

# EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA Y DE LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD DE *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* spp. *SALIVARIUS* EN SNACKS DE MANZANA

Maria Alexandra Balau, Cristina Barrera Puigdollers<sup>1</sup>, Noelia Betoret Valls<sup>1</sup>

## RESUMEN

En su propósito de desarrollar alimentos probióticos alternativos a los lácteos que se encuentran habitualmente en el mercado, el grupo de investigación que dirige este estudio ha logrado incorporar zumo de mandarina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en la matriz estructural de láminas de manzana mediante la técnica de impregnación a vacío. Sin embargo, las muestras impregnadas, con recuentos  $> 10^6$  UFC/g, perdían su carácter probiótico tras el secado con aire a 40 °C, probablemente debido a que los valores de actividad del agua finales no descendieron por debajo de 0,45.

Con el objeto de aumentar la viabilidad del probiótico en el producto deshidratado, este trabajo plantea la incorporación de trehalosa y la aplicación de presiones de homogeneización al líquido de impregnación, así como la reducción en la actividad del agua del snack.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el factor más decisivo en la supervivencia del micrororganismo durante el almacenamiento del snack de manzana es la actividad del agua alcanzada por el mismo tras el proceso de secado, siendo preferibles valores de esta propiedad en torno a 0,35. En caso de no alcanzar valores tan bajos en la actividad del agua, la incorporación de un 10% de trehalosa al líquido de impregnación o la aplicación al mismo de una presión de homogeneización de 100 MPa contribuirían a reducir la pérdida de viabilidad del microorganismo probiótico durante el almacenamiento del snack.

## RESUM

En el seu propòsit de desenvolupar aliments probiòtics alternatius als làctics que es troben habitualment en el mercat, el grup de recerca que dirigeix aquest estudi ha aconseguit incorporar suc de mandarina inoculat amb *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius* en la matriu estructural de llàmines de poma mitjançant la tècnica d'impregnació a buit. No obstant, les mostres impregnades, amb recomptes  $> 10^6$  UFC/g, perdien el seu caràcter probiòtic després de l'assecat amb aire a 40 °C, probablement

---

<sup>1</sup> Instituto de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de Valencia. Camino de Vera, s/n 46022. Valencia. España.

degut a que els valors d'activitat de l'aigua finals no van descendir per sota de 0,45.

Amb l'objecte d'augmentar la viabilitat del probiòtic en el producte deshidratat, aquest treball planteja la incorporació de trehalosa i l'aplicació de pressions d'homogeneïtzació al líquid d'impregnació, així com la reducció en l'activitat de l'aigua del aperitiu.

D'acord amb els resultats obtinguts, el factor més decisiu en la supervivència del microrganisme durant l'emmagatzematge del aperitiu de poma és l'activitat de l'aigua aconseguida després del procés d'assecat, sent preferibles valors d'aquesta propietat en torn a 0,35. En cas de no aconseguir valors tan baixos en l'activitat de l'aigua, la incorporació d'un 10% de trehalosa al líquid d'impregnació o l'aplicació al mateix d'una pressió d'homogeneïtzació de 100 MPa contribuirien a reduir la pèrdua de viabilitat del microorganisme probiòtic durant l'emmagatzematge del aperitiu.

## **ABSTRACT**

In its aim to develop probiotic foods as an alternative to the dairy products currently available on the market, the research group that heads this study has achieved the incorporation of tangerine juice, inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, in the structural matrix of apple slices through vacuum impregnation. Nevertheless, the impregnated samples, with bacteria counts  $> 10^6$  CFU(Colony Forming Units)/g, were losing their probiotic content after being air dried at 40 °C, probably due to the fact that final water activity values did not descend to less than 0,45.

In order to increase the probiotic viability in the dehydrated product, this work proposes the incorporation of trehalose and the application of homogenization pressure to the impregnation liquid, as well as the reduction of water activity in the snack.

According to the obtained results, the most decisive factor in the survival of the microorganism during the apple snack storage is the water activity value reached after the drying process, being preferred a value of 0,35. In the case of not reaching such low values for the water activity, the incorporation of 10% trehalose or the application of a homogenization pressure of 100MPa to the impregnation liquid, would contribute to the reduction of the loss in probiotic microorganism viability during snack storage.

**PALABRAS CLAVE:** trehalosa, homogeneización, impregnación a vacío, secado, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, almacenamiento.

## INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son aquellos que, más allá de su valor nutritivo, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana, mejorándola e incluso reduciendo el riesgo de contraer determinadas enfermedades. A esta categoría pertenecen desde frutas y hortalizas, con un contenido naturalmente elevado en compuestos antioxidantes (Day et al., 2009), hasta alimentos de diseño en los que uno o varios ingredientes han sido añadidos, eliminados, concentrados o diluidos.

De entre las frutas, la manzana es una de las más ricas en compuestos activos, fundamentalmente pectina (que actúa como fibra soluble), aminoácidos, flavonoides (catequinas y quercetina) y minerales (calcio, hierro, magnesio, fósforo y potasio), que le confieren propiedades antiinflamatorias, antidiarreicas y anticancerígenas, entre otras (Boyer y Liu, 2004; McCann et al., 2007; Sun-Waterhouse et al., 2008a y 2008b). Por su parte, el zumo de mandarina es rico en compuestos antioxidantes que reducen a los radicales libres y minimizan los riesgos cardiovasculares en individuos con altos niveles de colesterol (Codoñer-Franch et al., 2008 y 2010).

Teniendo esto en cuenta, el grupo de investigación que dirige el presente estudio ha desarrollado un snack de manzana (cv. Granny Smith) con propiedades antioxidantes mejoradas combinando las técnicas de impregnación a vacío y secado por aire caliente (Codoñer-Franch et al., 2013), lo que ha permitido reducir desde 500 mL de zumo hasta 40 g de snack la ración diaria necesaria para conseguir una reducción similar en los biomarcadores del estrés oxidativo en el plasma sanguíneo. En un siguiente paso, la misma técnica de impregnación a vacío se empleó en la incorporación, por medio de gradientes de presión, de zumo de mandarina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en la matriz estructural de láminas de manzana (Betoret et al., 2012a). De esta forma fue posible obtener un alimento probiótico ( $> 10^6$  UFC/g) y con efecto potencial frente a la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*. Por otra parte, se pudo constatar que la posterior estabilización mediante secado con aire a temperaturas moderadas ( $< 40$  °C) produce un descenso notable en el contenido microbiano, que incluso se anula tras 15 días de almacenamiento en ausencia de luz y oxígeno (Villamizar et al., 2013). Probablemente, la actividad del agua alcanzada en estos casos por el producto seco ( $a_w \approx 0,45$ ) no resultó lo suficientemente baja como para garantizar la estabilidad del probiótico. Según estudios previos (Vesterlund et al., 2012), la supervivencia celular de un probiótico se ve particularmente afectada cuando la matriz del alimento tiene una actividad del agua elevada ( $a_w > 0,25$ ). Igualmente, actividades del agua demasiado bajas ( $a_w < 0,1$ ) favorecen la oxidación de los lípidos de membrana y la pérdida de viabilidad.

La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1,1)- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que se encuentra en multitud de organismos, en los

que actúa como azúcar de reserva y como agente protector de proteínas y membranas biológicas (Lins et al., 2004). En procesos de deshidratación, la trehalosa interacciona con las membranas celulares para mantener el estado fluido y prevenir la fusión, la separación de fases y la rotura de las mismas (Atarés et al., 2009; Betoret et al., 2015; Crowe et al., 1984), favoreciendo la deformación elástica y reduciendo la incidencia de roturas.

Por lo que respecta a las altas presiones de homogeneización, su aplicación en la industria alimentaria está cobrando una gran importancia como alternativa a los tratamientos térmicos tradicionales que, si bien garantizan la seguridad microbiológica, también destruyen gran parte de los compuestos con actividad funcional (Gómez et al., 2011). La homogeneización se basa en hacer pasar un alimento fluido a través de una válvula que ofrece resistencia, lo que permite obtener presiones elevadas. Con respecto al efecto del tratamiento con altas presiones de homogeneización sobre componentes bioactivos, algunos estudios muestran un aumento en la supervivencia de cepas con efecto probiótico y/o una mejora en su capacidad de adhesión a las células intestinales y en su resistencia al proceso de digestión (Basson et al., 2007; Patrignani et al., 2009; Tabanelli et al., 2012). Ensayos con zumo de mandarina ponen de manifiesto que la homogeneización disminuye el tamaño de las partículas suspendidas, aumentando la estabilidad de la nube y, con ello, la disponibilidad de los componentes activos con propiedades antioxidantes (Betoret et al., 2009; Betoret et al., 2012b).

Por todo lo expuesto anteriormente, este trabajo se propone con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración de trehalosa (desde 0 hasta 30% en peso) y de la aplicación de altas presiones de homogeneización (desde 0 hasta 150 MPa) sobre la supervivencia de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina y en un snack de manzana obtenido por impregnación a vacío y posterior secado con aire a 40 °C hasta valores de actividad del agua en torno a 0,35 y 0,45.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materias primas**

Se utilizaron manzanas (cv. *Granny Smith*), en estado de madurez adecuado, cortadas en láminas de 5 mm de espesor, 65 mm de diámetro externo y 20 mm de diámetro interno.

El líquido de impregnación se elaboró a partir de zumo de mandarina comercial (marca Consum) y diferentes concentraciones (entre 0 y 30% en peso) de trehalosa extraída a partir de almidón de tapioca (TREHA™, Cargill Ibérica, Barcelona, España).

Como microorganismo probiótico se escogió el *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 de la Colección Española de Cultivos Tipo

(Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia) por su potencial efecto contra la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*. Para recuperación de la cepa liofilizada ésta se resuspendió e incubó, según indicaciones del proveedor, en el medio líquido estéril recomendado (MRS Broth, Scharlau Chemie®, Barcelona, España) a 37 °C durante 24 horas.

### **Preparación del líquido de impregnación**

Por una parte, se impregnaron láminas de manzana con zumo de mandarina comercial al que se había añadido trehalosa en diferentes concentraciones, desde 0 hasta un 30% en peso. Posteriormente, con las muestras impregnadas se llevaron a cabo los ensayos de secado conducentes a la obtención de las correspondientes isothermas de desorción a diferentes temperaturas.

Por otra parte, el mismo zumo de mandarina comercial, con y sin trehalosa, se ajustó hasta pH 6 con bicarbonato de sodio (10 g/L), se enriqueció con levadura (5 g/L) inactivada por calentamiento hasta 121 °C durante 20 minutos y se inoculó con el medio MRS Broth que contenía el microorganismo crecido (4 mL/L). Tras su incubación durante 24 horas a 37 °C, los líquidos resultantes se homogeneizaron a diferentes presiones (desde 0 hasta 150 MPa) y se procedió al recuento de viables presentes en los mismos. En una siguiente etapa, las láminas de manzana se impregnaron con los líquidos que presentaron un mayor contenido en células vivas y se secaron con aire a 40 °C hasta alcanzar un determinado valor de actividad del agua.

### **Homogeneización**

La homogeneización se llevó a cabo a 20, 50, 100 y 150 MPa en un equipo de altas presiones para laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia).

### **Impregnación a vacío**

La impregnación a vacío se llevó a cabo en una cámara hermética (Heraeus vacuum oven Thermo Fisher Scientific Inc., Alemania) conectada a una bomba de vacío (ILMVAC, Alemania). En una primera etapa, las láminas de manzana se introdujeron en el líquido de impregnación y el sistema se sometió a una presión de vacío de 50 mbar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se restauró la presión atmosférica y las muestras se mantuvieron sumergidas en el líquido durante 10 minutos más.

## **Secado por aire caliente**

Para el secado de las muestras de manzana se utilizó un secador de bandejas CLW 750 TOP+ (Pol-Eko-Aparatura SPJ, Polonia) de flujo transversal. Los ensayos se llevaron a cabo con aire a diferentes temperaturas (30, 40, 50 y 60 °C) y una velocidad de 2 m/s. La duración del proceso se ajustó a diferentes tiempos, con la finalidad de obtener valores de actividad del agua entre 0,9 y 0,3. A cada tiempo las muestras se analizaron en términos de variación de masa, humedad y actividad del agua.

## **Almacenamiento**

Únicamente se almacenaron muestras de manzana secadas con aire a 40 °C hasta una actividad del agua de 0,45 y 0,35. Para tal fin, las muestras deshidratadas se introdujeron en bolsas herméticas y se mantuvieron a temperatura ambiente y en ausencia de luz. A diferentes tiempos a lo largo del almacenamiento (0, 7, 15 y 30 días), se analizó el contenido microbiano de las muestras.

## **Determinaciones analíticas**

### **Variación de masa**

La variación de masa se determinó mediante pesado de las muestras en una balanza analítica (precisión  $\pm 0,001$  g) antes y después de cada una de las etapas de proceso.

### **Humedad**

La humedad ( $x^w$ , en g agua/g total) se determinó según el método oficial 20.013 de la AOAC (1980) para frutas ricas en azúcar. Este método consiste en cuantificar la pérdida de peso que experimenta una muestra cuando se somete a secado en una estufa de vacío (Vaciotem J.P Selecta) a una presión de 60 mm Hg y a una temperatura de 60 °C hasta alcanzar un peso constante (ecuación 1):

$$x^w = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \quad (1)$$

donde:  $M_0$  = es el peso del crisol vacío (g);  $M_1$  = es el peso del crisol con la muestra antes del secado en estufa a 60 °C (g) y  $M_2$  = es el peso del crisol con la muestra tras el secado en estufa a 60 °C (g).

## Actividad del agua

Para la determinación de la actividad del agua ( $a_w$ ) se empleó un higrómetro de punto de rocío (AquaLab 4TE) con una sensibilidad de  $\pm 0,003$ . Este equipo proporciona una medida directa de la actividad del agua con un sensor infrarrojo de precisión superior al 2% a partir de un volumen de muestra de unos 3 cm<sup>3</sup>.

## Sólidos solubles

El contenido en sólidos solubles totales (°Brix) presentes en los diferentes líquidos de impregnación se midió por refractometría en un equipo de mesa (Abbe Atago NAR-3T) termostataado a 20 °C.

## Densidad real

La densidad del zumo con diferentes concentraciones de trehalosa y sin inocular ( $\rho$  en g/cm<sup>3</sup>) se determinó con un picnómetro de líquidos y utilizando agua como líquido de referencia (ecuación 2):

$$\rho = \frac{M_{pz} - M_{pv}}{M_{H_2O} - M_{pv}} \quad (2)$$

donde:  $M_{pz}$  = es la masa del picnómetro lleno de zumo (g);  $M_{pv}$  = es la masa del picnómetro vacío (g) y  $M_{H_2O}$  = es la masa del picnómetro lleno de agua (g).

## Análisis microbiológico

El contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* se analizó, por triplicado, tanto en el medio específico de crecimiento, como en los zumos y en las muestras de manzana impregnadas y secas, por el procedimiento de dilución seriada, siembra en superficie, incubación a 37 °C durante 24 horas y recuento.

En el caso de las muestras líquidas, las medidas se realizaron directamente a partir de 1 mL. En el caso de las muestras sólidas, éstas se trituraron previamente con agua de peptona tamponada (relación 1:9 p/v) en una bolsa de stomacher.

## Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística de los resultados, se realizaron análisis simples y/o múltiples de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) usando el Software Statgraphics Plus, versión 5,1.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Efecto de la trehalosa sobre el comportamiento de láminas de manzana durante su secado por aire caliente

En la tabla 1 se muestran las propiedades físico-químicas analizadas en el zumo de mandarina comercial al que se ha añadido diferentes cantidades de trehalosa. Como era de esperar, los valores de pH prácticamente no se vieron afectados por la incorporación de este disacárido, mientras que la densidad ( $\rho$ ) y el contenido en sólidos solubles totales (Brix) aumentaron significativamente con la concentración de trehalosa, lo que se tradujo en un notable descenso en la actividad del agua ( $a_w$ ) de las disoluciones de impregnación. Como consecuencia de este carácter hipertónico adquirido por los zumos que incluían trehalosa en su composición, las muestras de manzana experimentaron incrementos en su masa ( $\Delta M^{0IV}$ ) menores en el Z+0%T de  $0,133 \pm 0,008$  y Z+10%T de  $0,060 \pm 0,002$ , o incluso disminuyeron su masa total durante la etapa de impregnación a vacío en el caso de Z+30%T que esta de  $-0,041 \pm 0,002$ .

**TABLA 1.** Propiedades físico-químicas de las diluciones de impregnación.

DISOLUCIÓN	$a_w$	Brix	pH	$\rho$ (cm/m <sup>3</sup> )
Z+0%T	$0,988 \pm 0,002^c$	$12,05 \pm 0,07^a$	$3,765 \pm 0,007^a$	$1,0502 \pm 0,0003^a$
Z+10%T	$0,9812 \pm 0,0002^b$	$19,90 \pm 0,14^b$	$3,755 \pm 0,007^a$	$1,0822 \pm 0,0004^b$
Z+30%T	$0,965 \pm 0,002^a$	$35,95 \pm 0,07^c$	$3,745 \pm 0,007^a$	$1,1592 \pm 0,0006^c$

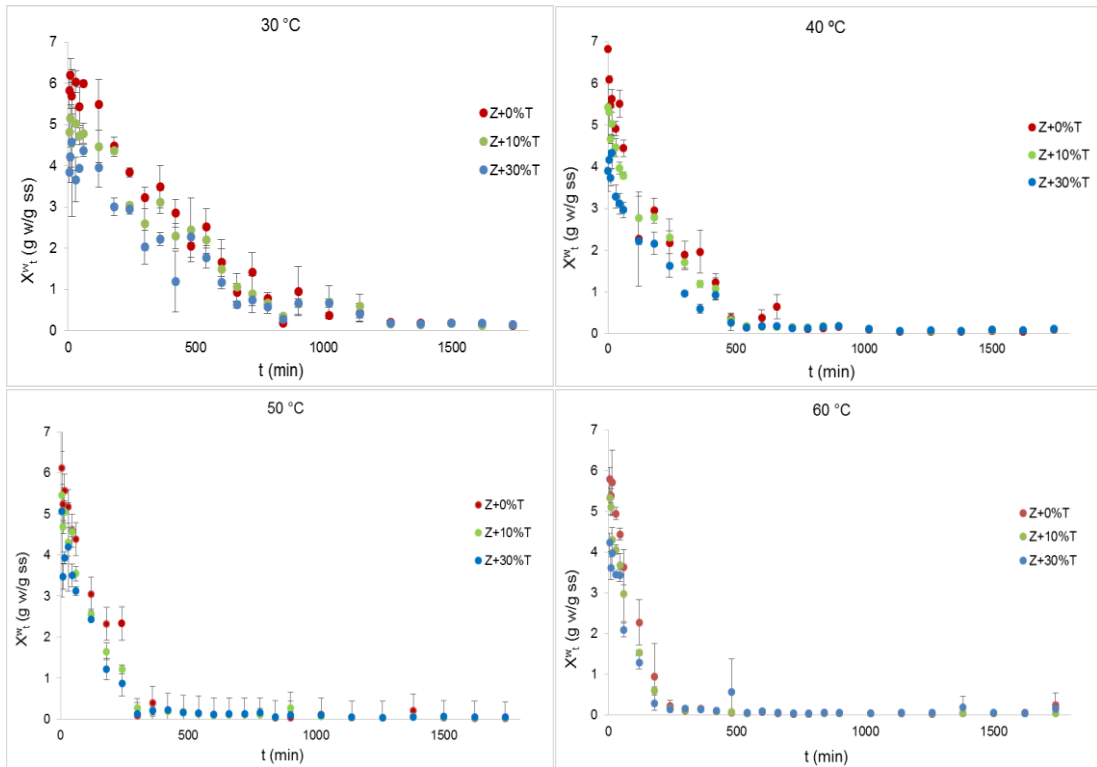
Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

a, b, c en la misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

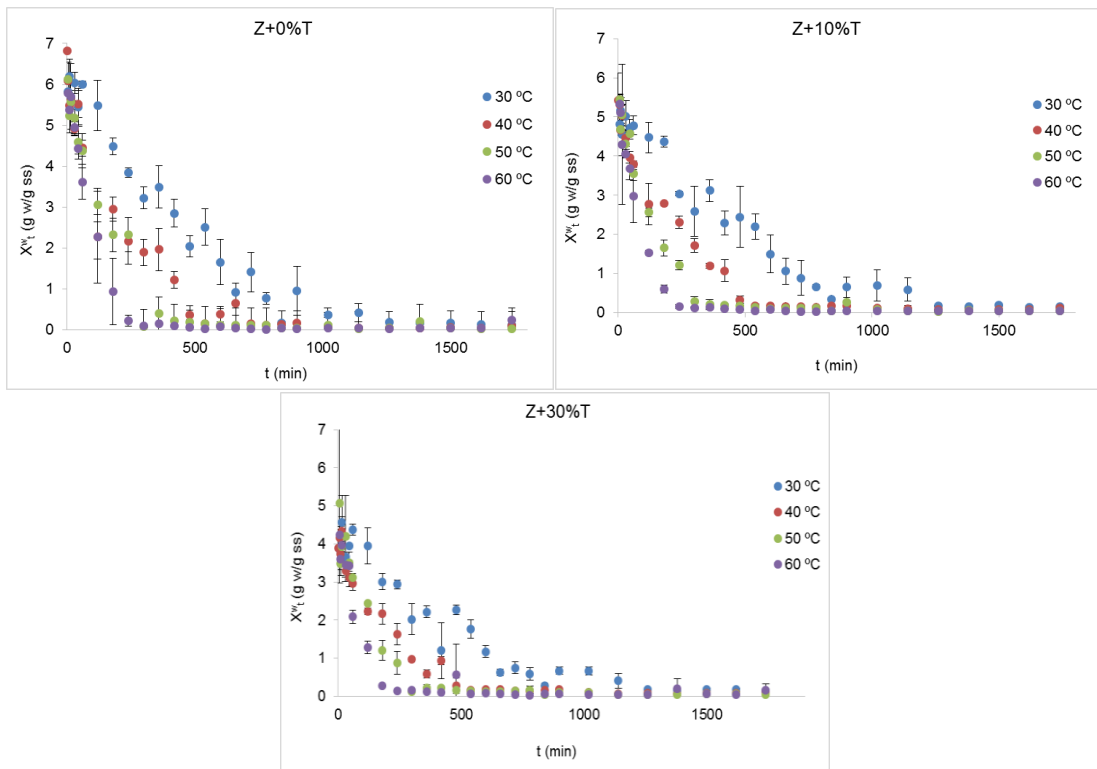
Una vez impregnadas con las diferentes disoluciones, las láminas de manzana se secaron con aire caliente a 30, 40, 50 o 60 °C. En las figuras 1 y 2 se muestran, agrupadas por temperaturas y por tipo de disolución de impregnación respectivamente, las curvas de secado ( $X_t^w$  en función del tiempo) obtenidas para cada tratamiento.

Cabe resaltar que, dado que el objetivo principal del presente trabajo no era analizar el efecto de las variables de proceso sobre la cinética de secado, el diseño de los experimentos se llevó a cabo de manera que no todos los puntos de una misma curva de secado se obtuvieron exactamente en las mismas condiciones de humedad relativa.





**FIGURA 1.** Efecto de la concentración de trehalosa sobre las curvas de secado de láminas de manzana secadas a diferentes temperaturas.



**FIGURA 2.** Efecto de la temperatura sobre las curvas de secado de láminas de manzana impregnadas con diferentes concentraciones de trehalosa.

A pesar de ello, el ajuste de los datos experimentales de acuerdo a la solución simplificada de la ecuación general de difusión propuesta por Crank (1975) para una geometría plana y tiempos cortos de tratamiento (ecuación 3) resultó en valores de correlación lineal considerablemente elevados (tabla 2).

$$1 - Y_t = 1 - \frac{X_t^w - X_\infty^w}{X_0^w - X_\infty^w} = 2 \sqrt{\frac{D_e t}{\pi l^2}} \quad (3)$$

donde:  $Y_t$  = es la fuerza impulsora reducida;  $X_0^w$  = es la humedad de la muestra impregnada en g agua/g sólido seco;  $X_t^w$  = es la humedad de la muestra a tiempo t en g agua/ g sólido seco;  $X_\infty^w$  = es la humedad de la muestra en equilibrio con la corriente de aire en g agua/g sólido seco;  $D_e$  = es la difusividad efectiva en  $m^2/s$ ; t = es el tiempo de tratamiento en s y l es el semiespesor de la muestra en m.

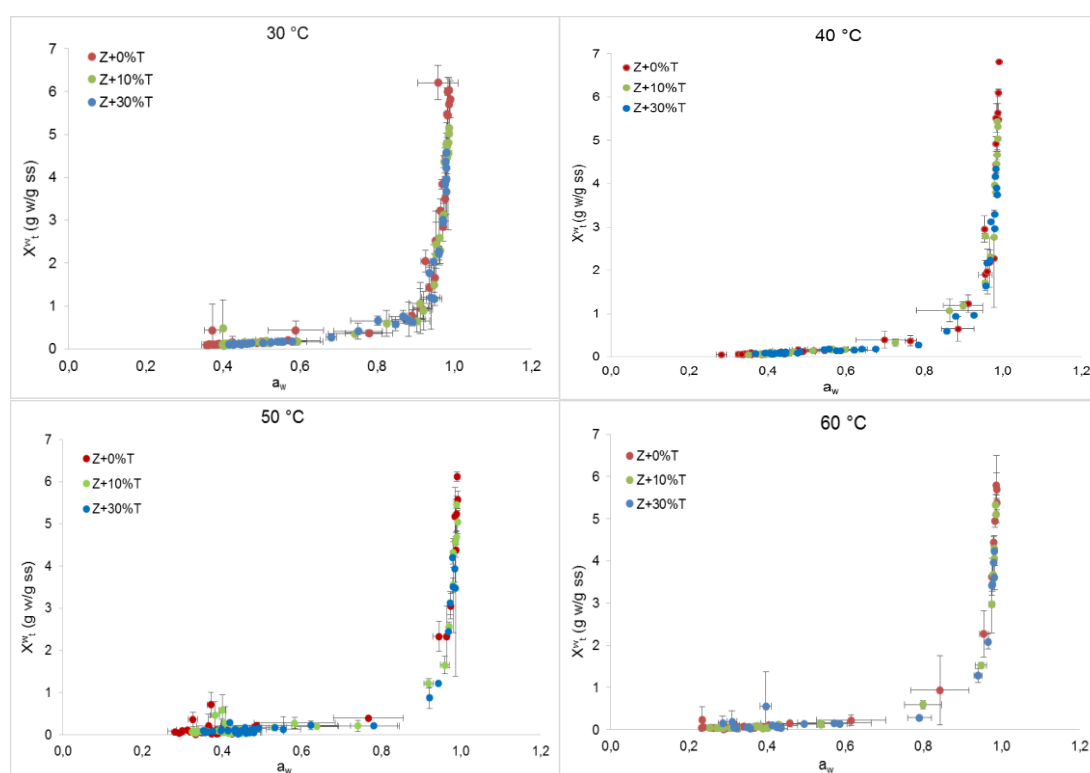
Como se puede observar, el descenso en el contenido en agua de las muestras se vio afectado tanto por el contenido en trehalosa de la disolución de impregnación, como por la temperatura de secado, siendo más evidente el efecto de este último factor. Por un lado, el aumento en la concentración de trehalosa desde un 10 hasta un 30% provocó un descenso significativo en los valores del coeficiente de difusión efectiva (p-valor < 0,05), mientras que la incorporación de un 10% de trehalosa en el líquido de impregnación no produjo efecto alguno sobre este parámetro. Para explicar estos resultados deberíamos tener en cuenta que las muestras impregnadas con la disolución más concentrada en trehalosa presentan una actividad del agua ligeramente inferior ( $0,984 \pm 0,002$ ) a la de las muestras impregnadas con las disoluciones Z+10%T ( $0,9862 \pm 0,0006$ ) y Z+0%T ( $0,9900 \pm 0,0008$ ), lo que implica que el agua esté ligeramente más fuertemente retenida por estas estructuras. Por otro lado, el aumento en la temperatura del aire de secado supuso en todos los casos, como consecuencia del mayor gradiente de actividad del agua existente entre la fase aire y la fase alimento, un aumento significativo (p-valor < 0,005) en los valores de  $D_e$ .

**TABLA 2.** Valores medios del coeficiente de difusión efectiva ( $D_e$  en  $m^2/s$ ).

DISOLUCIÓN	T (°C)	$D_e$ ( $m^2/s, \cdot 10^{10}$ )	$r^2$
Z+0%T	30	$0,7 \pm 0,03$	0,947
	40	$1,49 \pm 0,11$	0,932
	50	$1,87 \pm 0,13$	0,915
	60	$3,0 \pm 0,4$	0,961
Z+10%T	30	$0,617 \pm 0,006$	0,920
	40	$1,33 \pm 0,04$	0,971
	50	$1,91 \pm 0,04$	0,953
	60	$3,1 \pm 0,2$	0,945
Z+30%T	30	$0,59 \pm 0,02$	0,876
	40	$1,31 \pm 0,03$	0,944
	50	$1,77 \pm 0,03$	0,920
	60	$2,76 \pm 0,11$	0,855

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

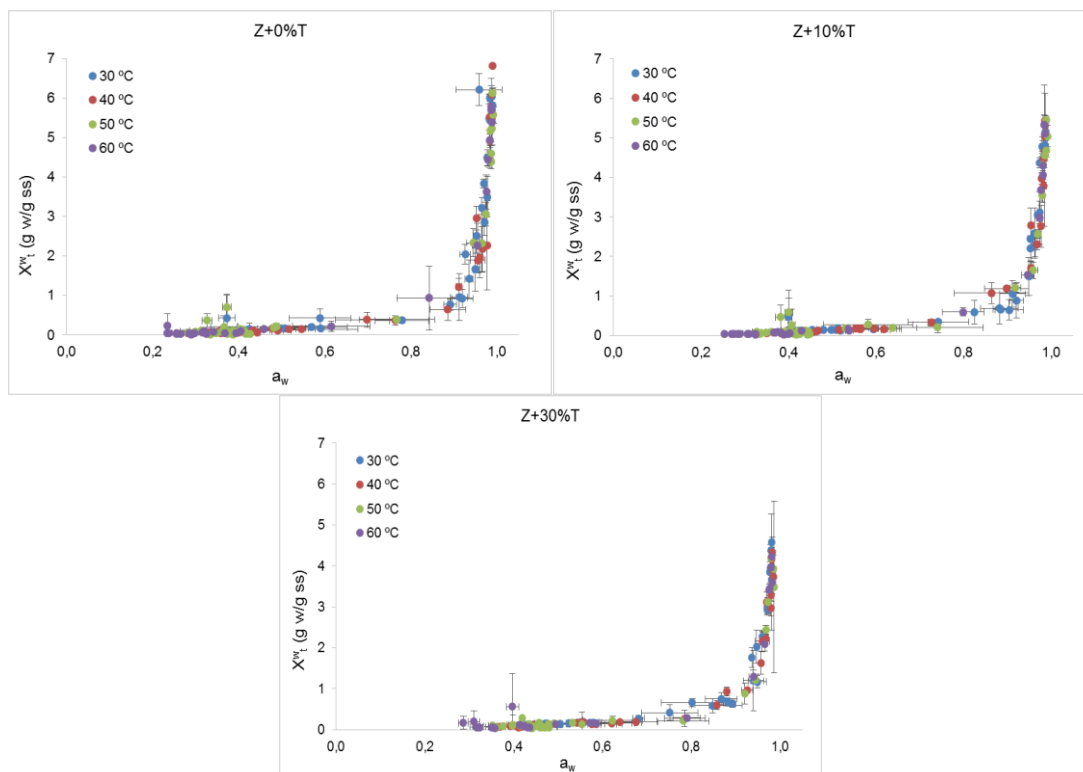
A partir de los valores de humedad y actividad del agua medidas a diferentes tiempos a lo largo del proceso de secado se han obtenido, para las diferentes temperaturas ensayadas, las isothermas de desorción de láminas de manzana impregnadas con diferentes concentraciones de trehalosa (figuras 3 y 4). De acuerdo a la forma de las curvas, se puede afirmar que las isothermas de desorción obtenidas son del tipo III (Brunauer et al., 1940), típica de frutas ricas en azúcares de bajo peso molecular. Estas isothermas se caracterizan por presentar dos tramos: uno, para valores de actividad del agua elevados ( $a_w > 0,85$ ), en el que un descenso importante en la humedad absoluta implica pequeñas variaciones en la actividad del agua del alimento, y otro, para valores de actividad del agua menores, en el que pequeños cambios en la humedad absoluta implica grandes cambios en la actividad del agua del mismo.



**FIGURA 3.** Efecto de la concentración de trehalosa sobre las isothermas de desorción de láminas de manzana obtenidas a diferentes temperaturas.

Respecto al efecto de las variables de proceso consideradas, comentar que ni la temperatura de secado ni la cantidad de trehalosa incorporada en la matriz celular de las manzanas durante la etapa de impregnación a vacío afectaron notablemente a la forma de estas curvas. Cabe resaltar el hecho de que a la temperatura de 30 °C, como consecuencia del menor descenso que se produce en la humedad relativa del aire ambiente, resulta prácticamente imposible alcanzar valores de actividad del agua en torno a 0,3. Teniendo en cuenta que, según estudios previos (Vesterlund et al., 2012; Villamizar et al., 2013), la supervivencia celular de un probiótico se ve afectada cuando la matriz del alimento que lo contiene tiene una actividad del agua por encima de este valor, para la obtención de un snack probiótico

serían recomendables temperaturas de secado por encima de 30 °C. Incluso a 40 y 50 °C, la presencia de altas concentraciones de trehalosa (Z+30%T) en la disolución de impregnación impide alcanzar estos valores de actividad del agua tan bajos. Este efecto de la trehalosa sobre el descenso en la actividad del agua de las muestras se mantiene durante su secado a 60 °C.



**FIGURA 4.** Efecto de la temperatura sobre las isotermas de desorción de láminas de manzana impregnadas con diferentes concentraciones de trehalosa.

A continuación, los datos experimentales se han ajustado a diferentes modelos matemáticos (tabla 3) con la finalidad de obtener ecuaciones sencillas que permitan predecir, para las diferentes condiciones de proceso ensayadas, el descenso de humedad necesario para alcanzar un determinado valor de actividad del agua. Estos cinco modelos fueron seleccionados por su amplia utilización en diversos materiales biológicos (Blahovec, 2004; Chirife e Iglesias, 1978; Kaymak-Ertekin y Gedik, 2004; Lahsasni et al., 2004; Martínez-Navarrete et al., 2000).

**TABLA 3.** Modelos de isotermas empleados para predecir la humedad de equilibrio en función de la actividad del agua.

MODELO	ECUACIÓN	PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS
<b>BET</b>	$X^w = \frac{X_{w0} \cdot C \cdot a_w}{(1 - a_w)(1 + (C - 1) \cdot a_w)}$	$X_{w0}$ es la humedad del producto (base seca) correspondiente a una capa monomolecular de agua adsorbida; C es la constante característica del material relacionada con el calor desprendido en el proceso de sorción (Brunauer et al., 1938).
<b>OSWIN</b>	$X^w = n \left( \frac{a_w}{1 - a_w} \right)^K$	K y n son constantes empíricas características del material (Oswin, 1946).
<b>HENDERSON</b>	$X^w = 0,01 \left( \frac{-\log(1 - a_w)}{10^f} \right)^{1/n}$	K y n son parámetros característicos del producto (Henderson, 1952).
<b>CAURIE</b>	$X^w = \exp \left( a_w \cdot \ln(r) \frac{1}{4,5 \cdot X_{ws}} \right)$	r es una constante característica del material y $X_{ws}$ es el contenido en humedad de seguridad (base seca) que proporciona máxima estabilidad al alimento durante su almacenamiento (Caurie, 1970).
<b>GAB</b>	$X^w = \frac{X_{w0} \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w)(1 + (C - 1)K \cdot a_w)}$	$X_{w0}$ es la humedad del producto (base seca) correspondiente a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua; C es una constante característica relacionada con el calor de adsorción de la monocapa y K es un factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa (Van den Berg y Bruin, 1981).

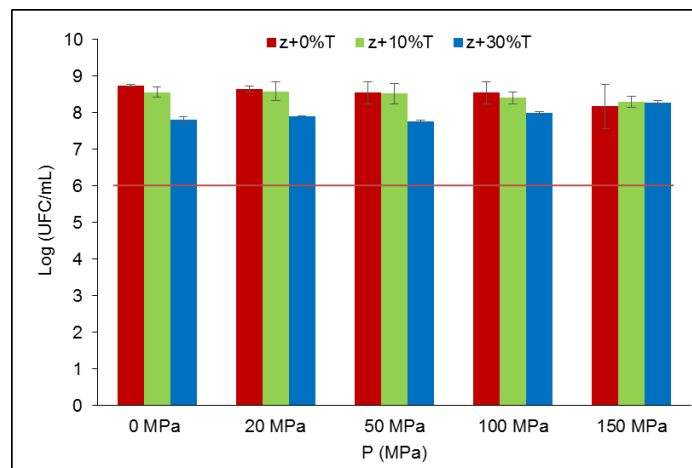
Los parámetros característicos de cada uno de los modelos, así como los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y la suma de los errores cuadrados (SSE) obtenidos en cada caso se muestran en la tabla 4. De acuerdo a estos últimos valores, los modelos de Oswin y Henderson son los que mejor se ajustaron a los datos experimentales. Por su parte, los modelos de BET y Caurie también mostraron una buena correspondencia entre los valores experimentales y los teóricos. Sin embargo, el modelo de GAB resultó en valores de coeficientes de correlación muy bajos y, por lo tanto, en sumas de errores cuadrados muy elevadas.

**TABLA 4.** Parámetros característicos de los modelos empleados para describir las isotermas de desorción de láminas de manzana impregnadas con zumo de mandarina y diferentes concentraciones de trehalosa.

Modelos	Parámetros	Temperatura (°C)											
		30			40			50			60		
		Z+0%T	Z+10%T	Z+30%T	Z+0%T	Z+10%T	Z+30%T	Z+0%T	Z+10%T	Z+30%T	Z+0%T	Z+10%T	Z+30%T
<b>BET</b>	<b>C</b>	6,8256	7,3797	4,4964	2,0599	2,1212	2,6498	1,7053	2,6167	1,7847	1,3117	1,2991	2,0894
	<b>X<sub>wo</sub></b>	0,0908	0,0843	0,0859	0,0791	0,0811	0,0740	0,0673	0,0645	0,0694	0,0882	0,0826	0,0758
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,5412	0,6511	0,6641	0,3312	0,3347	0,5458	0,0294	0,1453	0,0628	0,0298	0,0444	0,2134
	<b>SSE</b>	1,0489	0,2672	0,0476	0,2498	0,1651	0,0912	0,3749	0,2854	0,1578	0,2109	0,0495	0,0379
<b>OSWIN</b>	<b>K</b>	0,1765	0,1794	0,1401	0,1141	0,1164	0,1102	0,1239	0,1200	0,1036	0,1175	0,1009	0,1230
	<b>n</b>	0,8267	0,7885	0,8621	0,9061	0,9046	0,8910	0,8534	0,8446	0,8983	0,9215	0,9461	0,8657
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9566	0,9622	0,9913	0,983	0,9843	0,9896	0,8272	0,854	0,909	0,9348	0,9739	0,8876
	<b>SSE</b>	0,6860	0,1370	0,0451	0,1671	0,1016	0,0626	0,2080	0,1467	0,1376	0,1132	0,0324	0,0438
<b>HENDERSON</b>	<b>n</b>	0,5489	0,5003	0,5373	0,5187	0,5116	0,5226	0,4589	0,4705	0,4778	0,5127	0,5157	0,5071
	<b>f</b>	-1,2136	-1,0994	-1,1250	-1,1074	-1,0860	-1,0712	-1,0676	-1,0481	-1,0182	-1,1546	-1,1084	-1,1094
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9382	0,934	0,9738	0,9781	0,9869	0,9772	0,8211	0,8396	0,8917	0,9265	0,969	0,8603
	<b>SSE</b>	0,5327	0,2151	0,1803	0,2962	0,0977	0,0873	2,9135	0,8217	0,1697	0,1355	0,0644	0,1845
<b>CAURIE</b>	<b>r</b>	5,7471	5,4858	6,0221	6,4805	6,6529	6,2905	6,3260	6,1992	6,3438	6,3813	6,5272	5,7466
	<b>X<sub>ws</sub></b>	0,0498	0,0508	0,0445	0,0429	0,0415	0,0420	0,0454	0,0445	0,0421	0,0453	0,0428	0,0471
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9015	0,8842	0,9324	0,9554	0,97	0,9464	0,8124	0,8189	0,8693	0,9241	0,9612	0,8429
	<b>SSE</b>	1,5250	1,0563	0,6143	1,1018	0,4536	0,3625	0,3931	0,4863	0,3890	0,4082	0,3604	0,3606
<b>GAB</b>	<b>C</b>	1,5895	1,2841	1,3919	0,6582	0,4321	1,4304	1,1586	1,1051	1,1426	1,6229	1,2028	1,1861
	<b>K</b>	1,0078	-3,5192	0,9825	0,9798	0,9680	0,9919	-6,4047	-9,6446	-7,1096	1,0152	1,0072	-5,4440
	<b>X<sub>wo</sub></b>	-0,1140	-0,0907	0,1242	0,1538	0,2108	0,0937	-0,0406	-0,0465	-0,0462	0,0754	0,0851	-0,0528
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,8685	0,8492	0,9856	0,8721	0,8972	0,9287	0,2036	0,37	0,3947	0,4675	0,6313	0,5298
	<b>SSE</b>	0,5864	0,1439	0,1870	0,3546	0,1445	0,0525	120,6297	237401,6515	3586,5004	259,785	4,6946	3,0153

## Efecto de trehalosa y de la presión de homogeneización sobre el crecimiento de *L. salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina

Para evaluar el efecto combinado de la cantidad de trehalosa presente en el zumo y de la presión de homogeneización sobre el crecimiento microbiano los zumos de mandarina, con y sin trehalosa, ajustados hasta pH 6 e inoculados con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, se sometieron a un tratamiento de homogeneización a 20, 50, 100 y 150 MPa. Transcurrido este proceso, se analizó el contenido microbiano de los diferentes zumos mediante la técnica de dilución seriada, siembra en placa y recuento. Los resultados, expresados en log UFC/mL, se muestran en la figura 5.

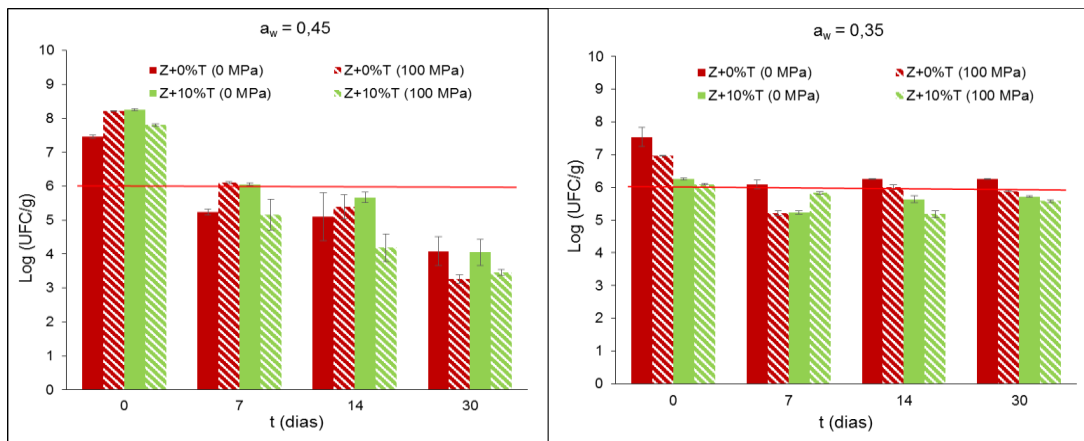


**FIGURA 5.** Efecto de la presión de homogeneización sobre el crecimiento microbiano de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Como se puede observar, todos los zumos presentaron concentraciones del microorganismo superiores a  $10^6$  UFC/mL, que es el límite que establece la International Dairy Federation (1992) para poder afirmar que un alimento tiene carácter probiótico. En relación al efecto de las variables de proceso, el análisis estadístico reveló, con un nivel de confianza del 95%, que la presión de homogeneización apenas afectó la viabilidad del probiótico, mientras que ésta se vio significativamente mermada en presencia de concentraciones elevadas de trehalosa (Z+30%T). Probablemente, la menor actividad del agua alcanzada por la disolución en este caso favoreció situaciones de estrés osmótico que limitaron la proliferación del microorganismo probiótico. Sin embargo, cuando se aplicaron tratamientos de homogeneización más intensos (a 150 MPa), la presencia de trehalosa en cualquiera de los dos niveles ensayados redujo significativamente ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) el descenso en la población microbiana debido al elevado gradiente de presión aplicado. De esta forma se confirmaría el efecto protector que este disacárido ejerce sobre las estructuras biológicas (Lins et al., 2004).

## Efecto de la trehalosa y de la presión de homogeneización sobre la viabilidad de *L. salivarius* spp. *salivarius* en snacks de manzana

Para llevar a cabo esta parte del trabajo se seleccionaron las condiciones que, de acuerdo con los resultados previos, permitieron alcanzar valores de actividad del agua por debajo de 0,45 y garantizaron los mejores recuentos en el producto impregnado y estabilizado mediante secado por aire caliente. Para ser más precisos, las láminas de manzana se impregnaron con los zumos probióticos Z+0%T y Z+10%T sin homogeneizar y homogeneizados a 100 MPa. A continuación, las muestras impregnadas se secaron con aire a 40 °C hasta valores de actividad del agua en torno a 0,45 y 0,35. Una vez secadas, las muestras se almacenaron durante un mes. En la figura 6 se muestran los resultados de los recuentos realizados a diferentes tiempos a lo largo del almacenamiento.



**FIGURA 6.** Evolución del contenido microbiano durante el almacenamiento de las muestras de manzana deshidratadas a 40 °C hasta una actividad del agua de  $0,44 \pm 0,1$  (izquierda) y  $0,33 \pm 0,1$  (derecha).

Como se puede observar, las muestras que tras el secado alcanzaron valores de actividad del agua más bajos ( $a_w \approx 0,35$ ) presentaron menores recuentos al inicio del almacenamiento ( $t = 0$  días), lo que se podría explicar en función del mayor tiempo de exposición a la corriente de aire caliente necesario en estos casos. Sin embargo, la población microbiana permaneció más estable durante el almacenamiento y en concentraciones próximas a  $10^6$  UFC/g cuanto menor fue la actividad del agua las muestras tras el secado. Estos resultados confirman que la actividad del agua alcanzada por el snack durante el secado convectivo ejerce un papel decisivo en la supervivencia del microorganismo durante su posterior almacenamiento. Incluso el efecto de la trehalosa y de la homogeneización sobre la población microbiana resultó variable en función de la actividad del agua de las muestras. En general, durante el almacenamiento de las muestras con una actividad del agua en torno a 0,45, los mayores recuentos se obtuvieron para las muestras impregnadas con el zumo sin homogeneizar que contenía un 10% de trehalosa en peso (Z+10%T y 0 MPa) y con el zumo homogeneizado que no incluía trehalosa en su composición (Z+0%T y 100 MPa). La combinación de los dos factores (Z+10%T y 100 MPa) resultó en este caso



poco favorable para la supervivencia del probiótico durante el almacenamiento del snack. Por lo que respecta al almacenamiento de las muestras con una actividad del agua en torno a 0,35, los mayores recuentos se obtuvieron para las muestras impregnadas con el zumo de mandarina que no contenía trehalosa ni había sido homogeneizado (Z+0%T y 0 MPa).

## **CONCLUSIONES**

Ante los resultados obtenidos en el presente estudio, la concentración de trehalosa en zumo de mandarina no debería superar el 10% en peso para garantizar un mejor crecimiento del probiótico en el líquido de impregnación, así como una mayor depresión en la actividad del agua durante el secado a 40 °C del producto impregnado. Con respecto a la presión de homogeneización aplicada sobre el líquido de impregnación, sería recomendable no superar los 100 MPa para conseguir menores pérdidas de viabilidad.

Finalmente, a partir de los estudios de almacenamiento se constató el efecto protector que ejercen por separado la trehalosa y la presión de homogeneización sobre la supervivencia de *L. salivarius* spp. *salivarius* durante el almacenamiento de snacks de manzana con una actividad del agua en torno a 0,45. Sin embargo, estos tratamientos no mejoran la viabilidad del microorganismo cuando la actividad del agua del snack alcanza valores más bajos en torno a 0,35. Mediante la combinación adecuada de los parámetros trehalosa, presión de homogeneización y actividad del agua sería posible obtener snacks de manzana probióticos como alternativa de los productos lácteos existentes en el mercado, pudiendo ser consumidos por la población con intolerancia a la lactosa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se ha realizado con la financiación concedida por la Generalitat Valenciana para el proyecto GV/2015/066 “MEJORA DE LA CALIDAD FUNCIONAL DE UN SNACK CON EFECTO PROBIÓTICO Y ANTIOXIDANTE MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE TREHALOSA Y LA APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES DE HOMOGENIZACIÓN”.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, por confiar en mí y darme la oportunidad de estudiar un master en esta universidad y en este país. También quisiera dar las gracias a mis tutoras, por sus apoyos y ayuda en este trabajo.

## REFERENCIAS

- A.O.A.C. (1980). Official methods of analysis (13th edition) Washington DC: Association of official analytical chemists.
- Atarés, L., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009). Effect of the impregnated solute on air drying and rehydration of apple slices (cv. Granny Smith). *Journal of Food Engineering*, **91(2)**: 305-310.
- Basson, A., Flemming, L.A., Chenia, H.Y. (2007). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecology*, **55**: 1-14.
- Betoret E., Betoret, N., Carbonell J.V., Fito P. (2009). Effects of pressure homogenization on particle size and functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering*, **92**:18-23.
- Betoret, E., Betoret, N., Arilla, A., Bennár, M., Barrera, C., Codoñer, P., Fito, P. (2012a). 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. (2012b). Homogenization pressures applied to citrus juices manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering*, **111**, 28-33.
- Betoret, E., Betoret, N., Castagnini, J.M., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., Fito, P. (2015). Analysis by non-linear irreversible thermodynamics of compositional and structural changes occurred during air drying of vacuum impregnated apple (cv. *Granny smith*): calcium and trehalose effects. *Journal of Food Engineering*, **147**, 95-101.
- Blahovec, J. (2004). Sorption isotherms of biological origin mathematical and physical approach. *Journal of Food Engineering*, **65(4)**: 489-495.
- Boyer. L. & Liu. R., (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, **3(1)**, 5.
- Brunauer, S.; Deming, L.S., Deming, W.E., Teller, E (1940). On a theory of the van der waals adsorption of gases. *Journal Amer. Chem. Soc.* **62**: 1723-1732.
- Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layer. *Journal of American Chemists Society*, **60**: 309-320.
- Caurie, M. (1970). A new model equation for predicting safe storage moisture levels for optimum stability of dehydrated foods. *Journal of Food Technology*, **5**: 301-307.
- Chirife, J.; Iglesias, H.A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods: part I-a review. *Journal of Food Technology*, **13**:159-174.
- Codoñer-Franch, P., López-Jaén, A.B., Muñiz, P., Sentandreu, E., Valls-Bellés, V. (2008). Mandarin juice improves the antioxidant status of hypercholesterolemic children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **47(3)**: 349-355.
- Codoñer-Franch P., López-Jaén A.B., De La Mano-Hernández, A., Sentandreu, E., Simó-Jordá, R., Valls-Bellés, V. (2010). Oxidative markers in children with severe obesity following low-calorie diets supplemented with mandarin juice. *Acta Pediátrica* **99(12)**, 1841-1846.
- Codoñer-Franch, P., Betoret, E., Betoret, N., López-Jaén, A.B., Valls-Bellés, V. (2013). La ingestión de un producto derivado de manzana deshidratada enriquecido con zumo de mandarina mediante tecnología de impregnación al vacío mejora la capacidad antioxidante y disminuye la inflamación en los niños obesos. *Nutrición Hospitalaria* **28(3)**, 1177-1183.
- Crank, J. (1975). The mathematics of diffusion. London, Oxford University Press, United Kingdom: 44-68.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223(4637)**, 701-703.
- Day, L., Seynour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lumdin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science and Technology*, **20(9)**, 388-395.
- Gómez, P.L., Welti-Chanes, J., Alzamora, S.M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, **2**, 447-465.
- Henderson, S.M. (1952). A basic concept of equilibrium moisture. *Agricultural Engineering*, **33**: 29-32.

- International Dairy Federation (IDF/ FIL), 1992. Physiological and Functional Properties of Probiotics. Bulletin of the International Dairy Federation, **272**: 17-22.
- Kaymak-Ertekin, F. y Gedik, A. (2004). Sorption isotherms and isosteric heat of sorption for grapes, apricots, apples and potatoes. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **37(4)**: 429-438.
- Lahsasni, S.; Kouhila, M.; Mahrouz, M. (2004). Adsorption-desorption isotherms and heat of sorption of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica*). *Energy Conversion and Management*, **45(2)**: 249-261.
- Lins R.D., Pereira, C.S., Hunenberger, P.H. (2004). Trehalose-protein interaccion in aqueous solution. *Proteins* 55, 177-186.
- Martinez-Monzó, J. (1998). Cambios físico-químicos en la manzana "Granny Smith" asociados a la impregnación a vacío. Aplicaciones en congelación. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Martínez-Navarrete, N.; Andrés, A.; Chiralt, A.; Fito, P. (2000). Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Servicio de Publicaciones. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- McCann, M., Gill, C., Brien, G.O., Rao, J., McRoberts, W., Hughes, P.,... Rowland, I. (2007). Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1224-1230.
- Mulet, A., Garcia-Pascual, P., Sanjuán, N., & Garcia-Reverter, J. (2002). Equilibrium isotherms and isosteric heats of morel (*Morchella esculenta*). *Journal of Food Engineering*, 53(1), 75-81.
- Oswin, C.R. (1946). The kinetics of packing life III: the isotherm. *Journal of Chemical Industry*, **65**:419-423.
- Patrignani F., Vannini L., Leroy S., Lanciotti R., Guerzoni M.E. (2009). Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 26–31.
- Sun-Waterhouse, D., Melton, L. D., O'Connor, C.J., Kilmartin, P. A., & Smith, B. G. (2008). Effect of apple cell walls and their extracts on the activity of dietary antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Engineering*, 56(1), 289-295.
- Sun-Waterhouse, D., Farr, J., Wibisono, R., & Saleh, Z. (2008). Fruit-based functional foods: production of food-grade apple fibre ingredients. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(2), 213-2122.
- Tabanelli G., Burns P., Patrignani F., Gardini F., Lanciotti R., Reinheimer J., Vinderola G. (2012). Effect of a non-lethal high pressure homogenization treatment on the in vivo response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology*, 32, 302-307.
- Van den Berg, C.; Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. En: Water activity: influence on food quality (pp. 45-58), Ed. L.B. Rockland y G.E. Stewart. New York, Academic Press.
- Villamizar, D., Betoret, N., Barrera, C., Bettalleluz, I. (2013). Estudio de la estabilidad físicoquímica y funcional de un snack simbiótico a partir de manzana elaborada por impregnación a vacío. Tesis Final del Máster en Gestión y Seguridad Alimentaria. Universidad Politécnica de València.
- Vesterlund, S., Salminen, K., Salminen, S. (2012). Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 319-321.