

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

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



MÁSTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

**VALORACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO *IN VITRO* DE
Lactobacillus salivarius EN ZUMOS CON TREHALOSA Y
TRATADOS CON ALTAS PRESIONES**

PRESENTADO POR LA ALUMNA:

CRISTINA GABRIELA BURCA

DIRECTORES/AS:

**DOÑA CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS
DOÑA NOELIA BETORET VALLS
DON MANUEL HERNÁNDEZ PERÉZ
DON JORGE GARCÍA HERNÁNDEZ**

Valencia, Septiembre 2015

VALORACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO *IN VITRO* DE *Lactobacillus salivarius* en ZUMOS CON TREHALOSA Y TRATADOS CON ALTAS PRESIONES DE HOMOGENIZACIÓN

Cristina Gabriela Burca, Cristina Barrera Puigdollers¹, Noelia Betoret Valls², Manuel Hernández Pérez³, Jorge García Hernández⁴

RESUMEN

Dada la elevada prevalencia de la infección ocasionada por *Helicobacter pylori* y los efectos secundarios asociados a su tratamiento con antibióticos, resulta interesante desarrollar nuevas alternativas naturales que disminuyan la colonización por parte de este patógeno.

Existen estudios clínicos y modelos *in vitro* que atribuyen a las bacterias del género *Lactobacillus* (en especial, *L. salivarius* spp. *salivarius*) un efecto antagonista frente a *H. pylori*. Sin embargo, se tiene poca información acerca de cómo la actividad antibacteriana o la supervivencia de este probiótico al proceso de digestión se podría ver afectada por la presencia de otros compuestos, tales como la vitamina C, o por la aplicación de operaciones de procesado de alimentos, tales como la homogeneización.

De acuerdo con esto, el presente trabajo se propone con el objeto de evaluar el efecto que la concentración de trehalosa (desde 0 hasta 30% peso) y la aplicación de altas presiones de homogeneización (desde 0 hasta 150 MPa) ejercen sobre las propiedades físico-químicas (a_w , pH, ° Brix, turbidez, pulpa suspendida y tamaño de partícula) y microbiológicas (recuento de viables, resistencia a jugos gástricos y actividad antimicrobiana) de zumo de mandarina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Por lo que respecta a las propiedades físico-químicas, destacar el descenso en la actividad del agua debido a la presencia de trehalosa y el descenso en el tamaño de las partículas presentes en el zumo debido a la aplicación de altas presiones de homogeneización. En relación a las propiedades microbiológicas, destacar que el zumo de mandarina por sí solo mejoró notablemente la resistencia del probiótico a la acción de las enzimas pepsina y pancreatina, así como su actividad frente a *Helicobacter pylori*. Además, estas propiedades microbiológicas se vieron sustancialmente incrementadas al añadir un 10% en peso de trehalosa al zumo y posteriormente aplicar una presión de homogeneización de 50 MPa.

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD)

² Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD)

³ Centro Avanzado de la Microbiología de los Alimentos (CAMA)

⁴ Centro Avanzado de la Microbiología de los Alimentos (CAMA)

PALABRAS CLAVE: zumo de mandarina, trehalosa, presión de homogenización, *Lactobacillus salivarius*, simulación gastrointestinal, *Helicobacter pylori*, probiótico

RESUM

Donada l'elevada prevalença de la infecció ocasionada per *Helicobacter pylori* i els efectes secundaris associats al seu tractament amb antibiòtics, resulta interessant desenvolupar noves alternatives naturals que redueixen la colonització per part d'aquest patògen.

Existeixen estudis clínics i models *in vitro* que atribueixen a les bacteries del gènere *Lactobacillus* (especialment, *L. salivarius* spp. *salivarius*) un efecte antagonista enfront de *H. pylori*. No obstant això, es té poca informació al voltant de com l'activitat antibacteriana o la supervivència d'aquest probiòtic al procés de digestió es podria veure afectada per la presència d'altres compostos, com ara la vitamina C, o per l'aplicació d'operacions de processat d'aliments, com ara l'homogeneïtzació.

D'acord amb això, el present treball es proposa amb l'objectiu d'avaluar l'efecte que la concentració de trehalosa (des de 0 fins al 30% en pes) i l'aplicació d'altres pressions d'homogeneïtzació (des de 0 fins a 150 MPa) exerceixen damunt les propietats físico-químiques (a_w , pH, Brix, turbidesa, polpa suspesa i mida de partícula) i microbiològiques (recompte de viables, resistència a suc gàstrics i activitat antimicrobiana) de suc de mandarina inoculat amb *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

Pel que fa a les propietats físico-químiques, destacar el descens en l'activitat de l'aigua a causa de la presència de trehalosa i el descens en la mida de les partícules presents en el suc a causa de l'aplicació d'altres pressions d'homogeneïtzació. En relació a les propietats microbiològiques, destacar que el suc de mandarina per si mateix va millorar notablement la resistència del probiòtic a l'acció dels enzims pepsina i pancreatina, així com la seua activitat enfront d'*Helicobacter pylori*. A més, aquestes propietats microbiològiques es van veure substancialment incrementades en afegir un 10% en pes de trehalosa al suc i posteriorment aplicar una pressió d'homogeneïtzació de 50 MPa.

ABSTRACT

Given the high prevalence of infection caused by *Helicobacter pylori* and the side effects associated with treatment with antibiotics, it is interesting to develop new natural alternatives that reduce the colonization of this pathogen.

There are clinical studies and *in vitro* models that attribute to the bacteria of the genus *Lactobacillus* (especially *L. salivarius* spp. *salivarius*) an antagonist effect against *H. pylori*. However, little is known about how the antibacterial activity or the survival of the probiotic digestion process can be affected by the presence of other compounds such as vitamin C, or by the application of food processing operations such as homogenization.

Accordingly, the present study aims to assess the effect of the concentration of trehalose (from 0-30% weight) and the application of high

pressure homogenization (from 0 to 150 MPa) exerted on the physical properties -chemical (aw, pH, Brix, turbidity and suspended pulp particle size) and microbiological (viable count, gastric juice resistance and antimicrobial activity) tangerine juice inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

With regard to physicochemical properties, the noteworthy aspects were the drop in water activity due to the presence of trehalose and the decrease in the size of the particles present in the juice as a result of applying high pressure homogenization. Regarding the microbiological properties, note that the tangerine juice alone greatly improved the resistance of the probiotic action of pepsin and pancreatin, and their activity against *Helicobacter pylori*. Furthermore, these microbiological properties were substantially increased by adding 10% by weight of trehalose juice and subsequently applying a homogenization pressure of 50 MPa.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la incidencia de úlceras de estómago se ha asociado al estrés y a la mala alimentación. El descubrimiento de que éstas son causadas por una infección bacteriana (*Helicobacter pylori*) ha sido un hecho muy importante para la ciencia y fue premiado con el Nobel de medicina el año 2005, suponiendo un cambio en la práctica de la gastroenterología en todo el mundo (Patel *et al.*, 2013).

H. pylori es un microorganismo patógeno gram-negativo, con forma espiral y microaerófilico, que puede colonizar la mucosa gástrica. La tasa de prevalencia de la infección por *H. pylori* en la población adulta de los países industrializados se estima entre el 20% y el 50%, superando el 80% en los países en vías de desarrollo (Go, 2002). *H. pylori* se reconoce como la causa principal de gastritis atrófica, úlcera gástrica y duodenal, así como cáncer gástrico de tipo intestinal. En 1994, la International Agency for Research on Cancer y la Organización Mundial de la Salud lo reconocieron como un carcinógeno de la categoría I en humanos (Serrano *et al.*, 2009). Actualmente, para su erradicación se aplica un tratamiento durante 7-14 días con 2-3 antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, claritromicina o metronidazol) y un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol o esomeprazol) o un antagonista de los receptores H₂ (ranitidina, cimetidina, famotidina o nizatidina). Aunque este tratamiento es efectivo en el 85% de los casos (Graham y Yamaoka, 2000), tiene muchos efectos adversos y una eficacia limitada por la aparición de resistencia o intolerancia a los antimicrobianos. Por ello, es necesario desarrollar alternativas naturales, de bajo coste y aplicables a gran escala en las poblaciones de riesgo para prevenir o disminuir la colonización por *H. pylori* (Cruet *et al.*, 2003; Gerritz *et al.*, 2006).

Estudios clínicos y modelos *in vitro* demuestran que la asociación de bacterias del género *Lactobacillus* con antibióticos para el tratamiento de *H. pylori* ejerce un efecto antagonista frente a este microorganismo y reduce los síntomas de intolerancia digestiva debidos a los antibióticos (Hamilton-Miller, 2003). Además, ciertos lactobacilos (en especial, *L. salivarius* spp. *salivarius* y *L. acidophilus*) son resistentes al pH gástrico, pudiendo residir en el

estómago humano de manera transitoria (Aiba *et al.*, 1998; Kabir *et al.*, 1997; Marteau *et al.*, 1997), compitiendo e inhibiendo la colonización por *H. pylori*. Por otra parte, hay estudios que atribuyen a la vitamina C funciones protectoras contra la carcinogénesis gástrica asociada a *H. pylori* (You *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1997; Zojaji *et al.*, 2009), probablemente debidas a su capacidad para atrapar y neutralizar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, para regenerar otros antioxidantes (como el α -tocoferoxilo y el β -caroteno) a partir de sus especies radicales y para alterar la proliferación celular e inducir la muerte en diversos sistemas celulares (Zhang y Farthing, 2005). Según esto, un alimento que incluyera en su composición concentraciones elevadas de vitamina C y de ciertos microorganismos probióticos podría erradicar eficazmente los síntomas propios de la infección ocasionada por *H. pylori*, lo que ha sido objeto de estudios previos. Betoret *et al.* (2012a) alcanzaron recuentos de *L. salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina en torno a 10^8 UFC/mL y lo emplearon como líquido de impregnación en la elaboración de un snack de manzana capaz de reducir los síntomas de la infección causada por *H. pylori*. Sin embargo, la esperada pérdida de viabilidad del probiótico, asociada en este caso a la etapa de deshidratación necesaria para aumentar la vida útil del producto final, hace necesario seguir avanzando en la mejora del proceso.

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa que se encuentra presente en diversos organismos, en los que actúa como azúcar de reserva y como protector ante el estrés abiótico. La trehalosa protege proteínas y membranas biológicas, lo que permite su uso como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos, además de su empleo como sustituto de la sacarosa en productos de panadería y bollería (Ohtake y Wang, 2011). En la protección de las proteínas, la trehalosa forma una cápsula alrededor de las mismas y preserva su estructura terciaria (Lins *et al.*, 2004). Durante los procesos de deshidratación, la trehalosa interacciona con las membranas para mantener el estado fluido y prevenir la fusión, la separación de fases y la rotura (Atarés *et al.*, 2009; Betoret *et al.*, 2014; Crowe *et al.*, 1984).

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 alcanzar presiones elevadas. Algunos estudios han aplicado esta nueva tecnología para aumentar la supervivencia de cepas con efecto probiótico o mejorar sus propiedades funcionales (Patrignani *et al.*, 2009). En ensayos con cepas de *Lactobacillus paracasei* A13, la aplicación de altas presiones 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). Concretamente en zumo de mandarina, la homogeneización disminuye el tamaño de las partículas suspendidas y

aumenta la disponibilidad de los componentes activos con propiedades antioxidantes (Betoret *et al.*, 2009; Betoret *et al.*, 2012b).

Por todo lo comentado anteriormente, el presente estudio se propone con el objeto de evaluar el efecto que la concentración de trehalosa y la aplicación de altas presiones de homogeneización ejercen sobre las propiedades físico-químicas (a_w , pH, Brix, turbidez, pulpa suspendida y tamaño de partícula) y microbiológicas (recuento de *L.salivarius* spp. *salivarius*, resistencia del probiótico a los jugos gástricos y actividad antimicrobiana) de zumo de mandarina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Como sustrato para la incorporación de trehalosa cristalina dihidrato de grado alimentario (TREHA™, Cargill, S.L.U, Martorell, Barcelona) y posterior medio de crecimiento del microorganismo probiótico, se empleó zumo de mandarina comercial (marca Hacendado) de la variedad Clementina.

El microorganismo probiótico utilizado fue *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia). Para su reactivación, las cepas congeladas o liofilizadas se resuspendieron en caldo MRS estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

El patógeno seleccionado para comprobar la actividad antimicrobiana del microorganismo probiótico fue *Helicobacter pylori* NCTC 11637 de la Colección Británica de Cultivos Tipo. Para su reactivación, se sembraron 100 µL de las cepas descongeladas en placas de Agar Sangre de Caballo (ASC) elaboradas a partir de Agar Columbia Base (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) suplementado en un 10% con sangre desfibrinada de caballo y se incubaron a 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia (Bathia *et al.*, 1989).

Preparación del zumo probiótico

De acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos (Betoret *et al.*, 2012; Morales *et al.*, 2009), el zumo de mandarina se enriqueció con 5 g/L de levadura fresca de panadería (Levital®) y su pH se elevó desde 3,89 hasta 6,5 con 9,8 g/L de bicarbonato sódico. Para evitar la competencia con las bacterias ácido-lácticas, así como el excesivo oscurecimiento del medio, la levadura se añadió a un 7% del volumen total de zumo, el cual se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos. A continuación, esta fracción de zumo estéril se mezcló con el zumo restante al que se había incorporado diferentes concentraciones de trehalosa (entre 0 y 30 g/100 g de zumo) y se inoculó con 4 mL/L del medio que contenía el microorganismo reactivado y crecido ($\approx 10^9$ UFC/mL). Una vez inoculados, los zumos se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Ensayos de homogeneización

La homogeneización de los diferentes zumos formulados se llevó a cabo en un homogeneizador de alta presión a escala de laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia) a 0, 25, 50, 100 y 150 MPa.

Determinaciones físico-químicas

Todas las determinaciones descritas en este apartado se realizaron, al menos por triplicado, a partir de zumos con diferentes concentraciones de trehalosa (de 0 a 20 g/100 g de zumo), antes y después de su inoculación e incubación y sometidos a diferentes presiones de homogeneización (entre 0 y 150 MPa).

ACTIVIDAD DEL AGUA

Se midió la actividad del agua (a_w) a 25 °C utilizando un higrómetro de punto de rocío (AquaLab Dew Point Lab Ferrer 4TE \pm 0,003) previamente calibrado con sales saturadas de referencia.

SÓLIDOS SOLUBLES

El contenido en sólidos solubles de los diferentes zumos se determinó en un refractómetro (Abbe Atago, Nar T3, Japón) termostato a 20 °C, mediante la lectura directa del índice de refracción en °Brix.

DETERMINACIÓN DEL pH

El pH de las muestras líquidas se midió con un potenciómetro con sistema autocalibrante (pH Meter S20, Mettler Toledo - Seven Easy) capaz de trabajar con compensación automática de temperatura.

PULPA SUSPENDIDA Y TURBIDEZ

Siguiendo el protocolo descrito por Betoret *et al.* (2011), la pulpa suspendida se corresponde con el volumen de precipitado obtenido tras centrifugar 10 mL de zumo a 365 ó 3000 g durante 10 min a 27 °C en una centrífuga P-Selecta Medifriger BL-S. Por otra parte, la turbidez de las muestras estaría relacionada con la transmitancia del sobrenadante medida a 650 nm en un espectrofotómetro UV/Visible Thermo Scientific Helios Zeta.

TAMAÑO DE PARTICULA

El tamaño de partícula se analizó con el equipo Malvern Mastersizer (Modelo 2000, Malvern Instruments Limited, Worcestershire, U.K.) que cubre un rango de medida entre 0,02 y 2000 micras y que dispone de una fuente de luz azul de 470 nm de longitud de onda. Los valores que se usaron para los índi-

ces de refracción de la nube y de la fase dispersa fueron 1,73 y 1,33 respectivamente, y se utilizó 0,1 como índice de absorción de las partículas de la nube (Corredig *et al.*, 2001). Además de las correspondientes curvas de distribución de tamaño de partícula, se ha obtenido para cada muestra el diámetro medio de la distribución considerado en volumen (D [4,3]) y el tamaño de partícula por debajo del cual se encuentra el 90% de la distribución (d_{90}).

Determinaciones microbiológicas

RECuentos de viables

La concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en los diferentes zumos formulados se determinó por el procedimiento de dilución seriada en agua destilada estéril y siembra en placa (ICMSF, 2000). Dado que el crecimiento observado en condiciones de anaerobiosis 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.

SIMULACIÓN GÁSTRICA E INTESTINAL *IN VITRO*

Para evaluar la resistencia del probiótico a los jugos gástricos e intestinales se ha aplicado el protocolo modificado de simulación gastrointestinal *in vitro* propuesto por Charteris *et al.* (1998) y descrito por Posso (2013). Este ensayo se ha aplicado sobre *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 puro, no incorporado a matriz alimentaria alguna, y sobre el mismo microorganismo en presencia de zumo de mandarina (*var.* Clementina) sin homogeneizar con 0, 10 y 20 g de trehalosa por cada 100 g de zumo, así como sobre el zumo de mandarina con un 10% de trehalosa, inoculado, incubado y homogeneizado a 50 MPa. Durante todo el proceso el sistema se mantuvo a 37 °C y en agitación (100 rpm, agitador orbital Ivymen System Optic ®) y se trató de disminuir la incidencia de luz y oxígeno tapando los matraces en los que se desarrollaba la simulación y reduciendo al mínimo el espacio de cabeza en los mismos.

En primer lugar, las células de *L. salivarius* spp. *salivarius* se lavaron con una disolución de tampón fosfato ajustado a pH 7 (PBS1X). Para ello, se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min 1 mL de caldo MRS inoculado e incubado a 37°C durante 24 horas ($\approx 10^9$ UFC/mL). A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de PBS1X, que se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Esta operación se repitió tres veces.

Una vez lavadas, las células se diluyeron con 13 mL de PBS1X ($\approx 10^9$ UFC/mL) y se mezclaron directamente con 70 mL de una disolución de 3 g/L de pepsina aislada de la mucosa gástrica porcina (Sigma Life Science) en suero salino estéril al 0,5% (p/v), a la que se ajustó el pH hasta un valor de 2 con una disolución de HCl 0,5 N. Para evaluar el efecto de la matriz alimentaria sobre la resistencia del probiótico a los jugos gastrointestinales, los 14 mL de PBS1X que contenían las células lavadas se mezclaron con 20 mL de zumo de mandarina con diferentes concentraciones de trehalosa y rectificado con bicarbonato de sodio hasta pH 6,5, previamente a la incorporación de la

disolución de pepsina. El efecto de la trehalosa y de la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre la resistencia del probiótico a la digestión se evaluó mezclando directamente 20 mL de zumo con un 10% de trehalosa, inoculado, incubado y homogeneizado a 50 MPa con los 70 mL de la disolución de pepsina. A diferentes tiempos a lo largo del proceso de simulación gástrica (0, 10, 30, 60 y 120 min), se tomaron alícuotas de 1 mL y se procedió al recuento de *L. salivarius* spp *salivarius*. Transcurridas 2 horas, se tomaron 56 mL procedentes de la etapa gástrica y se mezclaron con 30 mL de una disolución de 1g/L de pancreatina aislada de páncreas porcino (Sigma Life Science) en suero salino estéril al 0,5% (p/v), ajustándose el pH a 8 con una disolución de NaOH 0,1 N. A diferentes tiempos a lo largo de la etapa intestinal (0, 30, 60, 120, 240 y 360 min), se tomaron alícuotas de 1 mL y se procedió al recuento de *L. salivarius* spp *salivarius*. En la Tabla 1 se muestra la relación de volúmenes empleados en los diferentes procesos de simulación gastrointestinal llevados a cabo.

TABLA 1. Relación de volúmenes que intervienen en el proceso de simulación gastrointestinal (SGI) *in vitro*.

Fases	SGI 1	SGI 2	SGI 3	SGI 4	SGI 5
ETAPA GÁSTRICA					
<i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> en PBS1X	14 mL	14 mL	14 mL	14 mL	0
Zumo sin inocular con un 0% de trehalosa	0 mL	20 mL	0	0	0
Zumo sin inocular con un 10% de trehalosa	0	0	20 mL	0	0
Zumo sin inocular con un 20% de trehalosa	0	0	0	20 mL	0
Zumo con un 10% de trehalosa, inoculado, incubado y homogeneizado a 50 MPa	0	0	0	0	20 mL
Disolución pepsina	70 mL	70 mL	70 mL	70 mL	70 mL
ETAPA INTESTINAL					
Homogeneizado de la etapa anterior	56 mL	56 mL	56 mL	56 mL	56 mL
Disolución de pancreatina	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El efecto del probiótico incorporado a diferentes matrices alimentarias sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* se evaluó por el método de discos descrito por Yuan Kun (2006). Para ello, células de *H. pylori* crecidas en Agar Sangre de Caballo (ASC), preparado tal y como se ha descrito anteriormente, se resuspendieron en Caldo Brucella (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) hasta alcanzar una concentración en torno a 10^9 UFC/mL, equivalente a una escala McFarland 6. A continuación, se tomó una alícuota de 100 μ L y se extendió sobre una placa de agar ASC con un asa estéril. Previamente, se prepararon siembras directas en placas de agar MRS con el probiótico presente en caldo MRS en una concentración de 10^9 UFC/mL (Control) y en diferentes matrices alimentarias: zumo de mandarina sin homogeneizar con un 0 y un 10% de trehalosa en peso y sus equivalentes homogeneizados a 50 MPa. Las placas sembradas con el probiótico se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se extrajeron discos de 8 mm de diámetro con un sacabocados estéril que se depositaron en las placas de agar ASC

recién sembradas con el patógeno. A continuación, se procedió a la incubación de las placas a 37 °C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Transcurrido este tiempo, se procedió a medir los halos de inhibición. Cada muestra se analizó por triplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Statgraphics Centurion XVI.II. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) simples y multifactoriales para evaluar las diferencias entre los productos elaborados, con un nivel de confianza del 95% y un nivel de interacción máximo de orden dos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la trehalosa y la presión de homogenización sobre las propiedades físico-químicas del zumo con y sin probiótico

En la Figura 1 se muestra el efecto que diferentes concentraciones de trehalosa (desde 0 hasta 30 g/100 g) ejercen sobre el crecimiento microbiano de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en zumo de mandarina (var. Clementina). 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.

Como se puede observar, todos los recuentos obtenidos superaron el valor de 10^6 UFC/mL, que es la concentración microbiana mínima establecida para poder afirmar que un alimento tiene carácter probiótico (IDF, 1992). Al igual que en estudios previos (Betoret *et al.*, 2012), los valores obtenidos para las muestras de zumo de mandarina sin trehalosa, rectificado en términos de pH y contenido proteico, resultaron del orden de 10^8 UFC/mL. Esto confirma que la composición de este producto resulta óptima para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

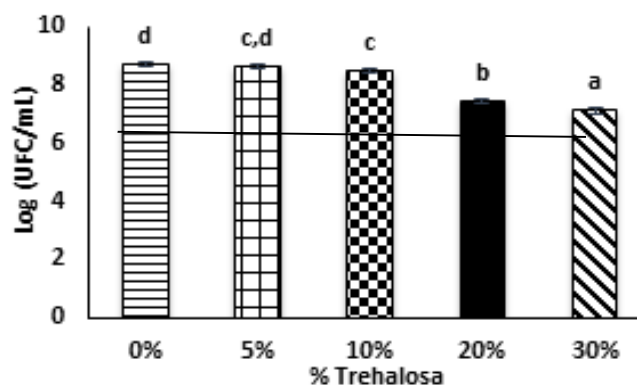


FIGURA 1. Efecto de la concentración de trehalosa sobre el crecimiento microbiano de *L. salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina (var. Clementina).

a,b,c...Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05).

Sin embargo, la incorporación de trehalosa al zumo produjo un descenso notable en el número de células viables, lo que podría ser consecuencia del mayor carácter hipertónico adquirido por el medio conforme aumenta la concentración en este disacárido. A partir de estos resultados se descartó la posibilidad de incorporar al zumo más de 20 g de trehalosa por 100 g con la finalidad de prevenir la muerte celular por estrés osmótico y alcanzar mayores recuentos en el producto final.

Con el objeto de evaluar las causas por las que la trehalosa podría afectar al crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, en la Tabla 2 se muestran las propiedades físico-químicas (a_w , °Brix, pH, % pulpa suspendida, turbidez y tamaño de partícula) del zumo de mandarina rectificado con bicarbonato de sodio hasta pH 6,5 y sin inocular con el microorganismo probiótico, en función de la concentración de trehalosa.

TABLA 2. Efecto de la concentración de trehalosa sobre las propiedades físico-químicas del zumo de mandarina (*var.* Clementina) sin inocular.

Propiedad	Z+0%Treh	Z+10%Treh	Z+20%Treh
a_w	0,9856 ± 0,0009 ^c	0,9803 ± 0,0008 ^b	0,9726 ± 0,0010 ^a
°Brix	12,07 ± 0,06 ^a	20,2 ± 0,4 ^b	28,13 ± 0,06 ^c
pH	6,567 ± 0,012 ^a	6,770 ± 0,010 ^b	6,803 ± 0,006 ^c
%Pulpa _{365g}	8,00 ± 0,10 ^a	8,00 ± 0,10 ^a	8,7 ± 1,2 ^a
Transmitancia _{365g}	1,489 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,3 ^a
%Pulpa _{3000g}	2,7 ± 1,1 ^a	2,00 ± 0,10 ^a	2,00 ± 0,10 ^a
Transmitancia _{3000g}	21 ± 3 ^c	13,8 ± 0,5 ^b	4,3 ± 0,3 ^a
D[4,3]	227 ± 24 ^a	238 ± 20 ^a	216 ± 34 ^a
d_{90}	572 ± 72 ^a	597 ± 54 ^a	552 ± 99 ^a

Valores medios ± desviación estándar.

a,b,c... Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05).

Como era de esperar, el aumento en la concentración de trehalosa produjo un incremento significativo en el contenido en sólidos solubles totales y un descenso notable en la actividad del agua del zumo. No obstante, la actividad del agua de las muestras resultó superior al valor mínimo de 0,85 por debajo del cual cesan las reacciones de deterioro asociadas a la actividad bacteriana (Rahman, 2010). En relación al pH, su valor aumentó ligeramente con la cantidad de trehalosa incorporada al zumo, lo que supuso un alejamiento con respecto al pH óptimo de desarrollo para los lactobacilos entre 5,5 y 6,2 (De Vos *et al.*, 2009; Pot y Tsakalidou, 2009).

En cuanto a las determinaciones de turbidez y pulpa suspendida, éstas no se vieron afectadas por la concentración de trehalosa presente en el zumo, a excepción de la transmitancia del sobrenadante obtenido tras centrifugar las muestras a 3000 g, que disminuyó significativamente con la cantidad de trehalosa. Este descenso en los valores de transmitancia indica un aumento significativo en la turbidez conforme aumenta la concentración de trehalosa presente en el zumo. Por otra parte, las diferencias entre los valores a diferentes velocidades de centrifugación reflejan la debilidad del procedimiento estándar (365 g durante 10 min) para evaluar la pulpa suspendida y la turbidez. Como era de esperar, tanto el volumen de

precipitado recogido como la turbidez del sobrenadante resultaron significativamente mayores al aplicar una velocidad de centrifugación menor.

Finalmente, ninguno de los dos parámetros seleccionados para describir el tamaño de partícula de los zumos se vio afectado por la concentración de trehalosa. Por una parte, el diámetro medio de la distribución ($D[4,3]$) tomó valores en torno a $227 \pm 27 \mu\text{m}$, ligeramente inferiores a los obtenidos en estudios previos llevados a cabo con zumos de mandarina de las variedades Salutsiana y Ortanique (Betoret *et al.*, 2011). Por otra parte, el tamaño por debajo del cual se encuentran el 90% de las partículas presentes en el zumo (d_{90}) tomó valores del orden de $573 \pm 77 \mu\text{m}$, ligeramente diferentes a los observados en un estudio previo llevado a cabo con zumo de mandarina natural de la variedad Ortanique (Picard, 2015), en el que sí se encontraron diferencias significativas en los tamaños de las partículas presentes en el zumo en función de la concentración de trehalosa, seguramente debidas a las variaciones en el proceso de elaboración del zumo.

Estos resultados se confirman en las correspondientes curvas de distribución del tamaño de partículas representadas en Figura 2, en las que se observa una distribución bimodal entre 1 y 1000 μm , con un máximo entre 100 y 400 μm y otro en torno a 4 μm , que no se ven prácticamente afectados por la cantidad de trehalosa incorporada al zumo.

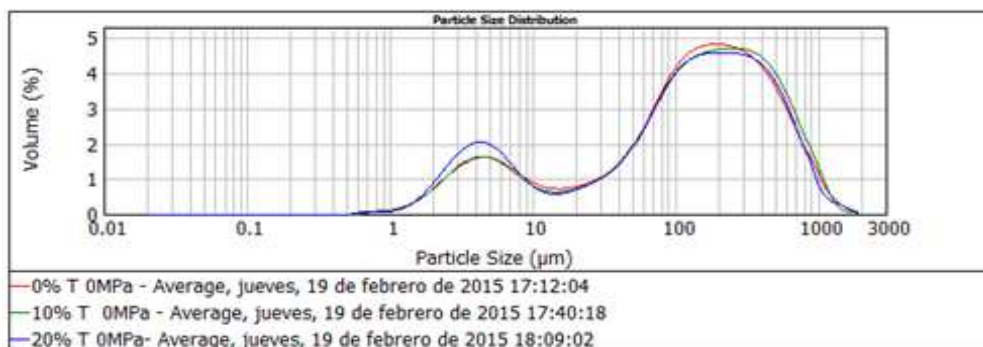


FIGURA 2. Efecto de la concentración de trehalosa sobre las curvas de distribución de tamaño de partículas de zumo de mandarina (var. Clementina) sin inocular.

Para evaluar el efecto que la aplicación de altas presiones de homogenización ejercen sobre la viabilidad del probiótico, se analizan en primer lugar las propiedades físico-químicas de los zumos de mandarina, con y sin trehalosa, rectificadas con levadura y bicarbonato de sodio, inoculadas, incubadas y homogeneizadas a diferentes presiones. Comenzando por los valores de a_w , $^{\circ}\text{Brix}$ y pH, en la Tabla 3.

Se puede comprobar que estos parámetros prácticamente no se vieron afectados por la presión de homogeneización aplicada al zumo, siendo la concentración de trehalosa la que determina las diferencias observadas entre los diferentes líquidos analizados.

TABLA 3. Efecto de la concentración de trehalosa y la presión de homogenización sobre las propiedades físico-químicas del zumo de mandarina (*var. Clementina*) inoculado con *L. salivarius* spp *salivarius*.

% Trehalosa	P (MPa)	a_w	pH	°Brix
Z+0%Treh	0	0,9863 ± 0,0003	4,93 ± 0,06	12,30 ± 0,10
	25	0,9866 ± 0,0011	4,94 ± 0,06	12,30 ± 0,10
	50	0,9862 ± 0,0012	4,94 ± 0,10	12,30 ± 0,10
	100	0,9865 ± 0,0016	4,97 ± 0,012	12,30 ± 0,10
	150	0,9858 ± 0,0005	4,96 ± 0,10	12,30 ± 0,10
Z+10%Treh	0	0,9818 ± 0,0010	5,45 ± 0,03	19,27 ± 0,15
	25	0,984 ± 0,002	5,51 ± 0,06	17,60 ± 0,10
	50	0,9828 ± 0,0012	5,49 ± 0,03	18,60 ± 0,10
	100	0,9836 ± 0,0008	5,49 ± 0,017	18,87 ± 0,15
	150	0,9834 ± 0,0006	5,50 ± 0,02	18,90 ± 0,10
Z+20%Treh	0	0,9767 ± 0,0004	5,55 ± 0,04	24,90 ± 0,10
	25	0,9782 ± 0,0003	5,53 ± 0,03	24,17 ± 0,06
	50	0,9777 ± 0,0003	5,54 ± 0,02	25,2 ± 1,1
	100	0,9773 ± 0,0010	5,55 ± 0,03	24,70 ± 0,10
	150	0,9779 ± 0,0002	5,57 ± 0,02	24,93 ± 0,15

Valores medios ± desviación estándar

Tal y como se ha comentado anteriormente, los zumos con mayor concentración de trehalosa presentaron valores de °Brix significativamente más elevados y, en consecuencia, menores valores de a_w . En cuanto al pH, se aprecia un notable descenso con respecto al valor inicial de 6,5, más acusado a medida que disminuye la concentración de trehalosa presente en el zumo. Para explicar este comportamiento hemos de tener en cuenta que *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* es una bacteria ácido láctica capaz de fermentar los carbohidratos presentes en el zumo y liberar ácido láctico (De Vos *et al.*, 2009; Pot y Tsakalidou, 2009). De hecho, los °Brix de los zumos tras la incubación resultaron ligeramente inferiores a los de los zumos sin inocular (Tabla 2). Respecto al mayor descenso en el pH tras la incubación de los zumos formulados sin trehalosa (Z+0%Treh), éste podría estar asociado con unas condiciones más favorables para el crecimiento del microorganismo probiótico.

En la Tabla 4 se muestran los resultados correspondientes a la turbidez y al porcentaje de pulpa suspendida. El volumen de precipitado y la turbidez del sobrenadante resultaron notablemente más elevados tras la centrifugación a 365 g a pesar de que, como consecuencia de la presencia del microorganismo probiótico, estos valores resultaron ligeramente inferiores a los obtenidos para el zumo sin inocular (Tabla 2).

En relación al efecto de los otros factores considerados se puede afirmar que el porcentaje de pulpa suspendida resultó, para las dos velocidades de centrifugación ensayadas, significativamente más elevado al añadir un 10% en peso de trehalosa al zumo e independiente de la presión de homogenización aplicada al mismo.

TABLA 4. Efecto de la concentración de trehalosa y la presión de homogenización sobre el % pulpa suspendida y turbidez del zumo de mandarina (*var. Clementina*) inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius*.

Trehalosa	% (MPa)	%Pulpa _{365g}	Transmitancia ₃₆ 5g	%Pulpa _{3000g}	Transmitancia ₃₀₀₀ g
Z+0%Treh	0	6 ± 2	1,413 ± 0,006	2,66 ± 1,15	22,379 ± 0,019
	25	3,3 ± 1,2	1,411 ± 0,006	2,66 ± 1,15	14,213 ± 0,009
	50	4 ± 3	1,42 ± 0,10	2,00 ± 0,10	15,907 ± 0,018
	100	5 ± 2	1,477 ± 0,006	2,00 ± 0,10	29,993 ± 0,013
	150	6 ± 2	1,478 ± 0,010	2,00 ± 0,10	34,30 ± 0,02
Z+10%Treh	0	4,7 ± 1,2	0,980 ± 0,006	2,7 ± 1,2	13,743 ± 0,006
	25	16 ± 3	0,877 ± 0,004	3,3 ± 1,2	13,733 ± 0,002
	50	12,7 ± 1,2	0,628 ± 0,008	4,7 ± 1,2	13,728 ± 0,002
	100	10,00 ± 0,10	3,9180 ± 0,0010	2,7 ± 1,2	13,727 ± 0,006
	150	10,00 ± 0,10	3,734 ± 0,006	3,3 ± 1,2	13,748 ± 0,006
Z+20%Treh	0	6,00 ± 0,10	1,394 ± 0,003	2,7 ± 1,2	5,774 ± 0,006
	25	4 ± 2	1,0000 ± 0,0010	2,00 ± 0,10	4,548 ± 0,004
	50	6,7 ± 1,2	1,243 ± 0,003	2,7 ± 1,2	5,224 ± 0,006
	100	5,3 ± 1,2	0,99 ± 0,10	2,00 ± 0,10	5,907 ± 0,006
	150	6,7 ± 1,2	0,87 ± 0,10	2,00 ± 0,10	8,536 ± 0,003

Valores medios ± desviación estándar.

En cuanto a la turbidez de los zumos, no se observó un efecto claro de las variables analizadas (presión de homogeneización y concentración de trehalosa) sobre los valores de transmitancia del sobrenadante obtenido por el procedimiento estándar (365 g durante 10 min). Sin embargo, al aplicar una velocidad de centrifugación mayor (3000 g) sí que se aprecia, en concordancia con los resultados obtenidos en el zumo sin inocular (Tabla 2), un aumento significativo en la turbidez al aumentar desde 0 g/100 g hasta 20 g/100 g la concentración de trehalosa presente en el zumo. Sorprende, sin embargo, el hecho de que la transmitancia del sobrenadante no disminuya claramente con la presión de homogeneización, tal y como observaron Betoret et al. (2011) en un estudio previo, sino que se mantenga constante o incluso tienda a aumentar. En cualquier caso, estos resultados evidencian la capacidad de la trehalosa para interaccionar con las partículas suspendidas en la nube del zumo, tanto con las de mayor tamaño y menor estabilidad (que precipitan al centrifugar a 365 g) como con las de menor tamaño y mayor estabilidad (que precipitan al centrifugar a 3000 g).

En relación con el tamaño de las partículas presentes en el zumo inoculado con *L. salivarius* spp. *salivarius* (Tabla 5), éste apenas se vio afectado por la presencia del microorganismo probiótico. Como era de esperar, tanto el diámetro medio de la distribución (D[4,3]) como el tamaño medio del 90% de las partículas presentes en el zumo (d_{90}) disminuyeron significativamente con la presión de homogeneización, aunque no de forma proporcional a la presión aplicada ni en la misma medida para las diferentes concentraciones de trehalosa ensayadas.

TABLA 5. Efecto de la concentración de trehalosa y la presión de homogenización sobre el tamaño de partícula del zumo de mandarina (var. Clementina) inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius*.

% Trehalosa	P (MPa)	D[4,3]	d ₉₀
Z+0%Treh	0	233 ± 22	577 ± 6
	25	41 ± 4	100 ± 6
	50	38 ± 5	93 ± 8
	100	28,4 ± 0,8	78,2 ± 1,7
	150	43 ± 3	101 ± 4
Z+10%Treh	0	211 ± 21	530 ± 63
	25	38,3 ± 1,1	107 ± 3
	50	50 ± 3	90 ± 3
	100	29 ± 3	75 ± 5
	150	27,8 ± 0,8	69,2 ± 1,1
Z+20%Treh	0	221 ± 11	563 ± 29
	25	34,3 ± 0,9	98,4 ± 1,9
	50	30,7 ± 1,9	86 ± 3
	100	28 ± 3	76 ± 4
	150	27 ± 4	71 ± 8

Valores medios ± desviación estándar.

El descenso en el tamaño de las partículas asociado a la aplicación de altas presiones de homogeneización se confirma en las correspondientes curvas de distribución del tamaño de partículas (Figura 3), en las que se observa una distribución bimodal entre 1 y 1000 µm para las muestras sin homogeneizar (0 MPa) y entre 1 y 200 µm para las muestras homogeneizadas. Además, la homogeneización aumenta notablemente el porcentaje de partículas con un tamaño en torno a 4 µm, estando el otro máximo situado en torno a 40 µm.

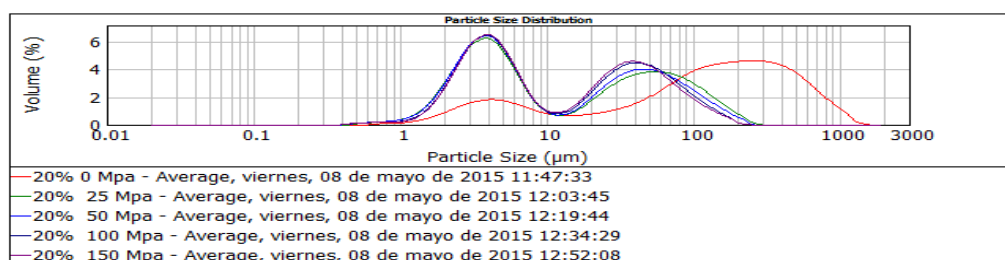


FIGURA 3. Efecto de la presión de homogeneización sobre las curvas de distribución del tamaño de partículas de zumo de mandarina (var. Clementina) con un 20% de trehalosa e inoculado con *L. salivarius* spp. *salivarius*.

Efecto de la trehalosa y la presión de homogenización sobre las propiedades microbiológicas del zumo con probiótico

En la Figura 4 se muestra el efecto que la concentración de trehalosa (desde 0 hasta 20 g/100 g) y la presión de homogeneización (desde 0 hasta 150 MPa) ejercen sobre el crecimiento microbiano de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina. En todos los casos, los zumos fueron

inoculados con 4 mL/L de caldo MRS con un contenido microbiano en torno a $1,83 \times 10^9$ UFC/mL.

Como se puede observar, el efecto de la presión de homogeneización sobre la viabilidad del probiótico se vio afectado por la concentración de trehalosa presente en el zumo. En ausencia de trehalosa (Z+0%Treh), el recuento microbiano disminuyó conforme aumentó la presión de homogeneización aplicada. Al incorporar un 10% de trehalosa en peso al zumo (Z+10%Treh), el contenido microbiano se mantuvo constante tras aplicar presiones de homogeneización moderadas (< 100 MPa), pero disminuyó notablemente a presiones de homogeneización elevadas (≥ 100 MPa).

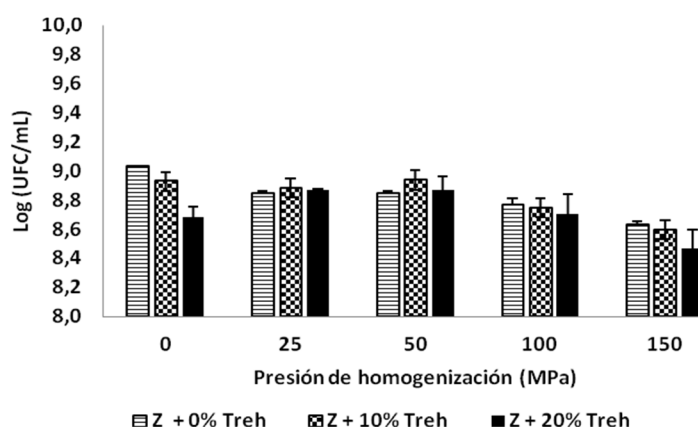


FIGURA 4. Efecto de la concentración de trehalosa y de la presión de homogeneización sobre el crecimiento microbiano de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en zumo de mandarina (var. Clementina).

Finalmente, en los zumos más concentrados en trehalosa (Z+20%Treh), el número de células vivas aumentó con la presión de homogeneización aplicada hasta 50 MPa, valor a partir del cual la supervivencia del probiótico comenzó a disminuir. Estos resultados confirman, por un lado, la efectividad del tratamiento de homogeneización en la inactivación de los microorganismos presentes en determinados alimentos (Considine *et al.*, 2008). Por otro lado, se pone de manifiesto la capacidad de la trehalosa para estabilizar proteínas y membranas lipídicas (Weng y Elliott, 2014), lo que convierten a este disacárido en un uno de los aditivos más versátiles para fines de biopreservación.

Una vez evaluado el efecto de la concentración de trehalosa y de la presión de homogeneización sobre el contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius* presente en el zumo, convendría estudiar el efecto que dichas variables ejercen sobre la resistencia del probiótico al proceso de digestión. En efecto, la resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares es un requisito imprescindible para que las bacterias probióticas lleguen vivas al final del intestino y puedan ejercer efectos inmunomodulares (Amorocho, 2011; Ramasamy *et al.*, 2010).

El primer paso para demostrar las propiedades probióticas de la cepa *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063, consistió en estudiar su

viabilidad ante los jugos gastrointestinales en una simulación *in vitro*. Partiendo de una concentración inicial en caldo MRS en torno $3,4 \times 10^9$ UFC/mL, el microorganismo probiótico no resistió a las condiciones ácidas del estómago más de 10 minutos, tal y como se muestra en la Tabla 5.

TABLA 5. Viabilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 puro durante el proceso de simulación gástrica.

t (min)	0	10	30	60	120
% Viabilidad	0,95	1,10	-	-	-

Los estudios revelan que las cepas sensibles a condiciones ácidas podrían incrementar su viabilidad cuando forman parte de matrices alimentarias (Collado, 2004), en este sentido se decidió estudiar el efecto que producen los componentes del zumo de mandarina (*var.* Clementina) por sí mismos y en combinación con trehalosa y/o la homogenización a 50 MPa sobre la resistencia de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 al proceso digestión.

En la Tabla 6 se muestran los porcentajes de viabilidad obtenidos tras la etapa de simulación gástrica (% Viabilidad pepsina), tras la etapa de simulación intestinal (% Viabilidad pancreatina) y tras el proceso completo de digestión (% Viabilidad acumulada). La resistencia del probiótico al proceso de digestión se vio significativamente incrementada por la presencia del zumo de mandarina. En general, *L. salivarius* spp. *salivarius* resultó significativamente más resistente a la pancreatina (pH = 8) que a la pepsina (pH = 2). Además, al aumentar desde 0 hasta 20 g por 100 g la cantidad de trehalosa presente en el zumo se produjo un ligero descenso en la viabilidad del probiótico tras el tratamiento con pepsina, acompañado de un aumento moderado en la viabilidad del probiótico tras el tratamiento con pancreatina, resultando en valores de viabilidad acumulada similares y en torno a 12,6%.

TABLA 6. Efecto de la trehalosa y/o la homogenización a 50 MPa sobre la viabilidad del *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* inoculado en zumo de mandarina (*var.* Clementina) en el proceso de simulación gastrointestinal.

%Trehalosa	P (MPa)	% Viabilidad pepsina	% Viabilidad pancreatina	% Viabilidad acumulada
Z+0% Treh	0	23,98 ± 0,12 ^b	50,9 ± 0,7 ^a	12,10 ± 0,4 ^a
Z+10% Treh	0	23,3 ± 1,2 ^b	57 ± 4 ^{ab}	13,33 ± 0,9 ^a
	50	32,5 ± 0,7 ^c	85 ± 2 ^d	27,7 ± 0,7 ^b
Z+20% Treh	0	20,6 ± 0,9 ^a	60,3 ± 0,4 ^c	12,42 ± 0,09 ^a

Valores medios ± desviación estándar.

^{a,b,c...} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05).

El % de viabilidad se ha calculado en la etapa gástrica teniendo en cuenta el recuento obtenido al final de esta fase (minuto 120) dividido por la cantidad del inóculo inicial. En la etapa de simulación intestinal el % de viabilidad se calcula teniendo en cuenta los recuentos obtenidos en el último tiempo de simulación (minuto 360) dividido por el recuento precedente de la etapa gástrica. El % viabilidad acumulada está relacionando el recuento final del

(minuto 360) y el inoculo inicial que fue utilizado en el proceso de simulación gástrica.

Los estudios previos de simulación gastrointestinal “*in vitro*” de otras bacterias BAL detallan un % de viabilidad acumulada de 26,2% para *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y de 9,2% para *Streptococcus thermophilus* inoculados en un sustrato lácteo (García, 2010).

Respecto a la aplicación de una etapa de homogeneización a 50 MPa, ésta incrementó significativamente la viabilidad del probiótico tras cada una de las etapas del proceso de digestión y, por lo tanto, tras el proceso completo de digestión. De esta forma se confirma que el tratamiento con presión en dosis subletales induce modificaciones morfológicas y fisiológicas en las células microbianas que aumentan su resistencia a condiciones adversas (Korakli *et al.*, 2002). Jofré *et al.* (2007) sugieren que existe una síntesis de nuevas proteínas como respuesta al estrés inducido por las altas presiones.

En la Figura 5 se muestra la evolución de los porcentajes de viabilidad del probiótico a lo largo del proceso de simulación gástrica (Figura 5A) e intestinal (Figura 5B) para los diferentes tipos tratamiento ensayados.

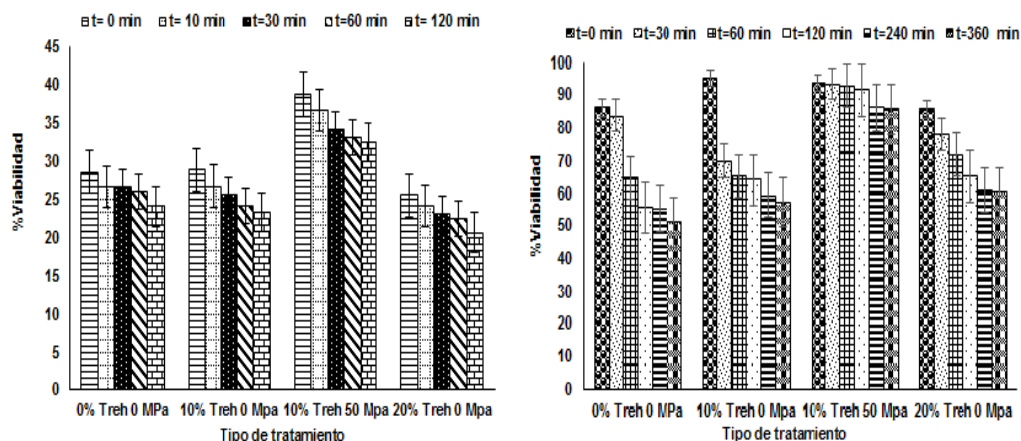


FIGURA 5. Efecto de la trehalosa y de la homogeneización a 50 MPa sobre la evolución del % de viabilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063, a lo largo del proceso de simulación gástrica (A) e intestinal (B).

Como se puede comprobar, el descenso más brusco en la viabilidad del microorganismo se produjo al inicio de cada etapa (t = 0 min) y disminuyó ligeramente en el transcurso de la misma. Este hecho pone de manifiesto que las células de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* inducen sus propios mecanismos de resistencia a las condiciones adversas que se dan durante el proceso de digestión. Se trata de reacciones metabólicas que ayudan a mantener el pH intracelular y que, en el caso de las bacterias ácido-lácticas gram-positivas expuestas a condiciones de estrés ácido, consistiría en la liberación de productos de una fermentación en la que se involucraría la enzima glutamato descarboxilasa (Serrazanetti *et al.*, 2009).

En cualquier caso, todas las muestras de zumo analizadas presentaron al final del proceso de simulación gastrointestinal contenidos en *L. salivarius* spp. *salivarius* del orden de 10^8 UFC/mL, es decir, superior al límite recomendado

por Moreno *et al.*, (2000) entre 10^6 y 10^7 UFC/mL para garantizar que el microorganismo ejerce su efecto probiótico. Faltaría comprobar la capacidad antimicrobiana de la cepa *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 frente al microorganismo patógeno *Helicobacter pylori* NCTC 11637, para lo que se empleó el método de discos descrito en el apartado de material y métodos correspondiente.

En la Tabla 7 se muestra el tamaño de los halos de inhibición obtenidos en el ensayo *in vitro* de actividad antimicrobiana. Como se puede observar, la cepa probiótica objeto de estudio redujo, en todas las condiciones ensayadas, el crecimiento de la cepa patógena. Cabe resaltar la menor actividad antimicrobiana de la muestra control en comparación con las demás muestras. Aunque el aumento en la concentración de trehalosa redujo ligeramente el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento de *H. pylori*, la homogeneización del zumo a 50 MPa produjo un leve aumento en el tamaño de los mismos. Estos resultados evidencian que la producción de sustancias antimicrobianas por parte de la cepa probiótica, básicamente ácidos orgánicos (Cats *et al.*, 2003), se ve favorecida por la composición del zumo de mandarina, así como por la homogeneización del zumo a 50 MPa.

TABLA 7. Efecto de la concentración de trehalosa y de la homogeneización a 50 MPa sobre el tamaño de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana.

Muestra	ϕ (mm)
Control	$17,66 \pm 0,10^a$
Z+0% Treh 0 MPa	$18,17 \pm 0,15^a$
Z+0% Treh 50 MPa	$18,20 \pm 0,10^a$
Z+10% Treh 0 MPa	18 ± 1^a
Z+10% Treh 50 MPa	$18,20 \pm 0,10^a$

Control: caldo MRS inoculado e incubado con *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063

Valores medios \pm desviación estándar.

^{a,b,c...} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05).

Los diámetros de los halos de inhibición son mayores que los obtenidos a través del estudio hecho de (Chen, *et al.*, 2010) cuando se han analizado el efecto antimicrobiano *in vitro* de las cepas de *Lactobacillus plantarum* 18 y *Lactobacillus gasseri* Chen, frente a la misma cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 teniendo como control el medio MRS.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

- El efecto de la incorporación de trehalosa y la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre las propiedades físico-químicas del zumo de mandarina resulta destacable únicamente para la actividad del agua y el tamaño de partícula. En ningún caso se produce un efecto desfavorable sobre las principales características de calidad del zumo.
- El zumo de mandarina comercial, con el pH rectificado a 6,5 y enriquecido con 5 g/L de levadura fresca de panadería, es un medio óptimo para el crecimiento de *L. salivarius* spp. *salivarius*, que además

mejora la resistencia del probiótico durante el proceso de simulación gástrica e intestinal. El crecimiento de la cepa probiótica en el zumo de mandarina también mejoró la producción de sustancias antimicrobianas contra *Helicobacter pylori*.

- Los efectos de la incorporación de trehalosa al zumo de mandarina sobre la viabilidad y resistencia del microorganismo en los procesos de simulación gástrica e intestinal parecen estar relacionados con el aumento del estrés osmótico asociado a la disminución de la actividad del agua que este soluto produce en el zumo. En este sentido, concentraciones de trehalosa de hasta el 10% no tienen un efecto desfavorable, sin embargo concentraciones del 20% sí que resultan perjudiciales.
- En todas las valoraciones microbiológicas realizadas (viabilidad, resistencia gástrica e intestinal y efecto antimicrobiano contra *Helicobacter pylori*), la aplicación de una presión de homogenización de 50 MPa tiene un efecto beneficioso. Modificaciones morfológicas y fisiológicas en las células de *L. salivarius* spp. *salivarius* explicarían la mayor resistencia a condiciones adversas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la inestimable ayuda de los profesores tutores del proyecto y 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”.

Agradezco a mis padres, por la confianza y apoyo recibido en los años de estudio de este Máster.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, Y., Suzuki, A., Kabir, N., Takagi, A.M., and Koga, Y. 1998. Lactic acid mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *American Journal Gastroenterology* 93, 2097-2101.
- Amorcho Cruz, C.M. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica València. *Applied Microbiology*, 26, págs.333-337.
- 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.
- Bathia, S.J., Kochar, N., P., Nair, N.G., Mehta, A.P. 1989. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* “in vitro”. *Journal of Clinical Microbiology* 27(10), 2328-2330.

- 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., 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., Arilla, A., Bénar, 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*. *J. of Food Engin.* 110(2), 289-293.
- Betoret, E., Betoret, N., Carbonell, J. V. 2011. Efecto de la presión de homogenización sobre el tamaño de partícula y las propiedades funcionales de los zumos de cítricos. TFM. Universitat Politècnica València.
- Betoret, E., Betoret, N., Castagnini, J.M., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., Fito, P. 2014. 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.
- Cats, A., Kuipers, E.J., Bosschaert, M.A.R., Pot, R.G.J., Vandenbrouckegrauls, C.M.J.E., Kuster, J.G. 2003. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei* containing milk drink in *Helicobacter pylori* colonized subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 17, 429-435.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract.
- Chen, X., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H.P., Zhang, H., Chen, W. 2010. *In vitro* screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods. *Journal of Dairy Science* 93(12), 5627-5634.
- Collado, M.C., 2004. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Sleator, R.D., 2008. High- pressure processing – effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology* 281, 1-9.
- Corredig, M., Kerr, W. & Wicker, L. 2001. Particle Size Distribution of Orange Juice Cloud after Addition of Sensitized Pectin. *J of Agric and Food Chem.* 48: 4918-4923.
- Crowe, J., Crowe, L., Champan, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science* 223, 209-217.
- Crucet, S., Obregon, M.C., Salazar, G., Diaz, E, Gotteland, M. 2003. Effect of the Ingestion of a Dietary Product Containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* Colonization in Children. *Nutrition* 19, 716-721.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* second edition. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- García Hernández, J., 2010. Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogur. Tesis Doctoral Universitat Politècnica Valencia 2010.
- Gerritz, M., van Vliet A.H.M., Kuipers, E.J., Kusters, J.G. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Diseases* 6, 699-709.
- Glaasker, E., Tjan, F.S.B., Ter Steeg, P.F., Konings, W.N., Poolman, B. 1998. Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *Journal of Bacteriology* 180, 4718–4723.
- Go, M., 2002. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 16, S3-S15.
- Gómez, P.L., Welte-Chanes, J., Alzamora, S.M. 2011. Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology* 2, 447-465.
- Graham, D.Y., Yamaoka, Y., 2000. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter* 5(1), S3-S9.
- Hamilton-Miller, J.M. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *H. pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 360-366.

- International Agency for Research on Cancer.(1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61, 177-240.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganismos de los Alimentos. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios. *Editorial Acirbia, Zaragoza*. Vol. 6. 2000.
- International Dairy Federation (IDF), 1992. Physiological and functional properties of probiotics. *Bulletin of International Dairy Federation*; 272: 17-22.
- Jofré, A., Champomier-Vergès, M., Anglade, P., Baraige, F., Martín, B., Garriga, M., Zagorec, M., Aymerich, T., 2007. Protein synthesis in lactic acid and pathogenic bacteria during recovery from a high pressure treatment. *Res. Microbi.*158, 512-520.
- Kabir, A.M., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miya, T., Koga, Y., 1997. Prevention of *H. pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 41, 49-55.
- Korakli, M., Gänzle, M.G., Knorr, R., Frank, M., Rossmann, A., Vogel, R.F., 2002. Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* under high-pressure: investigations using stable carbon isotopes. In: Hayashi, R.(Ed.), *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, 287-294.
- Kun, Y.L. (2006). *Microbial biotechnology. Principles and applications*. Second. National University of Singapore.
- Lins R.D., Pereira, C.S. Hunenberger, P.H., 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55, 177-186.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H. 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science* 80, 1031-1037.
- Morales, L., Betoret, E., Betoret, N., Barrera C. 2009. Estudio del efecto de la temperatura de secado y el espesor de la muestra sobre la viabilidad de los microorganismos y las propiedades mecánicas de un snack de manzana (cv. Granny Smith) con alto contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. Tesis Final de Máster. Universitat Politècnica de València. Valencia, España.
- Moreno, Y., Hernández, M., Collado, M.C., Hernández, E. 2000. Aplicación de fluorocromos para el estudio de la viabilidad de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL)
- Ohtake, Y., Wang, J., 2011. Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100(6), 2020-2053.
- Patel A., Shah N., Prajapati, J.B, 2013. *Clinical application of Probiotics in the treatment of Helicobacter pylori infection – A brief review*. Dairy Microbiology Department, Shet Mansukhlal Chhaganlal (SMC) College of Dairy Science, Anand Agricultural University, Anand, Gujarat, India.
- Patrignani F., Vannini L., Leroy S., Lanciotti R., Guerzoni M.E. 2009. Effect of high pressure homogenization on *S. cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Micro*. 136, 26–31.
- 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 Fin de Grado, Universitat Politècnica de València.
- Posso, R.D (2013). Evaluación de las propiedades funcionales del tomate mediante un estudio in vitro de simulación gastrointestinal. Tesis Final de Máster, Universitat Politècnica de Valencia.
- Pot, B., Tsakalidou, E., 2009. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. En *Lactobacillus Molecular biology. From genomic to probiotic*. presentes en productos lácteos. *Ars Pharmaceutica*, 41(3), págs.287-292. probiótico. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politècnica de Valencia.
- Rahman, M.S. 2010. Food stability determination by macro–micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. *Journal of Food Engineering* 99, 402-416.
- Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M., Karuthan, C., Wan Ho, Y. 2010. Bile salt desconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens. *Journal Science Food Agriculture*, 90, págs.65–69.
- Serrano, A., Hernández, M.C., De la Garza Salazar, J., Herrera, L.A. 2009. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Cancerología* 4, 193-204.

- Serrazanetti, I. D., Guerzoni, M.E., Corsetti, A., Vogel, R., 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress in lactobacilli. *Food Microbiology* 26, 701–708.
- 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.
- Weng, L. y Elliott, D.G., 2014. Dynamic and thermodynamic characteristics associated with the glass transition of amorphous trehalose-water mixtures. *Phys Chem Chem Phys* 16(23), 1-2.
- You, W., Zhang, L., Gail, M.H., Chang, Y., Liu, W., Ma, J., Li, J., Jin, M., Hu, Y., Yang, C., Blaser, M.J., Correa, P., Blot, W.J., Fraumeni, J.F., Xu, G. 2000. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1607-1612.
- Yuan Kun, L., 2006. Microbial biotechnology. Principles and applications Second., National University of Singapore.
- Zhang, Z., Farthing, M. 2005. The roles of vitamin C in *H. pylori* associated gastric carcinogenesis. *Chinese Journal of Digestive Diseases* 6, 53-58.
- Zojaji, H., Talaie, R., Mirsattari, D., Haghazali, M., Molaei, M., Mohsenian, N., Derakhshan, F., Zali, M.R. 2009. The efficacy of *Helicobacter pylori* eradication regimen with and without vitamin C supplementation. *Digestive and Liver Disease* 41(9), 644-647.