

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



***EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA Y
LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LAS
PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE ZUMO DE
MANDARINA COMERCIAL INOCULADO CON
LACTOBACILLUS SALIVARIUS spp. SALIVARIUS***

**MÁSTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

ALUMNO:

ANDREA ORTIZ HERRERO

DIRECTORA:

CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS

CODIRECTORA:

NOELIA BETORET VALLS

DIRECTORA EXPERIMENTAL:

LAURA CALABUIG JIMÉNEZ

CENTRO:

Instituto Universitario de Ingeniería de los alimentos para el desarrollo (IUIAD)

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA Y LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE ZUMO DE MANDARINA COMERCIAL INOCULADO CON *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* spp. *SALIVARIUS*

Andrea Ortiz Herrero, Cristina Barrera Pigdollers¹, Noelia Betoret Valls¹

RESUMEN

Ante los inconvenientes que presentan los tratamientos convencionales de procesado de zumos de frutas, surgen alternativas que conservan mejor los compuestos responsables de su funcionalidad y calidad organoléptica, tales como la homogeneización a altas presiones.

Por otra parte, existen ingredientes, tales como la trehalosa, que se podrían incorporar a la formulación de estos zumos para mitigar el efecto negativo de las operaciones de procesado.

En este trabajo se evalúa el efecto de la concentración de trehalosa (desde 0 hasta 30% en peso) y la aplicación de altas presiones de homogeneización (desde 0 hasta 150 MPa) sobre las propiedades antioxidantes (contenido en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS-TEAC) de una bebida probiótica elaborada a partir de zumo de mandarina comercial y *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el efecto protector que la trehalosa ejerce sobre el microorganismo probiótico expuesto a altas presiones de homogeneización. Sin embargo, la presencia de trehalosa aumenta el daño por estrés osmótico lo que, pese a reducir el carácter probiótico del producto final, aumenta su contenido en fenoles y flavonoides totales.

Palabras clave: homogeneización, trehalosa, antioxidante, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

RESUM

Davant els inconvenients que presenten els tractaments convencionals de processat de suc de fruites, sorgeixen alternatives que conserven millor els compostos responsables de la seua funcionalitat i qualitat organolèptica, tals com l'homogeneïtzació a altes pressions.

D'altra banda, existeixen ingredients, tals com la trehalosa, que es podrien incorporar a la formulació d'aquests suc per a mitigar l'efecte negatiu de les operacions de processament.

En aquest treball s'avalua l'efecte de la concentració de trehalosa (des de 0 fins a 30% en pes) i l'aplicació d'altres pressions d'homogeneïtzació (des de

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

0 fins a 150 MPa) sobre les propietats antioxidants (contingut en fenols totals, flavonoides totals i activitat antioxidant pels mètodes DPPH i ABTS-TEAC) d'una beguda probiòtica elaborada a partir de suc de mandarina comercial i *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Els resultats obtinguts posen de manifest l'efecte protector que la trehalosa exerceix sobre el microorganisme probiòtic exposat a altes pressions d'homogeneïtzació. No obstant açò, la presència de trehalosa augmenta el dany per estrès osmòtic el que, malgrat reduir el caràcter probiòtic del producte final, augmenta el seu contingut en fenols i flavonoides totals.

Paraules clau: homogeneïtzació, trehalosa, antioxidant, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

ABSTRACT

Given the drawbacks of conventional treatments of processed fruit juice, alternatives arise that preserves much better the compounds responsible for functionality and organoleptic quality, such as homogenization at high pressures.

Moreover, there are ingredients such as trehalose, which could be incorporated into the formulation of these juices to mitigate the negative effect of processing operations.

In this study the effect of trehalose concentration is evaluated (0 to 30% by weight) and applying high pressure homogenization (from 0 to 150 MPa) on the antioxidant properties (content of total phenols, total flavonoids and activity antioxidant by DPPH and ABTS-TEAC methods) of a probiotic drink made from commercial tangerine juice and *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

The results obtained show the protective effect that the trehalose exerts on the probiotic organism exposed to high pressure homogenization. However, the presence of trehalose increases the osmotic stress damage which, although it reduced the probiotic character of the end product, increases its phenolic total content and flavonoids.

Key words: homogenization, trehalose, antioxidant, *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius*.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha aumentado la variedad de productos alimenticios en el mercado, al mismo tiempo que el consumidor se ha vuelto más exigente a la hora de escoger un alimento para su consumo. En concreto, ha aumentado la demanda de alimentos funcionales, ricos en determinados compuestos a los que se atribuye propiedades beneficiosas para la mejora del estado de bienestar y salud, o la reducción del riesgo de padecer una enfermedad (Roberfroid, 2002). En esta categoría de alimentos se incluyen 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.

Los compuestos antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar los radicales libres formados por compuestos oxidantes (Chen et al., 2012), ya sean de origen endógeno (resultado de reacciones metabólicas) o de origen exógeno (resultado de la exposición a radiación UV o contaminantes externos). Por lo general, el ser humano tiene mecanismos de defensa natural para neutralizar estos radicales libres, pero pueden no ser suficientes y provocar estrés oxidativo. Es entonces cuando aumenta el riesgo de que se induzcan alteraciones en determinadas estructuras macromoleculares, tales como DNA, proteínas o lípidos, que deriven en el desarrollo de carcinogénesis. De acuerdo con esto, la ingesta de compuestos con efecto antioxidante a través de la dieta proporcionaría una protección adicional frente al estrés oxidativo (Reeve et al., 2010). De entre los zumos de frutas, el de mandarina es uno de los más ricos en compuestos antioxidantes, destacando por su elevado contenido en vitamina C, carotenoides y polifenoles, principalmente hesperidina y narirutina (Codoñer-Franch et al., 2008; Kelebek y Selli, 2011). Además, el zumo de mandarina resulta un sustrato adecuado para el crecimiento de microorganismos con efecto probiótico, tales como *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (Betoret et al., 2012).

Se denominan probióticos a aquellos microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas ($> 10^9$ UFC/día), aportan un beneficio para la salud del huésped (Messouadi et al., 2013). En concreto, la presencia de *L. salivarius* spp. *salivarius* disminuye la viabilidad de *Helicobacter pylori* en el tracto gastrointestinal, contribuyendo a reducir la aparición de gastritis e incluso la incidencia de cáncer gástrico (Hsieh et al., 2012; Ryan et al., 2007).

Aunque uno de los requisitos que deben reunir los microorganismos probióticos para ser incluidos en los alimentos es que han de resistir las condiciones de procesado y almacenamiento industrial, lo cierto es que todas las operaciones unitarias a las que es sometido un alimento probiótico afectan en mayor o menor medida a la concentración microbiana inicial. Teniendo en cuenta que la trehalosa es un disacárido no reductor de D-Glucosa que abunda en hongos, insectos y plantas, en los que realiza una función protectora frente al estrés causado por la escasez de agua, la elevada concentración de sal o la exposición a altas temperaturas (Li et al.,

2010; McBride y Ensing, 1987; Newman et al., 1993; Sugawara et al., 2010), su incorporación a los alimentos podría favorecer la resistencia de los probióticos a las operaciones típicas del procesado de alimentos. Efectivamente, las cepas de *Lactococcus lactis* productoras de trehalosa resultan significativamente más resistentes frente a situaciones de estrés ácido y shock frío (Carvalho et al., 2011). Además, la adición de trehalosa previamente a la liofilización de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* aumenta notablemente la supervivencia de este microorganismo inmediatamente después del proceso y durante su posterior almacenamiento (Zayed y Roos, 2004). En relación con otras propiedades funcionales de los alimentos, la aplicación de trehalosa también produce un aumento en el contenido en antocianinas de fresas liofilizadas (Kopjar et al., 2008).

Otro aspecto que el consumidor considera importante a la hora de escoger un alimento es su calidad organoléptica. Esto cobra gran importancia en el caso de los zumos, puesto que contienen una gran cantidad de compuestos termolábiles que forman parte de su perfil organoléptico. Es por ello que aumenta el interés por desarrollar nuevas tecnologías como alternativa a las convencionales (pasteurización), que sean más respetuosas con el producto, tanto en términos de funcionalidad como de calidad organoléptica (Gómez et al., 2011). Entre ellas, la homogeneización por altas presiones se considera una tecnología no térmica (aunque la temperatura aumenta por la fricción del orden de 1 °C/MPa) que preserva mejor los componentes antioxidantes del zumo en comparación con las tecnologías térmicas convencionales (Patrignani et al., 2013). Esta técnica, que es muy empleada en la industria láctea para reducir el tamaño de los glóbulos de grasa (Paquin, 1999) y en la industria de fabricación de zumos para disminuir el tamaño de las partículas de celulosa en jugos pulposos (Thakur et al., 1995), puede aumentar la supervivencia de cepas con efecto probiótico y mejorar sus propiedades funcionales. Esto quedó demostrado en ensayos llevados a cabo con cepas de *Lactobacillus paracasei* A13, en los que la aplicación de altas presiones de homogeneización aumentó su hidrofobicidad, directamente relacionada con su capacidad de adhesión a las células intestinales y su resistencia al proceso de digestión (Basson et al., 2007; Tabanelli et al., 2012).

Por todo lo comentado anteriormente, el presente estudio se plantea con el objeto de evaluar el efecto que la concentración de trehalosa y la aplicación de altas presiones de homogeneización ejercen sobre las propiedades antioxidantes (contenido en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS) y microbianas del zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materias primas

Para llevar a cabo este estudio se utilizó zumo de mandarina comercial (marca Consum), trehalosa de grado alimentario obtenida a partir de almidón de tapioca (Trehatm, Cargill Ibérica, Barcelona, España) y la cepa probiótica CECT 4063 de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia).

2.2. Preparación del zumo probiótico

El primer paso para elaborar un zumo de mandarina con efecto probiótico consistió en mezclar el zumo comercial con diferentes cantidades de trehalosa, desde 0 hasta 30 g por 100 g de zumo. A continuación, se corrigió el pH añadiendo bicarbonato de sodio (unos 10 g/L). Una vez alcanzado un valor de pH en torno a 6, se tomó una alícuota equivalente a un 20% del volumen total de zumo y se enriqueció con 5 g/L de proteína (levadura fresca de panadería). Para evitar la competencia con el microorganismo probiótico, este volumen de zumo se esterilizó en un autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez enfriado, se mezcló con el zumo restante, se inoculó con 4 mL/L de medio MRS con un contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* del orden de 10^9 UFC/mL y se incubó en estufa a 37 °C durante 24 horas.

2.3. Proceso de homogeneización

Una vez incubado, el zumo se enfrió hasta temperatura ambiente y se homogeneizó a diferentes presiones (0, 20, 50, 100 y 150 MPa) en un equipo de altas presiones a escala de laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia).

2.4. Determinación de propiedades antioxidantes

Los diferentes zumos probióticos se analizaron, antes y después de la etapa de homogeneización, en términos de contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS-TEAC. Todas las determinaciones descritas en este apartado se realizaron, al menos, por triplicado.

CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

El contenido en fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999; Wolfe et al., 2003) basado en la medida a 760 nm de la intensidad de coloración azul que se genera por reacción del reactivo de Folin Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Para ello se mezclaron en un cubeta de espectrofotometría 500 µL del

reactivo de Folin-Ciocalteu en una concentración 1 N y 1 mL de muestra diluida en agua en una proporción 1:20 (v/v). Tras 5 min en reposo, se adicionaron 2,5 mL de carbonato de sodio al 7,5% (m/v). Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 35 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de ácido gálico y se expresaron en mg equivalente de ácido gálico por mililitro de muestra (mg EAG/mL).

CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES

El contenido en flavonoides totales se determinó mediante el método colorimétrico propuesto por Luximon-Ramma et al., (2005). Para ello se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 1,5 mL de muestra diluida en agua en una proporción 1:5 (v/v) y 1,5 mL de una disolución de cloruro de aluminio al 2% (m/v) en metanol. Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 10 min se midió la absorbancia a una longitud de onda de 368 nm en un Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de quercetina y se expresaron en mg equivalentes de quercetina por mililitro de muestra (mg EQ/mL)

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Este método se basa en medir el cambio de coloración que experimenta una disolución del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) que, tras secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra, se reduce y pasa de ser morada a tener un color amarillo (Brand-Williams et al., 1995; Molyneux, 2004). Para ello se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 100 µL de muestra diluida en agua en una proporción 1:2 (v/v) y 2900 µL de una disolución de DPPH 100 µM. Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 30 min se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de DPPH y, por diferencia entre la cantidad de DPPH introducida inicialmente en la cubeta y la residual, se expresaron en mg de DPPH reducido por mL de muestra (mg DPPH_{red}/mL).

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS-TEAC

Este método se basa en medir la decoloración que experimenta el catión ABTS que, tras secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra, se reduce y pasa de un color verde-azulado a incoloro. Para generar el catión ABTS se preparó una disolución 7 mM de ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) y 2,45 mM de persulfato potásico que se incubó en oscuridad durante 16 horas. Una vez liberado el radical, se

diluyó en tampón fosfato hasta conseguir una absorbancia de $0,7 \pm 0,01$ a 734 nm (Re et al., 1999). A continuación, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 2900 μ L de la disolución de trabajo y 100 μ L de muestra diluida en agua en una proporción 1:20 (v/v). Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 6 min se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de trólox y se expresaron en μ M equivalentes de trólox por mL de muestra (μ M ET/mL).

2.5. Determinaciones microbiológicas

El contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius* se determinó en los diferentes zumos por el procedimiento de dilución seriada en agua de peptona estéril y posterior siembra en placa. Dado que el crecimiento observado en condiciones de microaerofilia no mejoraba notablemente, a pesar de tratarse de un microorganismo anaerobio facultativo, la siembra se realizó en la superficie de placas Petri con agar MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), que se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis.

2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa informático Statgraphics Centurion XVI. Básicamente se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) multifactoriales con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05) y un nivel de interacción máximo de orden dos para evaluar el efecto de cada uno de los dos factores considerados (concentración de trehalosa y presión de homogeneización) sobre la variable respuesta.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de la incorporación de trehalosa y la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina comercial

En la Figura 1 se muestran los resultados correspondientes al crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina en función de la concentración de trehalosa (desde 0 hasta 30% en peso) y de la presión de homogeneización (desde 0 hasta 150 MPa). En todos los casos, los zumos fueron inoculados con 4 mL/L de caldo MRS con un contenido microbiano en torno a $1,70 \times 10^9$ UFC/mL.

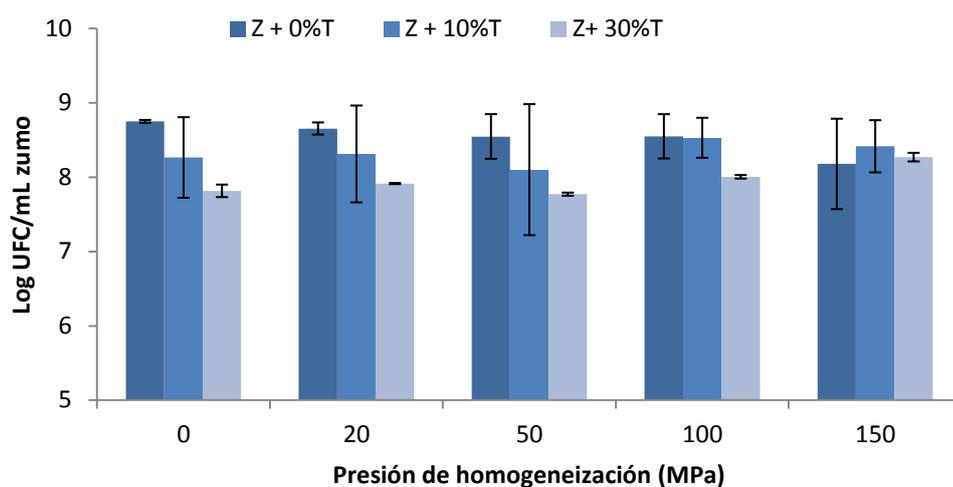


Figura 1. Efecto de la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización sobre el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina comercial.

Como se puede observar, el recuento de viables en el zumo tras aplicar presiones de homogeneización por debajo de 100 MPa disminuyó con la concentración de trehalosa. Probablemente, al aumentar el contenido en solutos del zumo disminuyó su actividad del agua, alejándose su valor del óptimo para el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas. Sin embargo, la adición de trehalosa al zumo de mandarina aumentó la supervivencia del probiótico tras aplicar una presión de homogeneización de 100-150 MPa, lo que pondría de manifiesto el papel protector que desempeña este disacárido frente a condiciones adversas, debidas en este caso al gradiente de presión. En cualquier caso, todos los recuentos obtenidos superaron el valor de 10^6 UFC/mL, que es la concentración microbiana mínima establecida por la International Dairy Federation (IDF, 1992) para que las bacterias puedan ejercer su efecto probiótico.

3.2. Efecto de la incorporación de trehalosa y la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre las propiedades antioxidantes del zumo de mandarina comercial inoculado o no con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*

CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

En primer lugar, en la Figura 2 se muestra el efecto que la concentración de trehalosa y el crecimiento microbiano ejercen sobre el contenido fenólico del zumo de mandarina comercial. Dada la inevitable dilución que los compuestos fenólicos del zumo experimentan al incorporar trehalosa, los resultados se han expresado en mg equivalentes de ácido gálico por mL de zumo equivalente a zumo exento de este disacárido (mg EAG/mL E zumo sin T).

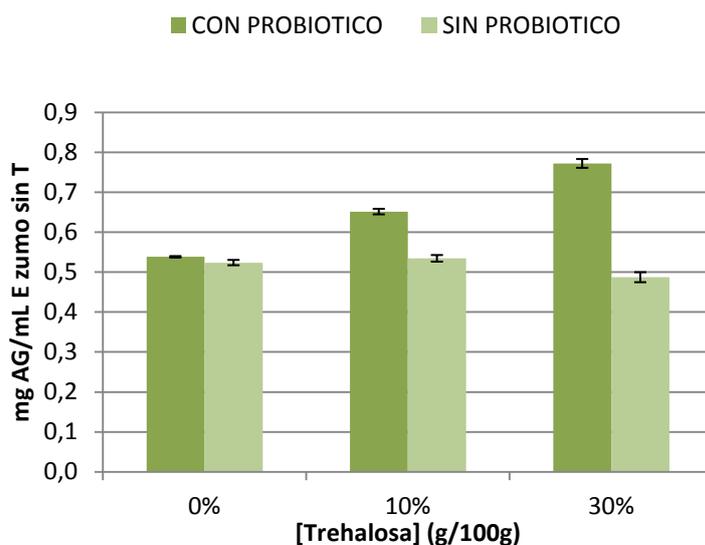


Figura 2. Contenido en fenoles totales en zumo de mandarina comercial en función de la concentración de trehalosa y la presencia de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Como se puede observar, el contenido fenólico del zumo se vio influenciado tanto por la concentración de trehalosa como por la presencia del probiótico. Además, el efecto de cada una de las dos variables consideradas se vio afectado por el nivel que presentaba la otra variable. Los valores obtenidos para el zumo de mandarina comercial sin trehalosa y sin probiótico resultaron similares a los obtenidos por otros autores (Picard, 2015) en el zumo natural.

En general, la inoculación y posterior incubación del zumo con *L. salivarius* spp. *salivarius* aumentó el contenido en fenoles totales del mismo, siendo este efecto más evidente a medida que aumenta la cantidad de trehalosa incorporada. Similares resultados fueron obtenidos por Hole et al. (2012) en un estudio llevado a cabo en granos de cereales, cuyo contenido en compuestos fenólicos aumentó tras la fermentación con diferentes cepas del género *Lactobacillus*. Según apuntan estos autores, la presencia de determinadas bacterias ácido-lácticas favorece la liberación de ácidos fenólicos, aumentando su biodisponibilidad y su detección por medio de técnicas espectrofotométricas.

Por lo que respecta a la concentración de trehalosa, ésta no produjo efecto alguno sobre el contenido en fenoles totales del zumo sin inocular, mientras que aumentó significativamente el del zumo inoculado. Este efecto sería contrario al comentado anteriormente si se tiene en cuenta que el aumento en la concentración de trehalosa en el zumo aumenta el estrés osmótico y disminuye, tal y como se muestra en la Figura 1, el número de bacterias vivas presentes en el zumo. Para explicar este comportamiento habría que tener en cuenta otros estudios en los que se ha observado que diferentes cepas del género *Lactobacillus* son capaces de inhibir o consumir los compuestos fenólicos al crecer en alimentos ricos en estos antioxidantes (Rivas-Sendra et al., 2011; Rodríguez et al., 2009).

Por otra parte, en la Figura 3 se muestra el efecto que la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización ejercen sobre el contenido fenólico del zumo de mandarina comercial inoculado e incubado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. Como se ha comentado anteriormente, los resultados se han expresado en mg equivalentes de ácido gálico por mL de zumo equivalente a zumo exento de trehalosa (mg EAG/mL E zumo sin T).

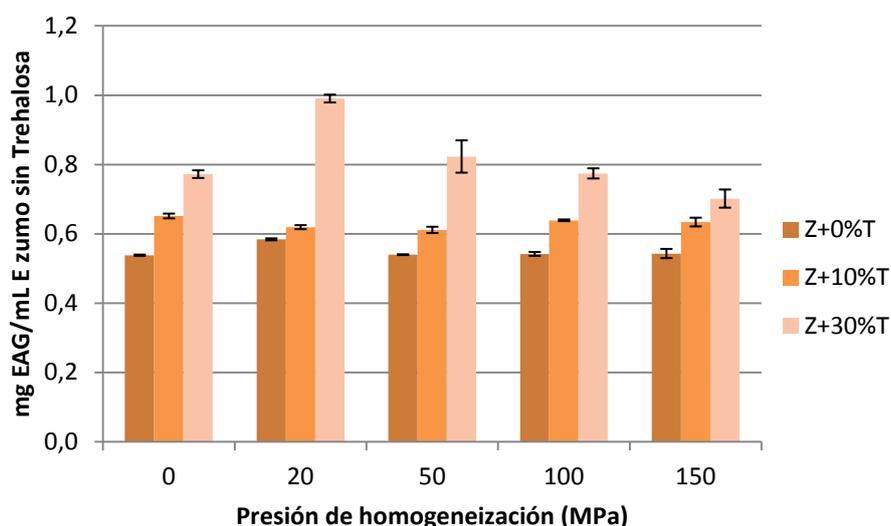


Figura 3. Contenido en fenoles totales en zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en función de la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización.

De nuevo el análisis estadístico de los resultados reveló un efecto significativo (p -valor < 0,05) sobre la variable respuesta, tanto de cada uno de los factores considerados, como de la interacción entre ambos.

Por una parte, el aumento en la concentración de trehalosa en el zumo se tradujo en un mayor contenido en compuestos fenólicos, siendo este efecto menos acusado al aplicar una presión de homogeneización elevada (150 MPa). Este resultado confirma el efecto protector de la trehalosa sobre las estructuras biológicas en condiciones de estrés. En este caso concreto, la trehalosa mejora la supervivencia del probiótico durante la homogeneización a 150 MPa (Figura 1), lo que implicaría un mayor consumo de compuestos fenólicos del zumo.

Respecto al efecto de la presión de homogeneización sobre el contenido en fenoles totales del zumo, éste resultó más evidente en las muestras más concentradas en trehalosa (Z+30%T), en las que el contenido fenólico aumentó con la presión desde 0 hasta 20 MPa, pero disminuyó progresivamente con la presión desde 20 hasta 150 MPa. Comparando estos resultados con los correspondientes al crecimiento microbiano (Figura 1) se comprueba que la disminución en el contenido fenólico a altas presiones (< 20 MPa) coincide con un incremento en el número de células vivas capaces de consumir estos compuestos fenólicos.

CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES

En la Figura 4 se muestra el efecto que la concentración de trehalosa y el crecimiento microbiano ejercen sobre el contenido en flavonoides totales del zumo de mandarina comercial. Los resultados se expresan en mg equivalentes de quercetina por mL de zumo equivalente a zumo exento de trehalosa (mg EAG/mL E zumo sin T).

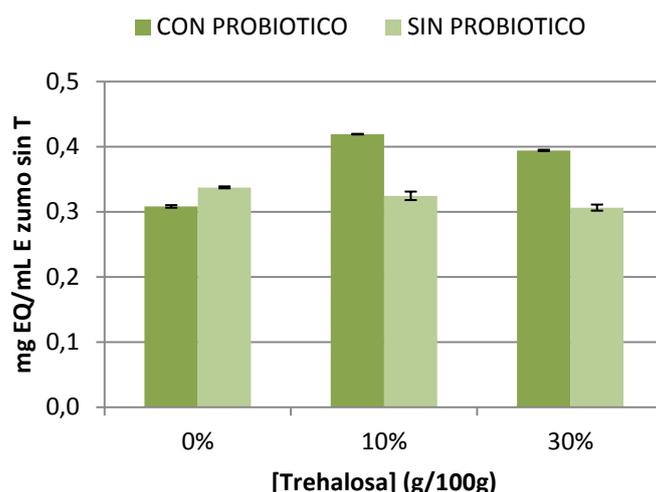


Figura 4. Contenido en flavonoides totales en zumo de mandarina comercial en función de la concentración de trehalosa y la presencia de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

En esta ocasión, el efecto de los factores considerados sobre la variable respuesta no siguió una tendencia tan clara como la comentada anteriormente para el contenido en fenoles totales.

Como se puede observar, el contenido en flavonoides totales únicamente aumentó tras la incubación con el probiótico de los zumos con trehalosa. Esto pondría de manifiesto que la supuesta liberación de flavonoides debida a la fermentación estaría favorecida por la presencia de este disacárido o que en ausencia de trehalosa predomina el consumo de flavonoides frente a su liberación debida a la presencia del probiótico.

Por otra parte, tal y como sucede para el contenido fenólico (Figura 2), el aumento en la concentración de trehalosa produjo en los zumos no inoculados un ligero descenso en el contenido en flavonoides totales. Este fenómeno ha sido constatado por otros autores (Oku et al., 2003; Oku et al., 2005; Picard, 2015) y explicado de acuerdo a la capacidad de la trehalosa para interactuar con los grupos hidroxilo de estos compuestos, impidiendo su reacción con el reactivo empleado en el correspondiente método de determinación.

En la Figura 5 se muestra el efecto que la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización ejercen sobre el contenido en flavonoides del zumo de mandarina comercial inoculado e incubado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. Como se ha comentado anteriormente, los resultados se han expresado en mg equivalentes de quercetina por mL de zumo equivalente a zumo exento de trehalosa (mg EAG/mL E zumo sin T).

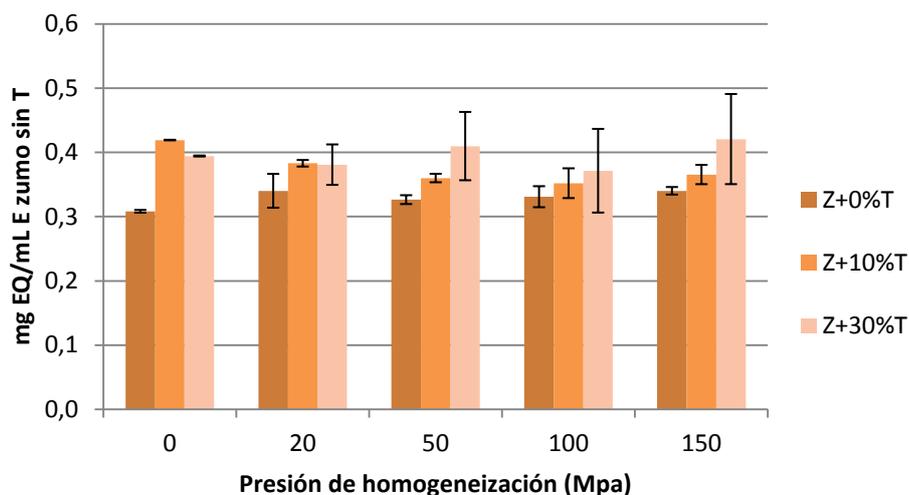


Figura 5. Contenido en flavonoides totales en zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en función de la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización.

En este caso, el análisis estadístico de los resultados reveló que únicamente la concentración de trehalosa produjo un efecto significativo (p -valor $< 0,05$) sobre el contenido en flavonoides totales. Excepto en el zumo sin homogeneizar, el aumento desde 0 hasta 30 g/100 g de zumo en la cantidad de trehalosa añadida implicó un aumento significativo en la cantidad de flavonoides detectados. Esta tendencia resulta similar a la comentada anteriormente para el caso de los compuestos fenólicos, grupo en el que se incluyen los flavonoides.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En primer lugar se muestra el efecto que la concentración de trehalosa y el crecimiento microbiano ejercen sobre la capacidad antioxidante del zumo de mandarina comercial (Figura 6). Los resultados se expresan en mg equivalentes de Trólox por mL equivalente a zumo de mandarina sin trehalosa (mg ET/mL E zumo sin T, en el caso de aplicar el método ABTS-TEAC) y en mg de DPPH reducidos por mL equivalente a zumo de mandarina sin trehalosa (mg DPPH_{red}/mL E zumo sin T, en el caso de aplicar el método DPPH).

Como se puede observar, la capacidad antioxidante medida por el método ABTS-TEAC (Figura 6 a) disminuyó con la adición del probiótico y aumentó con la concentración de trehalosa, no siendo significativa la interacción entre estos dos factores. Por el contrario, la capacidad antioxidante medida por el método DPPH (Figura 6 b) únicamente se vio significativamente afectada por la interacción entre ambos factores. Estos resultados ponen de manifiesto la diferente reactividad que existe entre los compuestos presentes en el zumo y el radical de referencia empleado en cada uno de los diferentes métodos. En el caso concreto de la trehalosa, dado su carácter hidrofílico, es lógico que presente una mayor afinidad por el radical ABTS que por el radical DPPH, menos sensible a antioxidantes

hidrofílicos (Gil et al., 2000). En estudios anteriores (Picard, 2015), se comprobó experimentalmente que este azúcar proporciona cierto porcentaje de inhibición frente al reactivo ABTS. De acuerdo con esto, la mayor capacidad antioxidante medida por el método ABTS-TEAC en los zumos inoculados sería debida a que, por la capacidad de interacción que posee este disacárido con las membranas del microorganismo probiótico (Lins et al., 2004), estaría menos disponible para unirse al radical ABTS. Hay por otra parte estudios *in vivo* que indican que en situaciones de estrés por calor, la trehalosa disminuye el estrés oxidativo al interaccionar ella misma con los radicales libres (Luo et al., 2007). De esta forma se explicaría el mayor aumento observado en la capacidad antioxidante medida en el zumo probiótico por el método ABTS-TEAC conforme aumenta la concentración de solutos y, por tanto, el estrés osmótico.

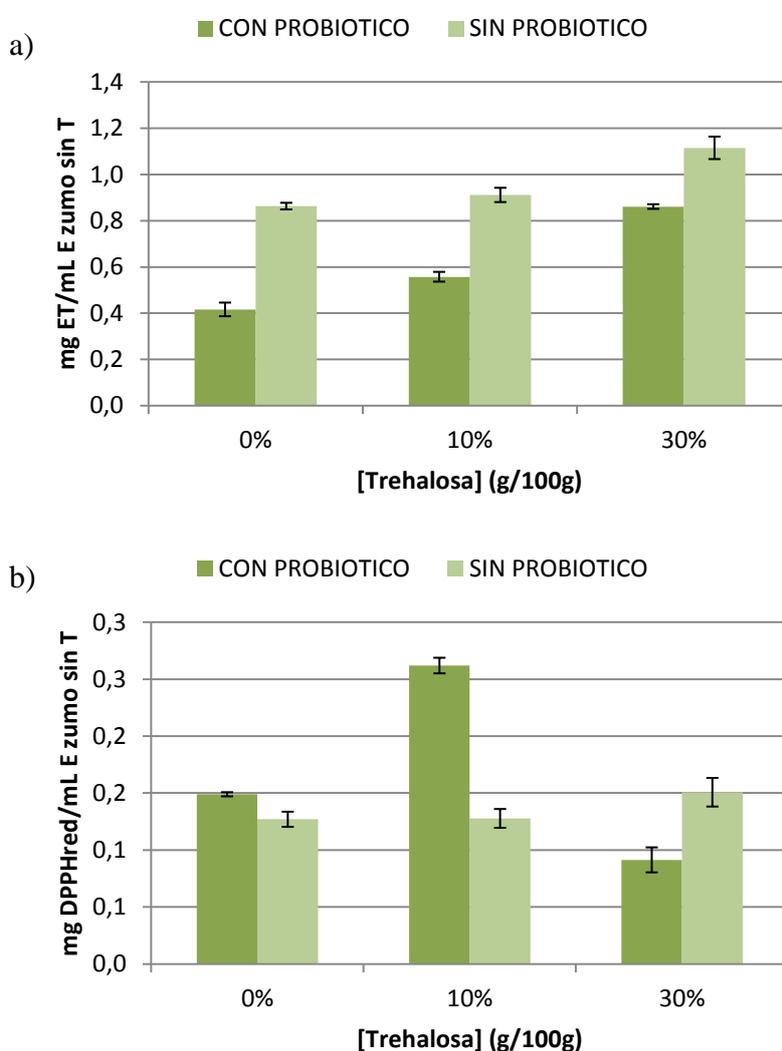


Figura 6. Capacidad antioxidante del zumo de mandarina comercial medida por el método ABTS-TEAC (a) y por el método DPPH (b) en función de la concentración de trehalosa y la presencia de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Finalmente, en la Figura 7 se muestra, tanto para el método ABTS-TEAC (Figura 7a) como para el método DPPH (Figura 7b), el efecto que la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización ejercen sobre la capacidad antioxidante del zumo de mandarina comercial inoculado e incubado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Como se puede observar, la diferente afinidad entre la trehalosa y los radicales ABTS y DPPH se mantiene al aplicar una operación de homogeneización al zumo, por lo que el efecto de la presencia de este disacárido sobre la capacidad antioxidante de los zumos se ve influenciada por el método de determinación empleado.

En relación a la presión de homogeneización aplicada al zumo, ésta no afectó de manera significativa la medida de capacidad antioxidante obtenida por el método ABTS. Sin embargo, sí que resultó significativo su efecto sobre la misma medida obtenida por el método DPPH, siendo la tendencia observada dependiente de la concentración de trehalosa en el zumo.

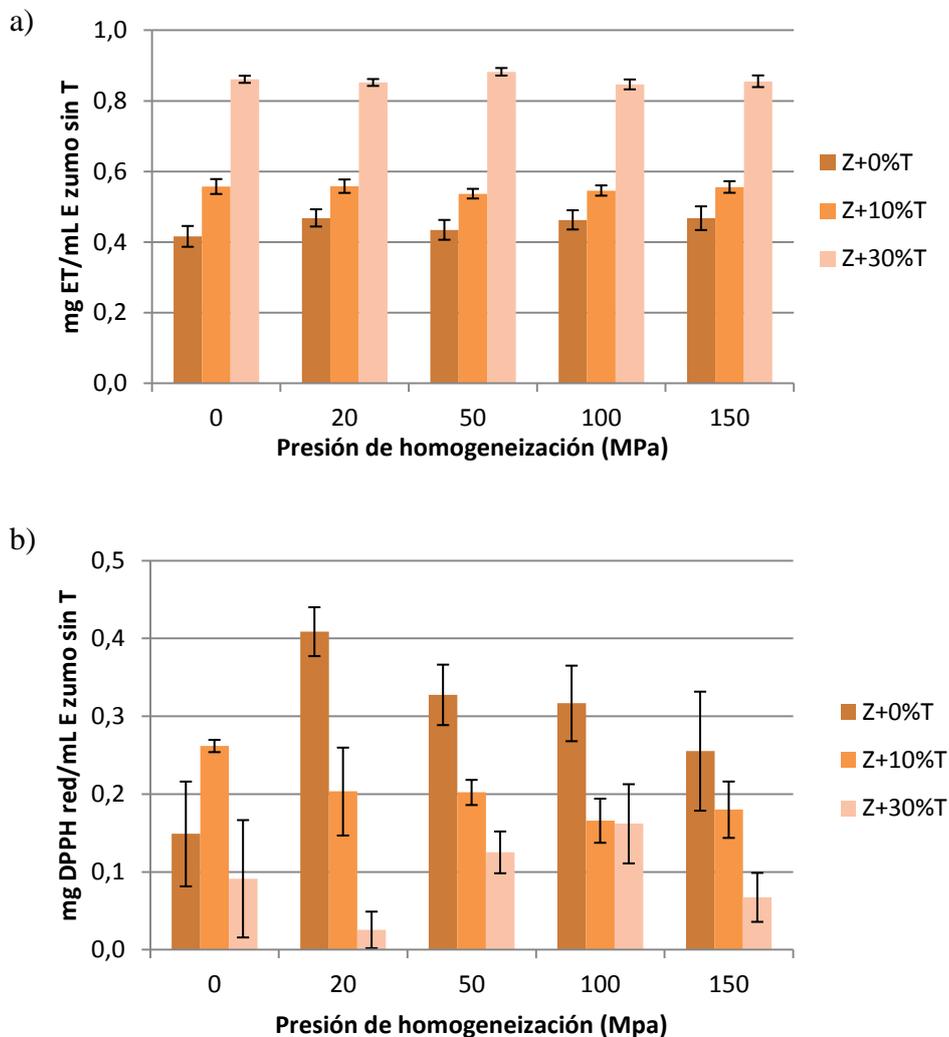


Figura 7. Capacidad antioxidante de zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en función de la concentración de trehalosa y la presión de homogeneización, determinada por el método ABTS-TEAC (a) y por el método DPPH (b).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que:

- La trehalosa ejerce un efecto protector sobre el microorganismo probiótico, que se observa cuando éste se expone presiones de homogeneización elevadas (100-150 MPa).
- La presencia de trehalosa, aunque induce estrés osmótico y, por tanto, disminuye la población microbiana y el carácter probiótico del producto final, mejora su contenido en fenoles y flavonoides totales.
- Desde el punto de vista microbiológico, las condiciones que garantizan un mayor crecimiento del probiótico son aquellas que combinan presiones de homogeneización en torno a 100 MPa y un contenido en trehalosa que no supere el 10% en peso.
- En relación a la actividad antioxidante, la adición de un 30% en peso de trehalosa al zumo es la que garantiza, con independencia de la presión de homogeneización aplicada, una mayor capacidad antiradical.

5. 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 HOMOGENEIZACIÓN”

Para concluir, quiero agradecer por su atención y ayuda a la directora del estudio Cristina Barrera, a Laura Calabuig por su apoyo y participación en los momentos finales del estudio, y a Noelia Betoret su participación como codirectora del estudio. También me acuerdo de mi compañera Alexandra, y de todas las horas y experiencias que hemos compartido juntas.

Finalmente, quisiera agradecer a mi familia y a Paco su paciencia, su escucha y muestras de ánimo en los momentos más duros de trabajo.

6. REFERENCIAS

- 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.; Arilla, A.; Bennár, M.; Barrera, C.; Codoñer, P.; Fito, P. (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.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens.-Wiss.u.-Technol.*, 28: 25-30
- Carvalho, A.; Cardoso, F.; Bohn, A.; Neves, A.; Santos, H. (2011). Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance. *Applied and environmental microbiology*, 77 (12): 4189-4199.
- Chen, L.; Hu, J.; Wang, S. (2012) The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 67 (5): 1013- 1024.
- 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.
- 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.
- Gil, M.; Tomas-Barberan, F.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.; Kader, A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 4581-4589.
- Gómez, P.; Welti-Chanes, J.; Alzamora, S. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2: 447-465.
- Hole, A.; Rud, I.; Grimmer, S.; Sigl, S.; Narvhus, J.; Sahlstrom, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 6369-6375.
- Hsieh, P.-S.; Tsai, Y.-C.; Chen, Y.-C.; Teh, S.-F.; Ou, C.-M.; King, A.-E. (2012) Eradication of *Helicobacter pylori* infection by the probiotic strains *Lactobacillus johnsonii* MH-68 and *L. salivarius* ssp. *Salicinius* AP-32. *Helicobacter*, 17 (6): 466-477
- International Dairy Federation (IDF/FIL),(1992). Physiological and Functional Properties of Probiotics. *Bulletin of the International Federation*, 272: 17-22.
- Kelebek, H.; Selli, S. (2011). Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines. *J. Food Sci Technol*, 51 (6): 1094- 1101.
- Kopjar, M.; Pilizota, V.; Hribar, J.; Simeie, M.; Zlatic, E.; Tiban, N. (2008). Influence of trehalose addition and storage conditions on the quality of strawberry cream filling. *Journal of food engineering* 87: 341-350.
- Li, H.; Wang, H.-L.; Du, J.; Du, G.; Zhan, J.C.; Huang, W.-D. (2010) Trehalose protects wine yeast against oxidation under thermal stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 969-976.

- Lins, R.; Pereira, C.; Hunenberger, P.(2004). Trehalose- Protein interaction in aqueous solution. *Proteins: Structure, function and bioinformatics*, 55: 177-186.
- Luo, Y.; Li, W.-M.; Wang, W.(2007). Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. *Environmental and Experimental Botany* 63: 378-384.
- Luximon-Ramma, A.; Bahorun, T.; Crozier, A.; Zbarsky, V.; Datla, K.; Dexter, D.; Aruoma, O. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanicins in Muritian black teas. *Food Research International*, 38: 357-367.
- McBride, M.; Ensing, J. (1987). Effects of intracellular trehalose content of streptomyces griseus spores. *Journal of bacteriology*, 169 (11): 4995-5001.
- Messaoudi, S.; Manai, M.; kergourlay, G.; Prévost, H.; Connil, N.; Chobert, J.-M.; Dousset, X. (2013) Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36: 296-304.
- Molyneux, P. (2004). The use of the settable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2): 211-219.
- Newman, Y.; Ring, S.; Colaco, C. (1993). The role of Trehalose and other carbohydrates in biopreservation. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 11 (1): 263-294.
- Oku, K.; Kurose, M.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Kurimoto, M.; Tujisaka, Y.; Okabe, A.; Sakurai, M. (2005). Combined NMR and Quantum chemical studies on the interaction between trehalose and dienes relevant to the antioxidant function of trehalose. *J.Phys. Chem. B.*, 109: 3032-3040.
- Oku, K.; Watanabe, H.; Kubota, M.; Fukuda, S.; Kurimoto, M.; Tsujisaka, Y.; Komori, M.; Inoue, Y.; Sakurai, M. (2003). NMR and quantum chemical study on the OH... and CH...O Interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 12739-12748.
- Paquin, P. (1999) Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Int Dairy J.*, 9: 329-335.
- Patrignani, F.; Tabanelli, G.; Siroli, L.; Gardini, F.; Lanciotti, R. (2013) Combined effects of high pressure homogenization treatment and citral on microbiological quality of apricot juice, *International Journal of Food Microbiology*, 160: 273-281.
- Picard, C. (2015). Efecto de la trehalosa y de las altas presiones de homogeneización sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de mandarina. *Trabajo final de grado*, Universidad Politécnica de Valencia.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237
- Reeve, V.; Allanson, M.; Arun, S.; Domanski, D.; Painter, N. (2010) Mice drinking goji berry juice (*Lycium barbarum*) are protected from UV radiation-induced skin damage via antioxidant pathways. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9 (4): 601-607.
- Rivas-Sendra, A.; Landete, J.; Alcántara, C.; Zúñiga, M. (2011). Response of Lactobacillus casei BL23 to phenolic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 1473-1481.
- Roberfroid, M.B. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and liver diseases*, 34: 105-110.

- Rodríguez, H.; Curiel, J.; Landete, J.; de las Rivas, B.; de Felipe, F.; Gómez-Cordovés, C.; Mancheño, J.; Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132: 79-90
- Ryan, K.; Daly, P.; Li, Y.; Hooton, C.; O'Toole, P. (2007) Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 831-834.
- Singleton, V.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Cicalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299.
- Sugawara, M.; Cytryn, E.; Sadowsky, M. (2010). Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Applied and environmental microbiology*, 76 (4): 1071-1081.
- 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.
- Thakur, B.R., Singh, R.K.; Handa, A.K. (1995). Effect of homogenization pressure on consistency of tomato juice. *J. Food. Qual.*, 18: 389-396.
- Wolfe, K.; Wu, X.; Liu, R. (2003) Antioxidant activity of Apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 609-614
- Zayed, G.; Roos, Y. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39: 1081-1086.