con los de un estándar de ácido L-ascórbico en una longitud de onda de 245 nm. Las medidas fueron realizadas por triplicado y la cuantificación fue realizada mediante el uso de una curva de calibrado del estándar de ácido L-ascórbico en un rango de 50 a 400 ppm.

DETERMINACIÓN DE FLAVANONAS

Las flavanonas fueron determinadas siguiendo el método propuesto por Cano et al., (2008), utilizando como solvente de extracción una disolución de dimetilsulfóxido y metanol (1:1 v/v). El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm. La separación de las flavanonas se realizó por HPLC (Alianza 1996-Water), usando una columna de fase inversa (Luna II Phenomenex) C18 (5 µm) de acero inoxidable (250 × 4.6 mm de d.i.) y un detector de diodos. Las fases móviles empleadas fueron acetonitrilo (solvente A) y ácido acético al 0,6% (solvente B). Se empleó un sistema gradiente a 1 mL/min, con un tiempo de residencia de 30 minutos y un volumen de inyección de 10 µL. Las flavanonas fueron identificadas comparando su tiempo de retención y espectro de absorción a 280 nm con los patrones correspondientes. Se determinaron las concentraciones usando una curva estándar de calibrado entre 60 y 190 ppm para la hesperidina, entre 9 y 21 ppm para la narirutina y entre 2 y 7 ppm para la didimina.

DETERMINACIÓN DE FRUCTANOS Y AZUCARES REDUCTORES

Para la determinación de fructanos se siguió el método espectrofotométrico/enzimático de la AOAC 999.03 utilizando un kit enzimático (Megazyme, Bray, Irlanda), el cual consiste en un proceso de extracción con agua a 80 °C y un tratamiento de una alícuota de la disolución con una mezcla de dos enzimas (sucrasa y amilasa) que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa y el almidón a glucosa en condiciones de incubación a 40 °C durante 30 minutos. Posteriormente, Los azúcares reductores presentes son reducidos a sus alcoholes por tratamiento con una disolución alcalina de borohidruro a 40 °C durante 30 minutos. La disolución es neutralizada y el borohidruro en exceso eliminado con ácido acético diluido. Los fructosanos luego son hidrolizados a fructosa y glucosa utilizando una fructanasa a 40 °C durante 20 minutos. Finalmente, la glucosa y fructosa obtenidos de la hidrólisis se miden por espectrofotometría a una longitud de onda de 410 nm tras la reacción de la disolución muestra con el reactivo ácido p-hidro-benzoico hidracida (PAHBAH) en baño de agua en ebullición.

Los azúcares reductores fueron determinados siguiendo el método del reactivo p-hidro-benzoico hidracida (PAHBAH) de la AOAC 999.03.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por triplicado, utilizando tres métodos diferentes: el catión radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), reportado por Roberta et al., (1999), el método radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), reportado por Brand-Williams et al., (1995) y el método FRAP descrito por Benzie y Strain (1996). La determinación de las muestras líquidas fue directa y, en los casos necesarios, se realizaron diluciones con agua destilada. Para las muestras sólidas se utilizó el método de extracción descrito por Michiels et al. (2012),

utilizando como solvente acetona/agua/ácido acético (70:28:2 v/v/v) en presencia de nitrógeno para evitar reacciones de oxidación.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó según el método del reactivo Folin–Ciocalteu (FC) reportado por Singleton y Rossi (1965). La determinación de las muestras líquidas, previamente diluidas, fue directa. El método de extracción para las muestras sólidas fue el mismo empleado para determinar la capacidad antioxidante y las mediciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados a partir del análisis simple de la varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. El análisis fue realizado con el paquete estadístico Statgraphics centurión XVI.I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del líquido de impregnación y sobre el crecimiento microbiano.

La Figura 1. muestra la curva de crecimiento del microorganismo y la evolución del pH en el zumo de mandarina formulado.

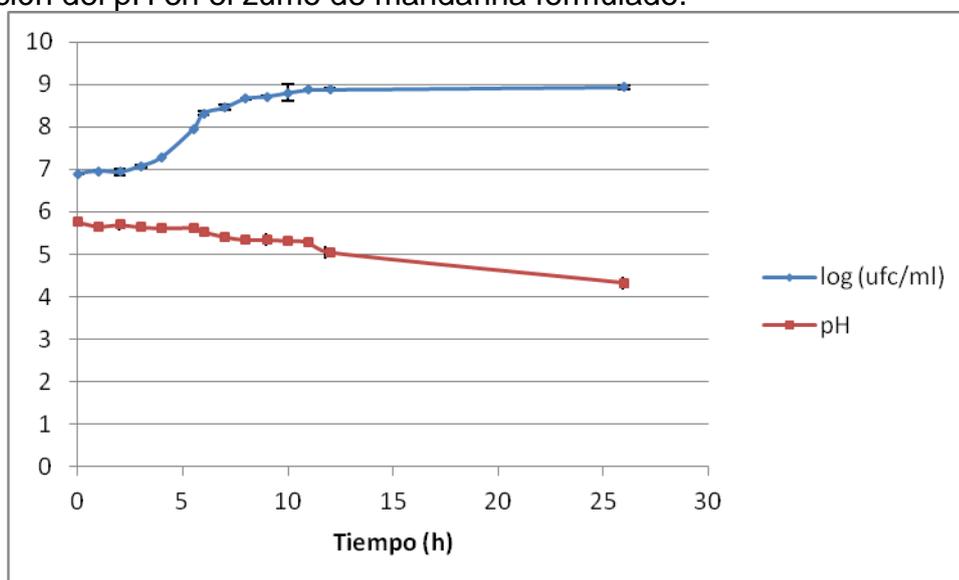


FIGURA 1. Cinética de crecimiento microbiano de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 y evolución del cambio de pH en el zumo de mandarina inoculado.

Como era de esperar, el pH del medio descendió con el crecimiento microbiano como consecuencia de la degradación de los azúcares y la formación de compuestos ácidos, tales como el ácido láctico. En las condiciones ensayadas, el máximo crecimiento microbiano fue de

$7,8 \cdot 10^8$ ufc/mL (8,9 log ufc/mL) y se alcanzó tras 12 horas de incubación, coincidiendo con un descenso del pH desde 6,02 hasta 4,88. A partir de este instante, tanto la concentración microbiana como el pH permanecieron prácticamente invariables. Cabe resaltar que la cantidad de probiótico alcanzada en este estudio casi triplica el valor reportado por Betoret et al., (2012), lo que podría ser debido al empleo como fuente de proteína de levadura de cerveza, rica en vitaminas del grupo B y minerales (fósforo, zinc, cobre, hierro y manganeso), en lugar de levadura panaria, así como a la adición de oligofructosa en la formulación del zumo. Diferentes estudios ponen de manifiesto que la adición de oligofructosa en preparados lácteos y no lácteos favorece el crecimiento y/o supervivencia de diferentes cepas de microorganismos probióticos durante el procesado y el almacenamiento (Shin et al., 2000; Xu et al., 2003; Capela et al., 2006; Oliveira et al., 2011).

En la Tabla 1 se muestran las principales propiedades físico-químicas y microbiológicas analizadas en el líquido de impregnación recién formulado y tras 12 y 24 horas de incubación en estufa a 37°C.

TABLA 1. Efecto del tiempo de incubación sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas del líquido de impregnación.

Tiempo de incubación (h)	0	12	24
Sólidos solubles (Brix)	16,27(0,03)c	16,03(0,05)b	15,90(0,12)a
Azúcares reductores (g/100 mL)	7,6(0,3)c	7,35(0,08)b	6,98(0,07)a
FOS (g/100 mL)	3,9(0,2)a	3,8(0,2)a	3,76(0,07)a
pH	6,02(0,06)c	4,88(0,02)b	4,41(0,02)a
a_w	0,986(0,003)b	0,985(0,003)ab	0,984(0,003)a
Densidad (g/cm ³)	1,0719(0,0009)a	1,073(0,002)a	1,0706(0,0004)a
Viscosidad aparente (cpoises)	3,45(0,04)a	3,63(0,13)c	3,55(0,04)ab
log ufc/mL	6,869(0,008)a	8,93(0,09)b	8,91(0,03)b

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Confirmando lo que se ha comentado anteriormente, el contenido en sólidos solubles totales experimentó un notable descenso como consecuencia de la actividad microbiana. Teniendo en cuenta que la variación en la concentración de oligofructosa resultó mínima (en torno a un 2% tras 24 horas de incubación), se puede afirmar que, como era de esperar, los azúcares simples son fermentados por el probiótico más rápidamente que otros carbohidratos de cadena más larga, como la oligofructosa y, por lo tanto, son su principal fuente de carbono y energía (Cummings et al., 2001, Hernández-Hernández et al., 2012). Según esto, la finalidad de incorporar oligofructosa en la formulación del líquido de impregnación sería completar la dosis saludable de prebióticos que, en el caso particular de España, con un valor de 1,1 g/día según Espinosa-Martos et al., (2006), se encuentra por debajo de la media europea (con un valor según Roberfroid (2000) entre 3 y 11 g/día) y de la recomendada para garantizar su efecto beneficioso para la salud (de 3 a 8 g por porción según Coussement (1999), entre 2 y 10 g por persona y día según Tomomatsu

(1994) y Roberfroid (1998), hasta 15 g/día según Gibson (1999) y Rao (1999) o entre 4 y 12 g/día según Conway (2001)).

Respecto a las propiedades físicas y, teniendo en cuenta que el objetivo es obtener un zumo que pueda ser incorporado con facilidad a rodajas de manzana por impregnación a vacío (IV), se han evaluado los cambios en la viscosidad y la actividad del agua durante la incubación. La viscosidad determina la facilidad de incorporación del líquido en los poros de la estructura (Martínez-Monzó et al., 1998). Por otro lado, disoluciones isotónicas aseguran que durante la IV actúe únicamente el mecanismo de transferencia hidrodinámico (Fito et al., 1996) y que las características de la estructura fresca no se vean prácticamente alteradas por el proceso.

Tal y como lo demuestran los resultados, la viscosidad aparente presenta un ligero ascenso y la actividad del agua un ligero descenso durante la incubación. Aunque las diferencias son estadísticamente significativas, desde el punto de vista tecnológico la magnitud de estos cambios no tiene mayor importancia sobre la operación de impregnación a vacío. En cuanto a la densidad, ésta tiende a mantenerse constante.

En la Figura 2 se muestra el espectro de reflectancia del líquido de impregnación en función del tiempo de incubación y en la Tabla 2 se reportan los cambios en las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y las magnitudes tono y croma. Respecto al color, la variación del tono desde el amarillo hasta el anaranjado en los zumos de naranja depende del contenido en carotenoides (Meléndez-Martínez et al., 2011). Se ha reportado la estabilidad de estos compuestos a los tratamientos térmicos usados habitualmente en el procesado de los alimentos, tales como el escaldado o la cocción (Borenstein y Bunnell, 1966). Otros autores señalan que su estabilidad puede variar mucho dependiendo del tipo de alimento (Purcell et al., 1969). Meléndez-Martínez et al., (2011) afirman que el análisis espectrofotométrico puede proporcionar suficiente información para concluir si estos componentes sufren algún cambio durante el proceso.

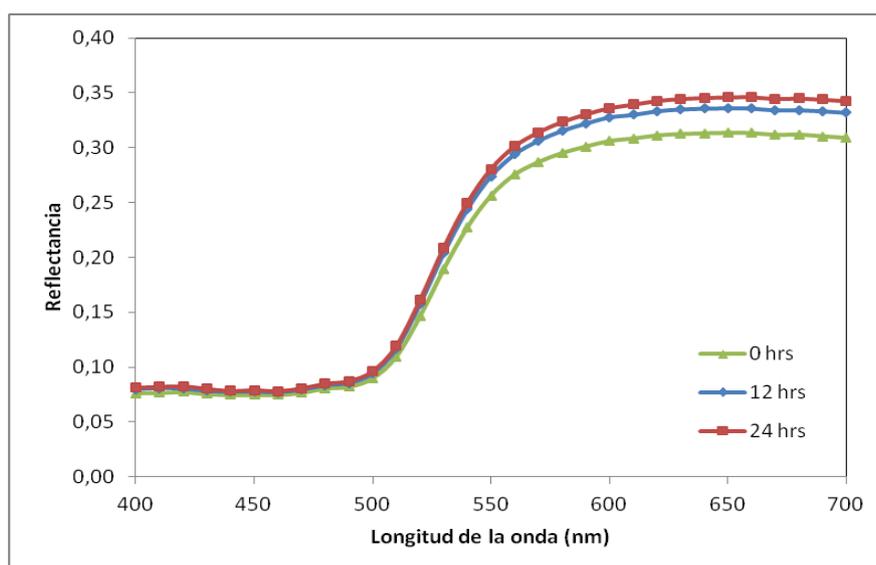


FIGURA 2. Espectro de reflectancia del líquido de impregnación incubado 0, 12 y 24 horas.

En la Figura 2 se observa que la forma de los tres espectros de reflectancia es muy parecida y que los mayores valores de reflectancia, así como las mayores diferencias con el tiempo de incubación, se alcanzaron entre 525 y 700 nm. Este rango corresponde a la detección de las coloraciones de los compuestos carotenoides (580–595: amarillo, 595–605: naranja; 605– 750: rojo), lo que indica cierto efecto de incubación sobre estos compuestos. Los principales carotenoides responsables del color de zumos de naranja y mandarina son α -caroteno y β -caroteno, zeta antheraxantina (amarillo), violaxantina (amarillo), β critraurine (rojo anaranjado) y β - criptoxantina (anaranjado). Altas concentraciones de β -criptoxantina en estos zumos producen el deseable intenso color naranja brillante (Pérez-López et al., 2006). En un estudio conducido por Kun et al., (2008) se reportaron descensos del orden de 10-25% y de 5-25% en el contenido en α y β caroteno durante la fermentación de zanahorias por cepas seleccionadas de bifidobacterias señalando que la degradación podría deberse, en parte al propio metabolismo de las bacterias, además de las condiciones de fermentación (temperatura, pH).

La evaluación de las coordenadas L^* , a^* , b^* y de las magnitudes tono (h^*ab) y croma (C^*ab) del líquido de impregnación (Tabla 2) muestra un aumento en las mismas con el tiempo de incubación. Estas tendencias concuerdan con lo reportado por Koh et al., (2010), quienes observaron un incremento significativo en L^* , a^* y b^* durante la fermentación de jugo de tomate con bifidobacterias (*B. breve* y *B. longum*). Según Spotti et al., (2013), un incremento en los valores a^* y b^* indicaría el desarrollo de un color rojo-marrón, típico de reacciones de Maillard, que podrían haberse favorecido por la presencia de azúcares reductores y de grupos aminos aportados por la fuente de proteína. Por otro lado, las muestras con el tiempo de incubación ganan en luminosidad y pureza de color. A pesar de esto, las diferencias de color (ΔE) entre el líquido formulado y el incubado no son prácticamente perceptibles al ojo humano.

TABLA 2. Efecto del tiempo de incubación sobre las propiedades ópticas del líquido de impregnación. Diferencia de color (ΔE) entre líquidos de impregnación respecto al inicial.

Muestra	L^*	a^*	b^*	h^*ab	C^*ab	ΔE
0	54,3(0,2)a	10,31(0,04)a	36,2(0,3)a	74,1(0,5)a	37,6(0,3)a	-
12	56,09(0,08)b	10,54(0,05)b	37,9(0,2)b	74,45(0,04)b	39,3(0,2)b	2,5(0,2)a
24	56,6(0,2)c	10,70(0,02)c	38,4(0,2)c	74,4(0,6)b	39,8(0,2)c	3,2(0,2)b

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Tabla 3 se muestran los cambios en las propiedades antioxidantes del líquido de impregnación con el tiempo de incubación.

TABLA 3. Efecto del tiempo de incubación sobre las propiedades antioxidantes del líquido de impregnación.

tiempo de incubación (h)	0	12	24
ácido L-ascórbico(mg/L)	333(6)c	324(1)ab	318(5)a
FRAP (mM Fe 2 ⁺)	8,8(0,2)a	8,7(0,6)a	9,2(0,6)a
DPPH (mg AA/L)	388(38)a	484(11)b	492(33)b
ABTS (mM trolox)	11,9(0,2)c	10,4(0,2)b	9,2(0,2)a
Fenoles (mg GAE/L)	548(18)a	529(11)a	530(11)a
Hesperidina (mg/L)	542(7)a	547(3)a	548(5)a
Narirutina (mg/L)	51,1(0,3)a	51,4(0,2)a	51,1(0,9)a
Didimina (mg/L)	21,1(0,2)a	21,4(0,7)a	21,9(0,5)a

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Respecto a la actividad antioxidante y antiradical de las frutas cítricas, ésta se debe principalmente a la fracción hidrosoluble, que contiene fundamentalmente polifenoles y vitamina C, pero también a la fracción apolar, rica en carotenoides (Byers y Perry, 1992; Gorinstein et al., 2001; Tripoli et al., 2007). Entre estos componentes, la vitamina C es considerado uno de los más importantes nutrientes y el que más contribuye en la elevada capacidad antioxidante de estas frutas (entorno al 65-100% según Gardner et al., (2000)). Además, los zumos de mandarina presentan cantidades importantes de flavanonas glicosiladas (principalmente hesperidina), consideradas responsables del 10% de su actividad antioxidante (Abeysinghe et al., 2007).

Tal y como se muestra en la Tabla 3, el contenido en ácido L-ascórbico en el líquido de impregnación recién formulado resultó similar al reportado por otros autores (Meléndez-Martínez et al., 2007) y aunque disminuyó ligeramente tras 24 horas de incubación a 37 °C en presencia de oxígeno, se mantuvo en un nivel aceptable. El efecto de incubación sobre el contenido en ácido L-ascórbico ha sido evaluado por otros en batidos de frutas (Di Cagno et al., 2011) y jugo de fresa (Klopotek et al., 2005), obteniéndose resultados similares.

Debido a la diferente naturaleza de los compuestos antioxidantes presentes en el zumo de mandarina y a sus diferentes capacidades de reaccionar con las especies de radicales empleadas, es recomendable evaluar la actividad antioxidante con más de un método de ensayo (Sdiri et al., 2012). Como se observa en la Tabla 3, la capacidad antioxidante analizada por el método FRAP y DPPH aumenta ligeramente con el tiempo de incubación, pero disminuye cuando se analiza por el método ABTS, lo que puede estar relacionado con la pérdida de los antioxidantes hidrófilos durante la incubación. Como reportan varios investigadores, entre ellos Polydera et al., (2005), la reacción entre el ácido L-ascórbico y el catión de ABTS es prácticamente instantánea, mientras que para los flavonoides es dependiente del tiempo de reacción. Se ha señalado que el método DPPH

es más sensitivo a flavanonas hidrofóbicas, mientras que el método ABTS lo es ante antiradicales hidrofílicos, tales como la vitamina C (Del Caro et al., 2004).

En cuanto a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el líquido de impregnación, ésta no se vio afectada por el proceso de incubación. No se puede afirmar lo mismo de su estructura, cuyos cambios podrían explicar las diferencias encontradas en la actividad antioxidante con el tiempo de incubación. Es un hecho que la microflora intestinal, la cual incluye bifidobacterias y lactobacilos, puede metabolizar algunos compuestos polifenoles produciendo, entre otras transformaciones, hidrólisis de flavonoides glucósilados o ruptura del anillo C de la molécula (Winter et al., 1989). Otros polifenoles pueden ser metabolizados produciendo catecol y otros fenoles más simples. La conversión de los antioxidantes por microorganismos puede afectar la actividad biológica de éstos, dando lugar a la desactivación de compuestos bioactivos o la activación de compuestos inactivos con mayor capacidad de barrido de radicales.

Los resultados mostrados en la Tabla 3 tampoco muestran diferencias significativas en las concentraciones de hesperidina, narirutina y didimina con el tiempo de incubación.

Efecto de la reutilización del líquido de impregnación sobre las propiedades físico-químicas y funcionales y sobre el crecimiento microbiano.

Una cuestión importante en la aplicación industrial de los procesos que implican inmersión de alimentos en medios líquidos, como es el caso de la impregnación a vacío, es la gestión de la disolución residual obtenida en el proceso (Zhao y Xie, 2004). La posibilidad de reutilizarla en el mismo proceso, así como destinarla a la obtención de aceites esenciales, flavonoides u otros compuestos fisiológicamente activos o incluso a la fabricación de otros productos como zumos, néctares o concentrados, podrían ser algunas alternativas, necesarias en la implantación industrial del proceso.

En este trabajo se ha evaluado la variación en las propiedades físico-químicas y funcionales del líquido de impregnación durante su reutilización en 5 ciclos sucesivos de impregnación a vacío. Los resultados mostrados en la Tabla 4 indican que no existen diferencias relevantes entre los parámetros analizados, lo que podría ser debido a que el líquido de impregnación y la manzana son prácticamente isotónicos, así como a la elevada relación masa fruta/masa líquido de impregnación empleada en el proceso (1:4 m/v).

TABLA 4. Efecto de la reutilización sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas del líquido de impregnación.

Nº ciclos de impregnación	0	1	2	3	4	5
Sólidos solubles (Brix)	17,95 (0,07)c	17,6 (0,1)b	17,6 (0,1)b	17,6 (0,1)b	17,4 (0,1)a	17,45 (0,07)a
pH	4,59 (0,01)b	4,57 (0,01)b	4,54 (0,01)a	4,56 (0,02)ab	4,55 (0,01)ab	4,51 (0,01)a
a_w	0,984 (0,003)a	0,984 (0,003)a	0,984 (0,003)a	0,984 (0,003)a	0,984 (0,003)a	0,985 (0,003)a
Densidad (g/cm ³)	1,078 (0,001)b	1,081 (0,002)b	1,079 (0,001)b	1,074 (0,002)ab	1,073 (0,001)a	1,076 (0,002)ab
Viscosidad aparente (cpoises)	4,76 (0,07)b	4,15 (0,06)a	4,195 (0,007)a	4,22 (0,04)a	4,170 (0,014)a	4,24 (0,03)a
log (ufc/mL)	8,9 (0,2)a	8,84 (0,02)a	8,90 (0,02)a	8,92 (0,07)a	8,789 (0,005)a	8,94 (0,05)a

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por el contrario, los cambios en las propiedades funcionales fueron más acusados, tal y como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. Efecto de la reutilización sobre las propiedades funcionales del líquido de impregnación.

Nº ciclos de impregnación	0	1	2	3	4	5
FRAP (mM Fe 2+)	9,92 (0,01)c	9,5 (0,4)abc	9,67 (0,03)bc	9,9 (0,5)c	9,05 (0,08)ab	8,9 (0,4)a
DPPH (mg/L eq AA)	482 (7)a	497 (3)a	438 (45)a	458 (22)a	446 (1)a	469 (46)a
ABTS (mM trolox)	7,71 (0,09)b	7,31 (0,07)a	7,77 (0,02)b	7,28 (0,12)a	7,35 (0,07)a	7,2 (0,2)a
Acido Ascórbico (mg/L)	322 (5)d	311 (7)cd	297 (7)bcd	287 (10)abc	279 (10)ab	266 (12)a
Fenoles (mg GAE/L)	502 (2)b	567 (35)c	464 (2)a	513 (2)b	488 (3)ab	478 (3)ab
Hesperidina (mg/L)	543 (22)b	NA	NA	NA	NA	523 (3)a
Narirutina (mg/L)	38 (2)a	NA	NA	NA	NA	40 (6)b
Didimina (mg/L)	11,8 (0,5)b	NA	NA	NA	NA	10,6 (0,8)a
FOS (g/100 mL)	3,7 (0,2)a	NA	NA	NA	NA	3,72 (0,18)a

Valor entre paréntesis: desviación estándar. NA: no analizado.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el caso concreto del ácido L-ascórbico, la pérdida resultó del orden del 17%, lo que se traduce en un descenso de la capacidad antioxidante medida por los métodos FRAP y ABTS. Nagy (1980) reporta que la degradación de

la vitamina C puede producirse por una vía enzimática y no enzimática. Las enzimas presentes en los cítricos capaces de oxidar la vitamina C son la citocromo oxidasa, la ascórbico oxidasa y la peroxidasa, pero como en esta investigación se ha empleado zumo comercial pasteurizado, es de esperar que estas enzimas no se encuentren en el líquido de impregnación, aunque sí podrían estar presentes algunas, como la peroxidasa, en la matriz impregnada (manzana). La otra vía de degradación sería la no enzimática, debida a las reacciones aeróbicas y anaeróbicas que podrían producirse durante las etapas previas y posteriores a la impregnación a vacío.

Por lo que respecta a la capacidad antioxidante medida por el método DPPH, al ser los compuestos bioactivos lipófilos más resistentes a las condiciones de proceso (luz, O₂ y temperatura), permaneció invariable desde el principio hasta al final del experimento.

A parte de la capacidad antioxidante, es de gran importancia que el fructooligosacárido incorporado mantenga su concentración inicial a lo largo de los ciclos de impregnación. Si no fuera así, sería un factor limitante en la reutilización del líquido. No obstante, los resultados muestran la estabilidad de este componente bajo las condiciones de impregnación.

En cuanto al color, se puede observar en la Tabla 6 que las impregnaciones sucesivas no lo afectan. Tanto la luminosidad como el tono y croma permanecen constantes y las diferencias de color (ΔE) toman valores inferiores a 1 y, por tanto, no apreciables por el ojo humano.

TABLA 6. Efecto de la reutilización sobre las propiedades ópticas del líquido de impregnación. Diferencia de color (ΔE) entre líquidos de impregnación respecto al inicial.

	L*	a*	b*	h*ab	C*ab	ΔE
0	57,018 (0,003)a	13,416 (0,006)a	41,142 (0,011)a	71,939 (0,011)a	43,274 (0,009)a	-
1	57,22 (0,01)a	13,775 (0,005)a	41,49 (0,013)a	71,634 (0,009)a	43,71 (0,012)a	0,540 (0,012)a
2	57,405 (0,002)a	13,791 (0,002)a	41,68 (0,01)a	71,692 (0,006)a	43,903 (0,009)a	0,762 (0,016)b
3	57,391 (0,008)a	13,701 (0,016)a	41,733 (0,011)a	71,82 (0,02)a	43,924 (0,013)a	0,755 (0,014)b
4	57,29 (0,03)a	13,431 (0,007)a	41,61 (0,02)a	72,109 (0,015)a	43,721 (0,019)a	0,54 (0,03)a
5	57,452 (0,005)a	13,479 (0,016)a	41,87 (0,02)a	72,153 (0,015)a	43,98 (0,03)a	0,85 (0,02)c

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Evaluación del grado de enriquecimiento en las muestras impregnadas.

Se evaluó, tanto experimentalmente, como teóricamente mediante la aplicación del modelo hidrodinámico propuesto por Fito (1994) y Fito y Pastor (1994) (ecuación 4), el grado de enriquecimiento de la matriz de manzana con los compuestos bioactivos presentes en el líquido de impregnación.

$$x_{fi} = \frac{x_{ml} X \frac{\rho_{ml}}{\rho_{ff}} + x_{ff}}{1 + X \frac{\rho_{ml}}{\rho_{ff}}} \quad (4)$$

donde: x_{fi} = concentración del componente funcional en la fruta impregnada (g/g); x_{ml} = concentración del componente funcional en el medio líquido (g/g); x_{ff} = concentración del componente funcional en fruta fresca (g/g); X = fracción volumétrica de líquido incorporado (m^3/m^3); ρ_{ml} = densidad del medio líquido (g/cm^3); ρ_{ff} = densidad de la fruta fresca (g/cm^3).

En la Figura 3 se muestran los cromatogramas de la manzana fresca e impregnada y se observan en la manzana impregnada los picos correspondientes a la hesperidina, la narirutina y la didimina, ausentes en la manzana fresca, lo que evidencia el enriquecimiento de la matriz en estas flavanonas.

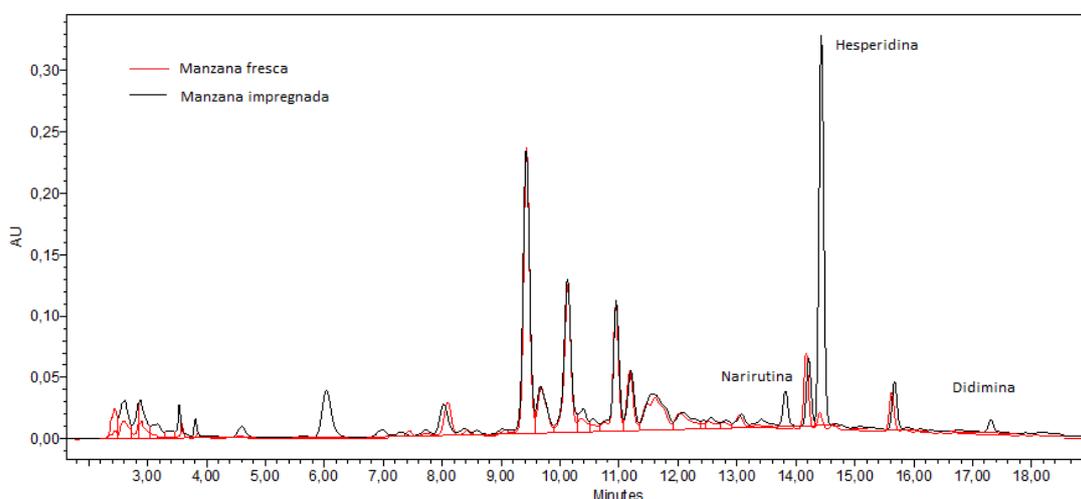


FIGURA 3. Cromatograma a 280 nm de manzana fresca y manzana impregnada.

En la Tabla 7 se pone de manifiesto que los componentes bioactivos del líquido de impregnación han sido incorporados con éxito en la matriz estructural de la manzana. Los datos obtenidos experimentalmente para el contenido en oligosacáridos, microorganismos probióticos y compuestos fenólicos coinciden con los calculados por balance hidrodinámico. Sin embargo, en el caso de las flavanonas y el ácido L-ascórbico se observan algunas diferencias, siendo los valores experimentales ligeramente inferiores a los calculados teóricamente, lo que indica que estos compuestos son menos estables frente a las condiciones de proceso empleadas. Algunos

componentes como el ácido L-ascórbico pueden degradarse en reacciones de oxidación.

TABLA 7. Valores teóricos y experimentales del contenido microbiano y de compuestos funcionales del líquido de impregnación y de las manzanas fresca e impregnada.

	Manzana impregnada			
	Líquido de impregnación	Manzana fresca	Valor experimental	Valor teórico
Log ufc/g	9,05 ¹ (0,01)	N.A	8,11 ¹ (0,06)	8,27
Acido L-ascórbico (mg/100 g)	25,24 (1,01)	2,37 (0,03)	5,54 (0,24)	6,16
Fenoles (mg GAE/100 g)	504 (11)	87,3 (1,2)	82,0 (0,8)	82,62
Hesperidina (mg/100 g)	51,16 (1,4)	N.A	6,56 (0,09)	9,13
Narirutina (mg/100 g)	4,8 (0,2)	N.A	0,92 (0,01)	0,85
Didimina (mg/100g)	2,01 (0,09)	N.A	0,290 (0,003)	0,36
FOS (g/100 g)	3,76 (0,04)	N.A	0,684 (0,004)	0,671

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

En el caso de la hesperidina, componente que presenta la mayor diferencia con el valor estimado podría tener explicación en la naturaleza cristalina en que se presenta una fracción de esta flavanona. Gil-Izquierdo et al., (2001) señalan que las flavanonas de los cítricos y particularmente la hesperidina, son bastantes insolubles en soluciones acuosas ácidas y forman cristales que precipitan, incorporándose en la nube del zumo. Esta podría ser la razón por la que la manzana no se impregnaría uniformemente.

CONCLUSIONES

La incubación de *L. salivarius* spp. *salivarius* en un líquido prebiótico formulado con zumo de mandarina y oligofruktosa ha permitido el crecimiento del mismo hasta los niveles requeridos para ejercer efecto probiótico. De esta forma, ha sido posible obtener un líquido simbiótico con alto contenido en compuestos antioxidantes, apto para ser utilizado en procesos de impregnación a vacío.

Además, ha sido posible la reutilización del líquido simbiótico en cinco ciclos de impregnación sucesivos sin que se vean afectadas sus propiedades físico-químicas y funcionales, lo que supone un aspecto decisivo en la aplicación industrial para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

REFERENCIAS:

- Abeysinghe, D. C., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C., & Chen, K. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4), 1338-1344.
- A.O.A.C. (1980). Official methods of analysis (13th edition) Washington DC: Association of official analytical chemists.
- AOAC Official Method 999.03 Measurement of Total Fructan in Foods, Dirección URL: <http://down.40777.cn/stardard/8/45.4.06B%20AOAC%20Official%20Method%20999.03%20Measurement%20of%20Total%20Fructan.pdf> [Consulta: 27 Enero 2014]
- Aprikian, O., Levrat-Verny, M., Besson, C., Busserolles, J., Rémésy, C., & Demigné, C. (2001). Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chemistry*, 75(4), 445-452.
- 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.
- Asad, U. Emenaker, N. J., & Milner, J. A. (2008). Colorectal cancer prevention: The role of prebiotics. In G. R. 285-294 Boca Raton: CRC Press Gibson, & M. B. Roberfroid, *Handbook of Prebiotics*, 285
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Betalleluz I., Fito P., Betoret N. (2012). Estudio del enriquecimiento de manzana con prebióticos, probióticos y componentes antioxidantes por impregnación a vacío para el desarrollo de aperitivos altamente funcionales y de bajas calorías. Tesis doctoral en proceso de entrega para defensa.
- Betoret, E., Betoret, N., Arilla, A., Bennár, M., Barrera, C., Codoñer, P., et al. (2012). No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *helicobacter pylori*. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 289-293.
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V., & Fito, P. (2012). Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16(0), 298-304.
- Borenstein, B., & Bunnell, R. H. (1966). Carotenoids: properties, occurrence, and utilization in foods. *Advances in Food Research*, 15, 195-276
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Byers, T., & Perry, G. (1992). Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annual Review of Nutrition*, 12, 139-159.
- Cano, A., Medina, A., & Bermejo, A. (2008). Bioactive compounds in different citrus varieties. discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 377-381.
- Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203-211.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., & Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 415S-420S.
- Conway, P. (2001). Prebiotics and human health: The state-of-the-art and future perspectives. *Food & Nutrition Research*, 45(0).
- Coussement, P. A. (1999). Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *The Journal of nutrition*, 129(7 Suppl), 1412S-7S.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., & Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84(1), 99-105.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062-1071.

- Dragsted, L. O., Strube, M., & Larsen, J. C. (1993). Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacology & toxicology*, 72 Suppl 1, 116-135.
- Espinosa-Martos, I., Rico, E., & Rupèrez, P. (2006). Note. Low Molecular Weight Carbohydrates in Foods Usually Consumed in Spain. *Food Science and Technology International*, 12(2), 171-175.
- Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A., & Pardo, P. (1996). Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. *Journal of Food Engineering*, 27(3), 229-240.
- Fito, P., & Pastor, R. (1994). Non-diffusional mechanisms occurring during vacuum osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 21(4), 513-519.
- Fito, P. (1994). Modelling of vacuum osmotic dehydration of food. *Journal of Food Engineering*, 22(1-4), 313-328.
- Gardner, P. T., White, T. A. C., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4), 471-474.
- Gibson, G. R. (1999). Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *The Journal of nutrition*, 129(7 Suppl), 1438S-41S.
- Gil-Izquierdo, A., Gil, M. I., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (2001). In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1035-1041.
- _____, M., et al. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74(3), 309-315.
- Hawthorne, K. M., & Abrams, S. A. (2008). Prebiotics and the absorption of minerals: a review of experimental and human data. In G. R. Gibson, & M. B. Roberfroid, *Handbook of Prebiotics* (pp. 105-113). Boca Raton: CRC Press.
- Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., & Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30(2), 355-361.
- Hutchings, J., 1999. *Food color and appearance*. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland
- ICMSF. *Microorganismos de los Alimentos. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios*. Editorial Acribia, Zaragoza. Vol. 6 (2000).
- Judd, D., Wyszecski, G., 1975. *Colour in Business. Science and Industry*. New York: John Wiley and Sons, INC.
- Klopotek, Y., Otto, K., & Bohm, V. (2005). Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5640-5646.
- Koh, J. H., Kim, Y., & Oh, J. H. (2010). Chemical characterization of tomato juice fermented with bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 75(5), C428-32.
- Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D., & Hoschke, Á. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. *Process Biochemistry*, 43(8), 816-821.
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Bartnikowska, E., Leontowicz, H., Kulasek, G., & Trakhtenberg, S. (2001). Sugar beet pulp and apple pomace dietary fibers improve lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Food Chemistry*, 72(1), 73-78.
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of applied microbiology*, 104(2), 305-344.
- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 287-298.
- Martínez-Monzó, J., Martínez-Navarrete, N., Chiralt, A., & Fito, P. (1998). Mechanical and Structural Changes in Apple (Var. Granny Smith) Due to Vacuum Impregnation with Cryoprotectants. *Journal of Food Science*, 63(3), 499-503
- Meléndez-Martínez, A. J., Gómez-Robledo, L., Melgosa, M., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2011). Color of orange juices in relation to their carotenoid contents as assessed from different spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 837-844.

- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chemistry*, 101(1), 177-184.
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986-993.
- Nagy, S. (1980). Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(1), 8-18.
- Oliveira, R. P. d. S., Perego, P., Oliveira, M. N. d., & Converti, A. (2011). Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*, 107(1), 36-40.
- Pérez-López, A., Beltran, F., Serrano-Megías, M., López, D., & Carbonell-Barrachina, A. E. (2006). Changes in orange juice color by addition of mandarin juice. *European Food Research and Technology*, 222(5-6), 516-520.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2005). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh navel orange juice. *Food Chemistry*, 91(3), 495-503.
- Purcell, A. E., Walter, W. M., & Thompkins, W. T. (1969). Relation of vegetable color to physical state of the carotenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(1), 41-42.
- Rao, A. V. (1999). Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *The Journal of nutrition*, 129(7 Suppl), 1442S-5S.
- Rastall, R. A. (2010). Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 305-339
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A. E., & Gibson, G. R. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*, 128(1), 11-19.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6 Suppl), 1682S-7S; discussion 1688S-90S.
- Roberta Re, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Catherine RE (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization Assay. *Free Radic Biol Med* 26,1231-1237.
- Sablé-Amplis, R., Sicart, R., & Agid, R. (1983). Further studies on the cholesterol-lowering effect of apple in human. Biochemical mechanisms involved. *Nutrition Research*, 3(3), 325-328.
- Salgado, J. M., Curte, F., & Mansi, D. (2008). Effect of gala apples (*Malus domestica* Borkh) on lipidemia of hyperlipidemic rats. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28, 477-484.
- Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., & Cano, M. P. (2003). Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 647-653.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the science of food and agriculture*, 83(5), 430-439.
- Sdiri, S., Bermejo, A., Aleza, P., Navarro, P., & Salvador, A. (2012). Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Research International*, 49(1), 462-468.
- Seifert, S., & Watzl, B. (2007). Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of nutrition*, 137(11 Suppl), 2563S-2567S.
- Shin, H., Lee, J., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and Viability of Commercial *Bifidobacterium* spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. *Journal of Food Science*, 65(5), 884-887.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Spot Ti, M. J., Perduca, M. J., Piagentini, A., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2013). Gel mechanical properties of milk whey protein–dextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*, 31(1), 26-32.

-Navarrete, N., Fito, P., & Chiralt, A. (2002). Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 191-199.

Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-459.

Tomomatsu, H. (1994). Health effects of oligosaccharides. *Food Technol.* 48:61-65.

Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.

Waladkhani, A. R., & Clemens, M. R. (1998). Effect of dietary phytochemicals on cancer development (review). *International journal of molecular medicine*, 1(4), 747-753.

Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V. R., Jr, & Bokkenheuser, V. D. (1989). C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), 1203-1208.

Xu, Z. R., Hu, C. H., Xia, M. S., Zhan, X. A., & Wang, M. Q. (2003). Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry science*, 82(6), 1030-1036.

Zhao, Y., & Xie, J. (2004). Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15(9), 434-451.