



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

**ESTUDIO DEL ENRIQUECIMIENTO DE MANZANA CON
PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS Y COMPONENTES ANTIOXIDANTES
PROVENIENTES DE ZUMO DE MANDARINA POR IMPREGNACIÓN A
VACÍO PARA EL DESARROLLO DE APERITIVOS ALTAMENTE
FUNCIONALES Y CON BAJO CONTENIDO CALÓRICO**

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
PARA EL DESARROLLO

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

TESIS DOCTORAL

Realizada por: Indira Milagros Betalleluz Pallardel

Dirigida por: Dra. Noelia Betoret Valls
Dr. Pedro Fito Maupoey

Valencia, Diciembre 2015

A mi familia, motor y eje de mi vida, especialmente a mis adorados padres Sergio y Gloria, por el cariño incondicional, sus enseñanzas y los valores que me inculcaron siempre han guiado mis pasos y hoy me permite culminar esta etapa. Mis hermanos, Maritza, Irina Lincoln y a quien ya considero como tal Merissy que son un soporte importante de mi vida, soy afortunada en tenerlos a mi lado.

A Sergito y Lucianita, mis sobrinos, una de las razones de vivir y quienes desde que llegaron han traído más felicidad a mis días.

A Pedro y Noelia, mis asesores, por la confianza depositada, por la oportunidad de trabajar en su Laboratorio, por el apoyo, los consejos y ayuda brindada en estos años y por la amistad que espero sigamos cultivándola.

A la Fundación Carolina, por la beca brindada que ha permitido cumplir este objetivo, por el seguimiento, preocupación y apoyo en estos años por su personal con mención especial a Juan.

A las amigas que este doctorado me permitió ganar, tesoro que me dejó esta experiencia en especial a Milagro Reig gracias por tu compañía, soporte y cariño estos años, tu disponibilidad a escucharme, tus consejos, palabras de aliento han contribuido a la culminación de esta etapa. A Lia compañera en esta aventura, con quien hemos compartido experiencias personales que me ha enriquecido. Vuestra amistad me enorgullece.

A mis amigos de los diferentes laboratorios representados por Carolina, vuestra amistad e importante apoyo técnico aligera los días de trabajo intenso. A Monika y Diana, amigas queridas gracias por su gran ayuda.

Gracias a Dios por hacerme sentir bendecida cada día, por darme los instrumentos y señalarme el camino, ha sido duro pero con su compañía y de todas las personas que puso en este trayecto he llegado al final.

Resumen

Resumen

En los tiempos actuales, el desarrollo de los alimentos que promuevan la salud y el bienestar es una de las prioridades claves de la industria alimentaria. La técnica de impregnación al vacío (VI) es considerada como una herramienta en el desarrollo de nuevos productos a partir de frutas o vegetales, en donde se puede enriquecer o incorporar ingredientes nutricionales y funcionales modificando su composición para cumplir requisitos específicos de salud, de una manera rápida y sencilla. En ese sentido, la presente investigación se enmarca en el desarrollo de dos propuestas de aperitivos funcionales como alternativa a los productos comerciales existentes en el mercado que se caracterizan por su alto contenido de grasa saturada, sal, azúcar refinada y alta densidad energética y cuyo consumo tiene consecuencias negativas para la salud. Los objetivos planteados para este desarrollo fueron en una primera etapa estudiar la viabilidad de la técnica de IV para incorporar un prebiótico: oligofructosa (Orafti P95) en manzana (var. *Granny Smith*) y en una segunda etapa desarrollar un zumo simbiótico a partir de mandarina enriquecido con oligofructosa e inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* para su incorporación a la manzana por IV a fin de potenciar la funcionalidad natural de esta fruta. Para su presentación como aperitivo en ambos desarrollos se evaluó la estabilidad en procesos de secado y almacenamiento.

El primer desarrollo se inició con el estudio de la influencia de diferentes variables del proceso de IV como: la presión de vacío (PV), la concentración de las soluciones de impregnación (CS), la duración de la aplicación de la presión de vacío y la presión atmosférica (t_1 y t_2 respectivamente) y la variedad de manzana, empleándose disoluciones de oligofructosa (Orafti P95). Como era de esperarse hubo una mayor incorporación de sólidos con el aumento de la concentración de la disolución y a la vez una pérdida de agua bajo las concentraciones más altas, permitiendo tener control sobre el grado de impregnación. En los rangos estudiados no se

encontró efecto significativo para las variables: PV, t_1 y t_2 . Asimismo, se determinaron los parámetros de impregnación con disoluciones isotónicas. La variedad Fuji y Granny Smith fueron seleccionadas por sus características fisicoquímicas y su nivel de impregnación, bajo una solución isotónica se logró un contenido de 5.7 y 5.1% de oligofructosa respectivamente. El producto presentó una buena estabilidad sin cambios significativos en el contenido del prebiótico después de un secado a 40°C por 24 horas, así como el mantenimiento de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales después de 4 meses de almacenamiento.

El segundo desarrollo se inició con el estudio de la formulación de la solución de impregnación; se evaluaron los factores: fuente y concentración de proteína, cantidad inicial de inóculo y concentración del prebiótico. Los resultados obtenidos señalan a la levadura de cerveza como la fuente de proteína más apropiada, la cantidad de inóculo no tiene efecto significativo en el recuento final y la presencia de oligofructosa a concentraciones elevadas ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del microorganismo. Las características iniciales del zumo formulado para el crecimiento del probiótico fueron pH de 6, 0.5% de levadura de cerveza, 0.4% v/v de inóculo y 5% de oligofructosa.

Adicionalmente, fue estudiado el efecto de la incubación del zumo formulado con *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius*, sobre las propiedades físico-químicas y funcionales y se evaluó la reutilización del mismo líquido en 5 ciclos de impregnación a vacío. El zumo formulado resultó un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo cuyo contenido inicial aumentó en 2 ciclos logarítmicos obteniéndose un recuento de 8.9 log UFC/mL. El crecimiento se evidenció por las variaciones en el pH, sólidos solubles y azúcares reductores, las variaciones en otras propiedades (color, densidad, a_w , viscosidad) fueron mínimas. La incubación tuvo un efecto significativo en la capacidad antioxidante donde fue detectado un aumento de 4.6% y 26.7% bajo las metodologías de FRAP y DDPH respectivamente, el método de ABTS por el contrario evidenció un descenso de 23%. El contenido de ácido ascórbico, por su naturaleza oxidativa, descendió en un 4.5%, mientras que el contenido de flavanonas, por su carácter estable, no presentó cambios significativos. Durante la

reutilización del líquido en varios ciclos de impregnación las propiedades físicas presentaron cambios mínimos, se observaron cambios significativos en las propiedades funcionales con un descenso en la actividad antioxidante (10.6%, 2.5% y 7.5 % evaluados por la metodologías de: FRAP, DPPH y ABTS respectivamente), en el contenido de ácido ascórbico (17.4%) y fenoles (4.6%). No hubo cambios significativos en el contenido de flavanonas y oligofructosa. Se ha demostrado tanto experimentalmente como a través de cálculo teórico la conveniencia del líquido simbiótico para el enriquecimiento de manzana por la técnica de impregnación a vacío. Sin embargo, el secado a 40 °C durante 24 horas produce cambios importantes en las propiedades funcionales, fisicoquímicas y sensoriales. El contenido en probiótico en el producto seco fue superior a 10⁶ UFC/g al iniciar el almacenamiento, nivel que descendió en los primeros 15 días del estudio. A partir de este momento no se encontraron recuentos. Con respecto al resto de propiedades funcionales evaluadas, únicamente el contenido en ácido ascórbico disminuyó de forma acusada a partir de los 30 días de almacenamiento. En estudios previos se ha demostrado que la actividad del agua y la humedad son parámetros críticos que afectan la viabilidad del probiótico. La valoración funcional de los aperitivos desarrollados los presentan como alternativas saludables y de importante contribución al enriquecimiento de la dieta, no obstante se hace necesario evaluaciones in vitro e in vivo para demostrar su eficacia

Resum

En els actuals moments, el desenvolupament dels aliments que promoguin la salut i el benestar és una de les prioritats claus de la indústria alimentària. La tècnica d'impregnació al buit (VI) és considerada com una eina en el desenvolupament de nous productes a partir de fruites o vegetals, on es pot enriquir o incorporar ingredients nutricionals i funcionals modificant la seva composició per complir requisits específics de salut, d'una manera ràpida i senzilla. En aquest context la present investigació s'emmarca en el desenvolupament de dues propostes d'aperitius

funcionals com a alternativa als productes comercials existents en el mercat que es caracteritzen pel seu alt contingut de greix saturat, sal, sucre refinada i alta densitat energètica i el consum té conseqüències negatives per a la salut. Els objectius plantejats per a aquest desenvolupament van ser en una primera etapa estudiar la viabilitat de la tècnica d'IV per incorporar un prebiòtic: oligofructosa (Orafti P95) en poma (var. Granny Smith) i en una segona etapa desenvolupar un suc simbiòtic a partir de mandarina enriquit amb oligofructosa i inoculat amb *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* per la seva incorporació a l'illa per IV a fi de potenciar la funcionalitat natural d'aquesta fruita. Per a la seva presentació com a aperitiu en els dos desenvolupaments es va avaluar l'estabilitat en processos d'assecatge i emmagatzematge.

El primer desenvolupament es va iniciar amb l'estudi de la influència de diferents variables del procés d'IV com: la pressió de buit (PV), la concentració de les solucions d'impregnació (CS), la durada de l'aplicació de la pressió de buit i la pressió atmosfèrica (t_1 i t_2 respectivament) i la varietat de poma, emprant dissolucions de oligofructosa (Orafti P95). Com era d'esperar hi va haver una major incorporació de sòlids amb l'augment de la concentració de la dissolució i alhora una pèrdua d'aigua sota les concentracions més altes, permetent tenir control sobre el grau d'impregnació. En els rangs estudiats no es va trobar efecte significatiu per les variables: PV, t_1 i t_2 . Així mateix, es van determinar els paràmetres d'impregnació amb dissolucions isotòniques. La varietat Fuji i Granny Smith van ser seleccionades per les seves característiques fisicoquímiques i el seu nivell d'impregnació, sota una solució isotònica es va aconseguir un contingut de 5.71 i 5.1% de oligofructosa respectivament. El producte va presentar una bona estabilitat sense canvis significatius en el contingut del prebiòtic després d'un assecat a 40 ° C per 24 hores, així com el manteniment de les propietats fisicoquímiques i funcionals després de 5 mesos d'emmagatzematge.

El segon desenvolupament es va iniciar amb l'estudi de la formulació de la solució d'impregnació es van avaluar els factors: font i concentració de proteïna, quantitat inicial de inòcul i concentració del prebiòtic. Els resultats obtinguts assenyalen al llevat de cervesa com la font de proteïna més apropiada, la quantitat d'inòcul no té efecte

significatiu en el recompte final i la presència de oligofructosa a concentracions elevades exerceix un efecte inhibitori. Les característiques inicials del suc formulat per al creixement del probiòtic van ser pH de 6, 0.5% de llevat de cervesa, el 0.4% v/v de inòcul i 5% de oligofructosa.

Adicionalment, va ser estudiat l'efecte de la incubació del suc formulat amb *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* sobre les propietats fisicoquímiques i funcionals i es va avaluar la reutilització del mateix líquid en 5 cicles d'impregnació a buit. El suc formulat resultar un mitjà adequat per al creixement del microorganisme el contingut inicial va augmentar en 2 cicles logarítmics obtenint un recompte de 8.9 log UFC/mL. El creixement es va evidenciar per les variacions en el pH, sòlids solubles i sucres reductors, les variacions en altres propietats (color, densitat, aw, viscositat) van ser mínimes. La incubació va tenir un efecte significatiu en la capacitat antioxidant on va ser detectat un augment de 4.6% i 26.7% sota les metodologies de FRAP i DDPH respectivament, el mètode de ABTS per contra va evidenciar un descens de 23%. El contingut d'àcid ascòrbic per la seva naturalesa oxidativa, va baixar en un 4.5%, mentre que el contingut de flavanonas pel seu caràcter estable no presentar canvis significatius. Durant la reutilització del líquid en diversos cicles d'impregnació les propietats físiques van presentar canvis mínims, es van observar canvis significatius en les propietats funcionals amb un descens en l'activitat antioxidant (10.6%, 2.5% i 7.5% per FRAP, DPPH i ABTS respectivament), en el contingut d'àcid ascòrbic (17.4%) i fenols (4.6%). No hi va haver canvis significatius en el contingut de flavanonas i oligofructosa. S'ha demostrat tant experimentalment com a través de càlcul teòric la conveniència del líquid simbiòtic per a l'enriquiment de poma per la tècnica d'impregnació al buit. No obstant això, l'assecat a 40 ° C durant 24 hores produeix canvis importants en les propietats funcionals, fisicoquímiques i sensorials. El contingut en probiòtic en el producte sec va ser superior a 106 UFC / g en iniciar l'emmagatzematge, nivell que va descendir en els primers 15 dies de l'estudi. A partir d'aquest moment no es van trobar recomptes. Pel que fa a la resta de propietats funcionals avaluades, únicament el contingut en àcid ascòrbic va disminuir de forma acusada a partir dels 30 dies d'emmagatzematge En estudis previs

s'ha demostrat que l'activitat de l'aigua i la humitat són paràmetres crítics que afecten la viabilitat del probiòtic. La valoració funcional dels aperitius desenvolupats els presenten com alternatives saludables i d'important contribució a l'enriquiment de la dieta.

Abstract

In modern times, the development of foods that promote health and well-being is one of the key priorities of the food industry. (VI) Vacuum impregnation technique is considered to be a tool in the development of new products from fruits or vegetables, from where you can enrich or incorporate nutritional and functional ingredients by changing its composition to meet specific requirements of health, in a fast and easy way. In this context this research is framed in the development of two proposals for functional snacks as an alternative to the commercial products on the market that are characterized by their high content of saturated fat, salt, refined sugar and high energy density and whose consumption has negative consequences for health. The goals set for this development were initially studying the feasibility of the technique of IV to incorporate a prebiotic: oligofructose (Orafti P95) in apple (var. Granny Smith) and a second stage to develop a symbiotic juice from mandarin oligofructose enriched and inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* for incorporation into the apple by IV in order to enhance the natural functionality of this fruit. The processes of drying and storage stability were evaluated for its presentation as an appetizer in both developments.

The first development began with the study of the influence of different variables of the process IV as: pressure of vacuum (PV), the concentration of solutions of impregnation (CS), the duration of application of vacuum pressure and atmospheric pressure (t_1 and t_2 respectively) and the variety of apple, dissolutions of OLIGOFRUCTOSE (Orafti P95). As expected, there was a greater incorporation of solids with the increase of the concentration of the solution and at the same time a

loss of water under the highest concentrations, allowing control about the degree of impregnation. In the ranges studied found no significant effect for the variables: PV, t_1 and t_2 . Also determined the parameters of impregnation with isotonic solutions. Fuji and Granny Smith variety were selected by their physicochemical characteristics and their level of impregnation, under an isotonic solution was achieved a 5.7 content and oligofructose 5.1% respectively. The product presented stability without significant changes in the contents of the prebiotic after drying at 40 ° C for 24 hours, as well as the maintenance of its physicochemical and functional properties after 4 months of storage.

The second development began with the study of the formulation of the solution of impregnation, the factors were evaluated: source and concentration of protein, initial quantity of inoculum and concentration of the prebiotic one. The obtained results indicate to the yeast of beer like the most appropriate source of protein, the quantity of inóculo it does not have significant effect in the final count and the presence of oligofructose to high concentrations exercises an inhibitory effect. The initial characteristics of the juice formulated for the growth of the probiótico were pH of 6, 0.5 % of yeast of beer, 0.4 % v/v of inóculo and 5 % of oligofructose.

Additionally, there was studied the effect of the incubation of the juice formulated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* on the physical-chemical and functional properties and there was evaluated the recycling of the same liquid in 5 impregnation cycles of vacuum impregnation. The formulated juice turned out to be a way adapted for the growth of the microorganism which initial content increased in 2 logarithmic cycles an inventory of 8.9 being obtained log UFC/mL. The growth was demonstrated by the changes in the pH, solid soluble and sugar differentials, the changes in other properties (color, density, a_w , viscosity) they were minimal. The incubation had a significant effect in the antioxidant capacity where there was detected an increase of 4.6 % and 26.7 % under the methodologies of FRAP and DDPH respectively, the ABTS method on the contrary demonstrated a descent of 23 %. The ascorbic acid content, by its nature oxidative, fell by 4.5 %, while the content of flavanones, by its character stable, did not presented significant changes.

During the recycling of the liquid in several impregnation cycles, the physical properties presented minimal changes; significant changes were observed in the functional properties with a descent in the antioxidant activity (10.6 %, 2.5 % and 7.5 % for FRAP, DPPH and ABTS respectively), in the content of ascorbic acid (17.4 %) and phenols (4.6 %). There were no significant changes in the flavanonas content and oligofructose.

It has been shown both experimentally and through theoretical calculation the desirability of the liquid symbiotic for the enrichment of apple for the impregnation technique in a vacuum. The content in probiotic in the dried product was greater than 10^6 CFU/g at the start of the storage, level which fell in the first 15 days of the study. From this time there were no counts. With respect to the rest of functional properties evaluated, only the content in ascorbic acid decreased sharply from the 30 days of storage. In previous studies, it has been shown that the activity of water and humidity e critical parameters that affect the viability of the probiotic. The functional assessment of the snacks developed are presented as healthy alternatives and important contribution to the diet enrichment; however it is important to evaluate them by in vitro exams in order to demonstrate its efficiency.

Indice general

Resumen	V
Indice general.....	XIII
Indice de Figuras.....	XVII
Indice de Tablas	XIX
I. Introducción	3
1. Introducción.....	3
1.1 Mercado actual y tendencias mundiales en el desarrollo de alimentos funcionales.	3
1.2 Alimentos funcionales y salud: una perspectiva desde la interacción de los prebióticos, probióticos y fitoquímicos con la microbiota intestinal y sus consecuencias en la salud humana	26
1.3 Percepción del consumidor respecto a los alimentos funcionales	30
1.4 Probióticos, prebióticos y simbióticos en el mercado de alimentos funcionales	32
1.5 Desarrollo de alimentos no lácteos con incorporación de prebióticos y probióticos	40
1.6 La impregnación a vacío (IV) como técnica en el desarrollo de alimentos funcionales	51
II. Objetivos y Plan de Trabajo	59
2. Objetivos y plan de Trabajo	61
2.1 Justificación e interés social de la tesis doctoral	61
2.2 Objetivos	70
2.3 Plan de Trabajo	71
III. Métodos Analíticos y Equipos	84
3. Métodos Analíticos y Equipos.....	86
3.1 Análisis fisicoquímicos	86

3.2	Análisis funcional	89
3.3	Preparación de los cultivos microbiológicos y análisis microbiológicos	92
3.4	Análisis estadístico	93
IV.	Resultados y Discusión	94
4.	Desarrollo de un aperitivo de manzana con prebióticos	96
4.1	Caracterización de las variedades de manzana y evaluación de la conveniencia para el proceso.	96
4.2	Caracterización de las soluciones de impregnación	101
4.3	Efecto de parámetros del proceso en el grado de impregnación.	104
4.4	Determinación de los parámetros de impregnación característicos: la fracción volumétrica de muestra impregnada con líquido (X), la deformación volumétrica de la muestra (γ) y la porosidad eficaz (ε) y aplicación del modelo de mecanismo hidrodinámico para estimar el contenido de fructooligosacárido impregnado	112
4.5	Efecto del secado sobre la estabilidad del prebiótico y caracterización del producto impregnado y seco: color y textura	115
4.6	Estabilidad del producto impregnado seco después de 4 meses de almacenamiento	118
5.	Desarrollo de un aperitivo de manzana simbiótico con propiedades antioxidantes adicionales	123
5.1	Desarrollo del líquido de impregnación simbiótico a base de zumo de mandarina	123
5.2.	Estudio de la reutilización del líquido de impregnación: efecto de los ciclos de impregnación sobre las propiedades funcionales	155
5.3	Estudio de la estabilidad de las propiedades físico-químicas y contenido de probiótico del líquido de impregnación almacenado en refrigeración	160
5.4	Evaluación del grado de enriquecimiento en las muestras impregnadas. Aplicación del modelo hidrodinámico para la estimación y confirmación con análisis químico.	165
5.5	Estabilización del producto impregnado por secado por aire caliente. Efecto sobre el contenido de microorganismos probióticos. Selección de la temperatura	169
5.6	Estudio del efecto de la impregnación a vacío y secado por aire caliente sobre las propiedades ópticas, mecánicas y funcionales del aperitivo de manzana	175
5.7	Valoración nutricional y funcional del aperitivo desarrollado	188

5.8 Estabilidad de las propiedades funcionales del aperitivo de manzana durante almacenamiento.	208
V. Conclusiones	233
6. Conclusiones	235
VI. Bibliografía	239

Índice de Figuras

Figura 1. 1 Ciclo de sucesos en el desarrollo de alimentos funcionales (De Jones y Jew, 2007).....	18
Figura 1. 2 Tres principales actores involucrados en el proceso de investigación y desarrollo para el diseño de alimentos funcionales (De Bigliardi y Galati, 2013).....	22
Figura 1.3 Interacciones de los componentes alimenticios funcionales con la microflora colónica para la manifestación de sus efectos saludables (De Puupponen-Pimia et al., 2002)	30
Figura 1. 4 Propiedades deseables en las bacterias probióticas (De Puupponen-Pimia et al., 2002)	34
Figura 1.5 Beneficios atribuidos a los microorganismos probióticos (De Granato et al., 2010).....	36
Figura 1.6 Beneficios para la salud de los oligosacáridos prebióticos (De Kothari, Patel y Goyal, 2014).....	39
Figura 1. 7 Flujo de procesado bajo la técnica de impregnación a vacío (De Zhao y Xie, 2004)	54
Figura 2.1 Esquema del Plan de Trabajo Primera Parte: Desarrollo de Aperitivo de manzana con prebiótico.....	73
Figura 2.2 Esquema del Plan de Trabajo Segunda Parte: Desarrollo de Aperitivo de manzana con propiedades funcionales adicionales (zumo de mandarina + probiótico + prebiótico).....	74
Figura 4. 1 Sólidos incorporados por impregnación y relación con la porosidad en variedades de manzana.	99
Figura 4. 2 Relación de las características fisicoquímicas: A) sólidos solubles, B) densidad, C) viscosidad aparente y D) actividad de agua de las disoluciones de impregnación con la concentración de oligofructano.....	102
Figura 4. 3 Balance de Masa: Variación del contenido de agua y soluto ($\Delta M_w + \Delta M_s$) graficado contra variación de masa total (ΔM_t)	105
Figura 4. 4 Efecto de la concentración de la disolución de impregnación sobre el grado de impregnación y algunas características del producto impregnado.	111

Figura 4. 5 Contenido de oligofructano de manzanas var. Granny Smith impregnadas al vacío e impregnadas y seca a 40°C después de 12 y 24 h.....	116
Figura 4. 6 Parámetros de textura para manzanas var. Granny Smith frescas, impregnadas e impregnadas secas y con oligofructosa y curvas de fuerza-deformación.	118
Figura 5. 1 Cinética de crecimiento microbiano de <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 en zumo de mandarina con oligofructosa a 37°C por 24 horas	137
Figura 5. 2 Evolución del pH durante la incubación de zumo de mandarina con niveles de oligofructosa y <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063	138
Figura 5. 3 Espectro de reflectancia de zumo de mandarina formulado e incubado con <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 a 37 °C durante 0, 12 y 24 horas.....	146
Figura 5. 4 Cromatograma HPLC a 280 nm de manzana fresca y manzana impregnada.	169
Figura 5. 5 Efecto de la temperatura y tiempo de secado sobre el contenido de probiótico <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063.....	171
Figura 5. 6 Evolución del contenido de materia seca y aw durante el secado de rodajas de manzana impregnada con probiótico <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 a 40°C	173
Figura 5. 7 Evolución del contenido y porcentaje de supervivencia durante el secado de rodajas de manzana impregnadas con probiótico <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 a 40°C	173
Figura 5. 8 Curvas fuerza-deformación obtenidas en el ensayo de punción de muestras de manzana fresca, impregnada (IV) y seca (SAC).....	181

Indice de Tablas

Tabla 1. 1	Razones que explican el auge creciente de los alimentos funcionales	5
Tabla 1. 2	Componentes funcionales de los alimentos, fuentes y beneficios potenciales	13
Tabla 1. 3	Propuestas alimenticias no lácteas para el desarrollo o soporte de microorganismos probióticos.....	43
Tabla 1. 4	Métodos de incorporación de probióticos en matrices alimentarias	48
Tabla 1. 5	Ejemplos de aplicación de la técnica de impregnación a vacío para modificar propiedades fisicoquímicas y atributos sensoriales.	55
Tabla 1. 6	Ejemplos de aplicación de la impregnación a vacío para modificar las propiedades saludables y funcionales de frutas y vegetales. ...	57
Tabla 2. 1	Concentración de las disoluciones de impregnación	76
Tabla 2. 2	Diseño experimental seguido para el estudio del efecto de la duración de la etapa a presión de vacío (t_1) y la etapa a presión atmosférica (t_2)	78
Tabla 2. 3	Diseño experimental seguido para el estudio del efecto de la concentración de la disolución y la presión de vacío.....	78
Tabla 4. 1	Caracterización fisicoquímica de diferentes variedades de manzana y evaluación del nivel de incorporación de oligofructosa después de la IV.....	97
Tabla 4. 2	Caracterización fisicoquímica de las disoluciones de impregnación	101

Tabla 4.3	Modelos ajustados y propuestos para las relaciones de las propiedades y la concentración de las disoluciones de impregnación.....	103
Tabla 4. 4	Efecto del tiempo de proceso (t_1 , t_2) sobre los sólidos incorporados y la variación del contenido de agua	107
Tabla 4. 5	Efecto de la concentración de la disolución de impregnación y la presión de vacío sobre los sólidos incorporados, la variación del contenido de agua y algunas características en el producto impregnado.	109
Tabla 4. 6	Valores promedios de sólidos incorporados, variación del contenido de agua y algunas características del producto final en función de la concentración de la disolución de impregnación.	110
Tabla 4. 7	Parámetros de impregnación para rodajas de manzana Fuji y Granny Smith var. con disoluciones isotónicas de oligofructosa .	113
Tabla 4. 8	Contenido teórico, contenido por análisis químico de oligofructosa y algunas propiedades fisicoquímicas en rodajas de manzanas impregnadas var. Granny Smith con disoluciones isotónicas de oligofructosa	115
Tabla 4. 9	Atributos de color en rodajas de manzana var. Fuji, frescas, impregnadas e impregnadas y secas.....	117
Tabla 4. 10	Efecto del almacenamiento a 25 °C sobre las características físicas y funcionales del aperitivo prebiótico.....	119
Tabla 5.1	Consideraciones positivas y negativas para la selección de frutas como vehículos alternativos de microorganismos probióticos.	124
Tabla 5. 2	Efecto de la fuente y el nivel de proteína en el crecimiento del probiótico y descenso de pH después de la incubación de zumo de mandarina a 37°C por 24 horas.....	129
Tabla 5. 3	Valores comparativos del contenido microbiano (log UFC/mL) en el líquido de impregnación seleccionado con ajuste de pH y fortificación con proteína.....	130
Tabla 5. 4	Efecto del nivel de inóculo sobre el desarrollo microbiano y descenso del pH.....	132
Tabla 5. 5	Caracterización del medio de impregnación y el producto impregnado con disoluciones de diferentes concentraciones de producto comercial ORAFTI P95 como fuente de oligofructosa.	134

Tabla 5. 6	Efecto de la concentración de oligofructosa en el desarrollo microbiano de <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 durante la incubación de zumo de mandarina.....	135
Tabla 5. 7	Parámetros cinéticos bajo el Modelo de Gompertz para crecimiento de <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 en zumo de mandarina con niveles de oligofructosa incubada a 37°C por 24 horas.....	138
Tabla 5. 8	Efecto del tiempo de incubación de zumo de mandarina formulado con <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 a 37° C sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas	141
Tabla 5. 9	Efecto del tiempo de incubación de zumo de mandarina formulado con <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 a 37°C sobre las propiedades ópticas	148
Tabla 5. 10	Efecto del tiempo de incubación de zumo de mandarina formulado con <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> CECT 4063 a 37°C sobre las propiedades funcionales.....	150
Tabla 5. 11	Efecto de la reutilización del líquido de impregnación en las propiedades físico-químicas y microbiológicas.....	156
Tabla 5. 12	Efecto de la reutilización sobre las propiedades funcionales del líquido de impregnación.....	157
Tabla 5. 13	Efecto de la reutilización sobre las propiedades ópticas del líquido de impregnación inicial y tras los cinco ciclos de impregnación ensayados	159
Tabla 5.14	Propiedades físico-químicas y contenido del microorganismo probiótico del líquido de impregnación durante almacenamiento bajo refrigeración.....	163
Tabla 5. 15	Valores teóricos y experimentales del contenido microbiano y de compuestos funcionales del líquido de impregnación y de las manzanas fresca e impregnada.	168
Tabla 5. 16	Contenido de humedad, actividad del agua (aw) y contenido de probiótico en el líquido de impregnación y en las muestras de manzana fresca, impregnada (IV) y seca (SAC) var. Granny Smith.	175
Tabla 5. 17	Valores medios de las coordenadas de color L*, a*, b* y de las magnitudes tono (h*ab) y croma (C*ab), de manzana fresca, manzana impregnada (IV) y manzana seca (SAC) var. Granny Smith. Diferencias de color (ΔE) respecto a la muestra obtenida en la etapa anterior.....	178

Tabla 5. 18 Contenido de los compuestos funcionales: ácido L-ascórbico, oligofructosa, hesperidina, fenoles y actividad antioxidante en manzana fresca, manzana impregnada (IV) y manzana seca (SAC) var. Granny Smith.....	182
Tabla 5. 19 Estimación de la composición proximal del líquido de impregnación, manzana fresca, manzana impregnada, aperitivo desarrollado.....	197
Tabla 5. 20 Evaluación funcional del líquido de impregnación, manzana fresca, manzana impregnada y aperitivo desarrollado	203
Tabla 5. 21 Composición proximal y calorías del aperitivo desarrollado y comparativo con aperitivos comerciales por 100 g.....	206
Tabla 5. 22 Evolución de la humedad, actividad del agua (aw) y contenido del microorganismo probiótico de las muestras secas (SAC), en función del tiempo de almacenamiento.....	208
Tabla 5. 23 Evolución de las coordenadas de color L*, a*, b* y de las magnitudes tono (h*ab) y croma (C*ab), en función del tiempo de almacenamiento. Diferencias de color (ΔE) respecto a la muestra inicial (tiempo 0).	218
Tabla 5. 24 Evolución de las propiedades mecánicas: Fuerza máxima (N), distancia (mm) y área (N·mm) de las muestras secas (SAC), en función del tiempo de almacenamiento.	222
Tabla 5. 25 Evolución de los compuestos funcionales: ácido L-ascórbico, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, hesperidina y oligofructosa en función del tiempo de almacenamiento.	224

Parte I

Introducción

Capítulo I

1. Introducción

La siguiente revisión se centra en el desarrollo de los temas en que se enmarca la presente investigación y que justifican el planteamiento de sus objetivos. Describe los cambios de la percepción que tienen los consumidores actuales del rol de los alimentos que consumen, que no solo incluye los aspectos nutricionales sino que denota el conocimiento de la relación estrecha con la mejora de funciones fisiológicas y con la prevención de enfermedades. Dentro de este marco se describe la percepción, exigencias y expectativas del consumidor respecto a los alimentos funcionales. La respuesta del mundo científico, la industria, el mercado y las entidades públicas reguladoras para hacer frente a estas demandas, permitiendo integrar las bases científicas de campos como: la mercadotecnia, la medicina, la nutrición y la ciencia, tecnología e ingeniería de alimentos para desarrollar alimentos innovadores que incluyan procesos que preserven los compuestos bioactivos de demostrada acción en el organismo y que estén dirigidos además del público en general a una población de exigencias especiales. Finalmente, se describe los desarrollos propuestos a partir de una técnica innovadora como la impregnación a vacío para la modificación de matrices vegetales promoviendo cambios nutricionales funcionales y además sensoriales, demostrando la versatilidad de la misma.

1.1 Mercado actual y tendencias mundiales en el desarrollo de alimentos funcionales.

No obstante que la relación alimentación- salud fue reconocida por la medicina china y desde las épocas en que el sabio griego Hipócrates aseguraba: *Que tus*

alimentos sean tu medicina y los medicamentos tu alimento, el mayor auge del significado de esta expresión se ha dado en los últimos años y ha tenido una mayor repercusión en el desarrollo de nuevos alimentos, entre los que se encuentran los llamados funcionales, gracias a que actualmente se dispone de evidencia científica que demuestra la relación entre alimentación y salud.

Actualmente, los alimentos funcionales son una de las categorías de alimentos más importantes en el mercado global de la salud y bienestar y con un potencial de crecimiento futuro por lo que se ha convertido en una de las áreas más interesantes, atractivas y foco de las investigaciones y el desarrollo de nuevos productos. Prueba de ello son las numerosas y crecientes publicaciones en este campo y los nuevos productos que se han venido introduciendo en el mercado. Dada la tendencia de los consumidores a exigir alimentos con beneficios adicionales para mejorar la salud, el bienestar y la calidad de vida, las grandes empresas alimentarias están invirtiendo en el desarrollo de alimentos funcionales (Jones y Jew, 2007; Siró et al., 2008).

Este auge y las previsiones optimistas de crecimiento del mercado viene justificado no sólo por la conciencia que tienen los consumidores de que llevar una vida sana incluyendo sus dietas contribuye a reducir el riesgo de padecer enfermedades y potenciar un estado de salud y bienestar (Regmi y Gehlhar, 2005; Sadler, 2005), sino también por una serie de cambios socioeconómicos y demográficos como: el aumento de la esperanza de vida, aumento del poder adquisitivo en países emergentes y el incremento de costos médicos.

La mayor esperanza de vida y los cambios en el estilo de vida han llevado a un aumento de la incidencia de enfermedades crónicas tales como: obesidad, osteoporosis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y diabetes (Shimizu, 2003). Este panorama ha orientado los esfuerzos de los gobiernos, los investigadores, los profesionales de diferentes áreas relacionadas, entidades de salud y la industria que han encontrado en la alimentación la manera de revertir esta situación (Ares et al., 2008).

En la tabla 1.1 se resume las razones que están provocando una mayor demanda de alimentos que proporcionen salud, mejoren el bienestar y reduzcan el riesgo de desarrollar enfermedades o dolencias.

Tabla 1. 1 Razones que explican el auge creciente de los alimentos funcionales

- Los consumidores se preocupan por la salud, y reconocen el vínculo entre alimento y salud, desean prevenir en lugar de curar las enfermedades, por lo que buscan alimentos con mayor valor agregado además del nutricional.
- Las organizaciones encargadas de legislar en materia de alimentos están reconociendo los beneficios de los alimentos funcionales en la salud pública.
- Reconocimiento del potencial económico de este rubro por las entidades gubernamentales como una estrategia de prevención de la salud pública.
- Los costes médicos se incrementan cada vez más. Búsqueda de alternativas a la medicina convencional basada en la prevención.
- Aumento de la esperanza de vida. La población en países industrializados está envejeciendo, por lo que existe una mayor preocupación en temas de calidad de vida y mantenimiento de la salud.
- Los consumidores desean contrarrestar el incremento notable en los riesgos medioambientales de polución, microbios y sustancias químicas en el aire, agua y alimentos.
- Avances tecnológicos, entre ellos la biotecnología, así como la investigación científica que documenta la eficacia de estos alimentos.
- Estilos de vida (falta de tiempo para cocinar, ritmo de vida acelerado, enorme oferta de alimentos que hacen difícil la toma de decisiones) que han conducido a desequilibrios y desórdenes alimentarios

Adaptado de Sander, (1998)

La estimación del tamaño del mercado no es sencilla, especialmente por no existir un consenso global respecto a la definición de alimentos funcionales. Es así como pueden encontrarse en diversas publicaciones cifras y proyecciones que varían de forma significativa. Dentro de las publicaciones que registran la evolución del mercado mundial pueden mencionarse a: Sloan (2000) quien

publica montos de 47.6 billones de dólares, Menrad (2003) quien señala para el mismo año 2000 un monto de 33 billones de dólares y Benkouider (2004) que dio una estimación de casi 61 billones de dólares para el 2004.

El último reporte del mercado disponible es el publicado por Leatherhead Food Research (2014) que sitúa el valor del mercado mundial de alimentos funcionales en 43.27 billones de dólares para el año 2013 (esta cifra hace referencia a alimentos y bebidas que hacen alegaciones de salud específicas y excluye productos como las bebidas energéticas), lo que supone un crecimiento del 26.7% en comparación con la cifra registrada hace cinco años por esta misma fuente. Asimismo, este estudio señala que las tasas de crecimiento del mercado siguen muy por debajo de los niveles observados en los primeros años del milenio. Adicionalmente, el informe pronostica que el mercado mundial de alimentos funcionales llegará a 54 billones de dólares el año 2017, lo que equivale a un aumento del 25% en comparación con el último dato disponible del 2013.

La cifra global reportada por esta fuente está limitada a ciertas partes del mundo, incluyendo los cinco principales países de Europa occidental, además de los Estados Unidos, Japón y Australia. Japón con ventas en un monto estimado de 17.5 billones de dólares, representa el 40.5 % del mercado global de alimentos funcionales en el 2013, significando entre 2009 y 2013, un crecimiento de 25%. En el caso de los Estados Unidos su mercado representa más del 38% del valor del mercado mundial, con ventas por valor de 16,5 billones de dólares el mismo año, significando un crecimiento en más del 29% en los últimos años desde 2009, impulsado por el aumento de la popularidad de alimentos funcionales como los productos lácteos con probióticos y cereales para el desayuno fortificados con granos enteros. En los próximos años, se espera que Estados Unidos sea el mercado de mayor crecimiento, superando a Japón en su calidad de principal mercado del mundo para los alimentos funcionales. Respecto a Europa la participación en el mercado fue de 20.2% del valor del mercado mundial, con ventas regionales dominados por el Reino Unido, Francia y

Alemania. En esta parte del continente la situación es un poco más compleja, en vista que el mercado se encuentra en una etapa posterior de desarrollo por lo que su crecimiento ha sido bastante modesto en los últimos años. Se señala que una de las causas principales de esta tendencia son las regulaciones más estrictas respecto a las declaraciones de propiedades saludables, ejerciéndose un mayor control y presión sobre fabricantes de alimentos funcionales para que proporcionen evidencia científica robusta que respalden las alegaciones de salud de sus productos.

El informe añade que las ventas de alimentos funcionales son igualmente vulnerables a las circunstancias económicas, por el hecho de que por lo general este tipo de alimentos tienen precios más altos. Además, algunos sectores parecen estar llegando a la madurez. Estos factores podrían frenar el crecimiento vertiginoso observado en años anteriores.

Según el informe, el tema de la energía y mejora del estado de ánimo son los sectores del mercado más grande, con un estimado de \$ 16.5 billones en 2013, que equivale al 27.1% del total del mercado y refleja la amplia popularidad de las bebidas energéticas en particular en la mayor parte del mundo. Otros sectores importantes son: el orientado a la salud digestiva (\$ 16 billones) y los alimentos relacionados con la salud del corazón (\$ 13.75 billones).

Como se ha mencionado en un párrafo anterior, una de las principales dificultades encontradas en la evaluación del potencial de los alimentos funcionales es la falta de una definición universalmente aceptada o interpretación jurídica del concepto. El término funcional ha sufrido una evolución en su concepción a lo largo de los años, lo que ha determinado que existan diferentes definiciones en la literatura y que hacen complicado unificar este concepto. Esta disparidad, además ha impedido un cálculo exacto de la evolución del mercado. Conviene analizar algunos conceptos reportados en la bibliografía para establecer un marco conceptual más claro.

El término alimento funcional nació en Japón, a raíz del aumento considerable de la expectativa de vida y en un mayor envejecimiento de sus habitantes consecuencia del rápido desarrollo económico que siguió a la post guerra, unido a un aumento considerable de las patologías crónicas no transmisibles: cardiovasculares, diabetes, hipertensión, osteoporosis, cáncer, y en los últimos años, obesidad (Yamada et al., 2008; Hardy, 2000; Kwak y Jukes, 2001; Stanton et al., 2005). En un esfuerzo nacional por reducir el costo creciente de la atención de salud motivó al gobierno japonés a buscar en conjunto con la academia y la industria de alimentos el desarrollo de un nuevo tipo de alimentos que efectivamente tuviesen un efecto positivo en la salud de la población derivado de su consumo. A comienzos del decenio de 1980 se iniciaron tres programas de investigación a gran escala financiados por el gobierno de Japón sobre “análisis sistemático y desarrollo de los alimentos funcionales”, “análisis de la regulación fisiológica de la función de los alimentos” y “análisis de los alimentos funcionales y diseño molecular”. En 1991 se estableció una categoría de alimentos potencialmente beneficiosos, denominados “alimentos de uso específico para la salud” (Foods for Specific Health Use, FOSHU) (Duran y Valenzuela, 2010; Ashwell, 2004; Burdock et al., 2006; Kwak y Jukes, 2001; Menrad, 2003), convirtiéndose en el primer país en el mundo en reconocer la funcionalidad de ciertos alimentos como una categoría separada. Y junto con esta categorización desarrolló un sistema para evaluar y aprobar los mensajes saludables en sus etiquetas. Se denominan FOSHU aquellos alimentos de los que se espera que ejerzan un efecto beneficioso específico sobre la salud, por adición de determinados constituyentes activos o por un efecto derivado de la supresión en los mismos de alérgenos alimentarios. Los efectos de tales adiciones o supresiones deben haber sido evaluados científicamente, y deberá solicitarse autorización para formular alegaciones relativas a los beneficios específicos que cabe esperar de su consumo. Para ser considerados FOSHU, se requieren pruebas de que el producto alimenticio final, y no sus componentes individuales aislados, ejerzan un efecto saludable sobre el organismo cuando se lo consume como parte de una dieta diaria. Los productos FOSHU deben presentarse en forma de alimentos habituales y no como comprimidos o cápsulas.

El Consejo de Nutrición y Alimentación de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos los define como «alimentos modificados o que contengan un ingrediente que demuestre una acción que incremente el bienestar del individuo o disminuya los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los nutrientes que contiene (Araya y Lutz, 2003). Otro concepto es el dado por el Institute of Food Technologists (IFT) que los define como alimentos y componentes de alimentos que proveen de un beneficio a la salud a parte de la nutrición básica, incluyendo alimentos convencionales, fortificados enriquecidos y mejorados y suplementos dietarios. Ellos proveen nutrientes esenciales en cantidades necesarias para el normal mantenimiento, crecimiento y desarrollo y/o componentes biológicamente activos que imparten beneficios a la salud o deseables efectos fisiológicos (Ramesh et al., 2012).

Europa no fue ajena a esta corriente y en los años noventa, el ILSI (International life Science Institute) Europe (ILSI Europa) elaboró un proyecto sobre alimentos funcionales presentado como una acción concertada de la Comisión Europea (CE). Conocido por sus siglas en inglés, FUFOSSE (por “Funcional Food Science in Europe” [Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa]), esta iniciativa concertada comenzó en 1995. Durante tres años, los más de 100 expertos europeos en nutrición y medicina que participaron en este proyecto FUFOSSE evaluaron críticamente la situación de los alimentos funcionales. Revisaron la literatura científica sobre los alimentos y los componentes alimentarios y su capacidad para modular las funciones orgánicas. Se revisó posteriormente el concepto de alimento funcional y se elaboró por vez primera un marco global que incluyó una estrategia para la identificación y desarrollo de los alimentos funcionales y para la fundamentación científica de sus efectos, a fin de justificar las alegaciones. Por último, redactaron el informe titulado “Conceptos científicos sobre los alimentos funcionales en Europa: documento de consenso” (Ashwell, 2004).

LA FOFUSE define como alimento funcional aquel que ha demostrado satisfactoriamente tener un efecto benéfico en una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de un modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y debe demostrar sus efectos en cantidades en que normalmente se consumen en la dieta. No se trata de comprimidos, ni cápsulas sino de alimentos que forman parte de un régimen normal (Siró et al., 2008).

Además de estas definiciones oficiales existen en la literatura una variedad de vocablos más o menos relacionados con los “alimentos de uso específico para la salud”. Dentro de ellos, hay términos como alimentos nutracéuticos, alimentos diseñados, farmalimentos, medicalimentos y vitaminalimentos, y otros más tradicionales, como suplementos alimentarios y alimentos enriquecidos, lo que complica la existencia de una definición unificada y contribuye a generar confusión.

Roberfroid (2000) menciona las siguientes características únicas de un alimento funcional y que permite aún ahora dado el tiempo transcurrido establecer una distinción con los demás términos:

- a. Ser un alimento convencional o un alimento de todos los días.
- b. Consumirse como parte de la dieta normal
- c. Tener un origen natural (en oposición a sintético) en concentración natural o presente en alimentos que normalmente no los contienen.
- c. Tener un efecto positivo en alguna función fisiológica específica más allá del valor nutritivo.
- d. Su consumo mejora el bienestar y la salud y/o reduce el riesgo de padecer enfermedades o proporciona beneficios para la salud así como para mejorar la calidad de la vida incluyendo el desempeño psicológico, físico y conductual.
- e. Tener alegaciones autorizadas y con base científica.

La funcionalidad atribuida a esta categoría o concepto de alimentos se debe a los compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos presentes en los alimentos funcionales contribuyen en modular las funciones fisiológicas con efectos beneficiosos sobre la salud. Estos incluyen fibras, probióticos y prebióticos, vitaminas, minerales, ácidos grasos, péptidos, proteínas y metabolitos secundarios de las plantas. En éste último grupo se considera: polifenoles, carotenoides, glucosinolatos, y alcaloides que han despertado un interés particular, porque en muchos de ellos se ha demostrado poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatorios, inmunomodulatorias y anticancerígenas.

Durante las últimas décadas, una enorme cantidad de conocimiento se ha acumulado respecto a la química, los niveles encontrados en las plantas y alimentos derivados de plantas, la estabilidad durante el procesado, la interacción con el tracto gastrointestinal, y la bioactividad de estos compuestos. Sin embargo, su diversidad química y el hecho de que muchos de ellos no están disponibles en cantidades suficientes plantea un reto para los investigadores, especialmente cuando se trata de los estudios de eficacia. Por otro lado, estos estudios a menudo se limitan a los compuestos individuales y no consideran adecuadamente las condiciones en las matrices alimentarias complejas. En consecuencia, quedan muchas preguntas por responder antes de sacar conclusiones fiables para establecer declaraciones de propiedades saludables. El lado positivo es que este panorama es un enorme potencial de innovación, que hace de este segmento uno de los más interesantes en el mercado de alimentos en general (Schieber, 2012).

En las últimas décadas, los investigadores han comenzado a identificar de forma aislada los componentes que hacen que un alimento sea funcional y determinan los beneficios concretos que estos proporcionan a nuestro organismo. Sin embargo, es bien sabido que los estudios sobre componentes individuales o mezclas de los mismos suelen ser muy variables y diferentes a los que aporta el alimento que los contiene. Básicamente, suele producirse porque las

interacciones entre compuestos son muy complejas. Algunos de los efectos de estos compuestos pueden ser aditivos, sinérgicos, potenciadores, inhibidores, neutralizantes o antagonistas, entre otros (Jeffery et al., 2005).

En la tabla 1.2 se presenta una lista con algunos de estos compuestos bioactivos su fuente y sus beneficios potenciales.

Dado el crecimiento de este mercado y frente a un panorama tan competitivo, la innovación se ha convertido en la piedra angular en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. También es un hecho que hay más fracasos que éxitos, por lo que se hace necesario cambiar esquemas tradicionales de innovación. Biela (2010) señala que la comprensión de las necesidades subyacentes, valoraciones y puntos de vista de los consumidores son la clave para el desarrollo de nuevos productos, especialmente alimentos funcionales, lo que significa que la percepción de lo que buscan los consumidores en un alimento debe ser considerada para como punto de partida en el diseño de los mismos. Asimismo, los esfuerzos específicos de diferentes grupos de actores no sólo los procesadores sino también científicos, médicos, proveedores de ingredientes, comercializadores entre otros son necesarios para aprovechar estas oportunidades e introducirse en el mercado con menor riesgo (Menrad, 2003).

La innovación puede plantearse a través de todos los componentes de la cadena del alimento y una posible clasificación de las innovaciones presentada por Bigliardi y Galati (2013) es la siguiente: a) nuevos ingredientes alimenticios y materiales b) innovación en productos frescos c) nuevas tecnologías en el procesamiento de alimentos d) innovaciones en la calidad e) nuevos métodos de empaque y f) nuevos métodos de distribución y mercadeo.

Tabla 1. 2 Componentes funcionales de los alimentos, fuentes y beneficios potenciales

Clase	Algunos componentes	Fuentes	Algunos beneficios potenciales
Carotenoides	β -caroteno	zanahorias, calabaza dulce, papa, melón, espinacas, tomates	Neutraliza los radicales libres que pueden dañar las células. Refuerza las defensas antioxidantes celulares, se convierte en vitamina A en el organismo.
	Luteína y zeosantina	col rizada, espinacas, maíz, huevos, frutas cítricas, espárragos, zanahorias, brócoli	Contribuye al mantenimiento de la salud ocular.
	Licopeno	tomates y productos procesados de tomate, sandía, pomelo rojo / rosado	Contribuye al mantenimiento de la salud de próstata.
Fibra dietaria	Fibra insoluble	salvado de trigo, salvado de maíz, cáscara de frutas	Contribuye al mantenimiento de la salud digestiva puede reducir el riesgo de algunos tipos de cáncer.
	Betaglucanos	salvado de avena, harina de avena, cebada, centeno	Puede reducir el riesgo de cardiopatías coronarias. Previene riesgo de diabetes tipo 2.
	Fibra soluble	cáscara de la semilla, guisantes, frijoles, manzanas, frutas cítricas	Puede reducir el riesgo de cardiopatías coronarias y algunos tipos de cáncer.
	Granos enteros	granos de cereales, todo pan de trigo, harina de avena, arroz integral	Puede reducir el riesgo de cardiopatía coronaria y algunos tipos de cánceres; contribuye al mantenimiento de niveles saludables de glucosa en la sangre.
	Acidos grasos monoinsaturados (MUFAs)	frutos secos, aceite de oliva, aceite de canola	Puede reducir el riesgo de enfermedades coronarias.
	Acidos grasos poliinsaturados (PUFAs) -	nueces, semillas de lino, aceite de linaza	Contribuye en el mantenimiento de la salud del corazón y del ojo al mantenimiento de la función mental.

Clase	Algunos componentes	Fuentes	Algunos beneficios potenciales
Acidos Grasos	ácidos grasos Omega-3-ALA		
	PUFAs – ácidos grasos Omega-3 DHA / EPA	salmón, atún, aceites de pescado	Puede reducir el riesgo de enfermedades del corazón. Contribuye con el mantenimiento de salud ocular y la función mental.
	Acido linoléico conjugado (CLA)	carne de res y cordero, algunos quesos	Contribuye al mantenimiento de la composición corporal deseable y la salud inmunológica.
Flavonoides	Antocianinas (cianidina, pelargonidina, delphinidina, malvidina y derivados)	bayas, cerezas, uvas rojas	Refuerza las defensas antioxidantes en la célula. Contribuye con mantenimiento de la salud cerebral.
	Flavanoles -catequinas, epicatequinas, Epigallocatequinas	té, cacao, chocolate, manzanas, uvas	Contribuyen con el mantenimiento de la salud del corazón.
	Procianidinas y proantocianidinas	arándanos, chocolate, manzanas, fresas, uvas, vino rojo, maní, canela, té, chocolate	Contribuye con el mantenimiento de salud del tracto urinario y la salud del corazón.
	Flavanonas - hesperedina, naringenina	cítricos	Neutraliza los radicales libres que dañan las células. Refuerza las defensas antioxidantes celulares.
	Flavonoles - quercetina, kaempferol,isoramnetina miricetina	cebolla, manzana, té, brócoli	Neutraliza los radicales libres que dañan las células. Refuerza las defensas antioxidantes celulares.
Isotiocianatos	Sulforafano	coliflor, brócoli, brotes de brócoli, repollo, col rizada, rábano picante	Puede mejorar la desintoxicación de compuestos no deseados. Refuerza las defensas antioxidantes celulares.
	Calcio	sardinas, espinacas, yogur, productos lácteos bajos en grasa alimentos y bebidas enriquecidos	Puede reducir el riesgo de osteoporosis.

Clase	Algunos componentes	Fuentes	Algunos beneficios potenciales
Minerales	Magnesio,	espinacas, semillas de calabaza, panes de grano entero y cereales, almendras, nueces de Brasil, frijoles	Contribuye el mantenimiento la función del músculo y el sistema nervioso, la salud inmunológica y ósea.
	Potasio	papa, productos lácteos bajos en grasa, panes de grano y cereales entero, jugos, frijoles, plátano, verduras de hoja verde	Puede reducir el riesgo de alta presión arterial y accidentes cerebrovasculares, en combinación con una dieta baja en sodio.
	Selenio	pescado, carne roja, todos los granos, ajo, hígado, huevo	Neutraliza los radicales libres que pueden dañar las células. Contribuye al mantenimiento del sistema inmunológico y la salud de la próstata.
Acidos fenólicos	Ácido caféico, ácido ferúlico	manzanas, peras, frutas cítricas, algunas verduras, cereales integrales, café	Refuerza las defensas antioxidantes celulares. Contribuye con el mantenimiento de la salud ocular y del corazón.
Estanoles, esteroides plantas	Los estanoles / esteroides libres	maíz, soja, trigo, alimentos y bebidas enriquecidos	Puede reducir el riesgo de cardiopatía coronaria.
	Ésteres de estanol / esteroles	éster de estanol dietética suplementos dietarios de éster de estanol, alimentos y bebidas enriquecidos	Puede reducir el riesgo de cardiopatía coronaria.
Polioides	Xilitol, sorbitol, manitol, lactitol	algunas gomas de mascar y otras aplicaciones alimentarias	Puede reducir el riesgo de caries dentales.
Prebióticos	Los fructooligosacáridos (FOS), polidextrosa	granos enteros, cebollas, algunas frutas, ajo, miel, puerros, plátano, alimentos y bebidas enriquecidas	Contribuye con el mantenimiento de la salud digestiva y a la absorción de calcio.
Probióticos	levaduras, <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y	yogures y otros ciertos fermentados de origen lácteo y no lácteo	Contribuye en el mantenimiento de la salud del sistema digestivo e inmune los beneficios son específicos de las especies.

Clase	Algunos componentes	Fuentes	Algunos beneficios potenciales
	otras cepas específicas de las bacterias beneficiosas		
Fitoestrogenos	Isoflavonas daidzeina genisteina	soja y alimentos a base de soja	Contribuye con el mantenimiento de salud de los huesos y sistema inmune, y la función saludable del cerebro. Contribuye en la salud menopáusica de las mujeres.
	Lignanós	semillas de lino, centeno, algunos verduras, semilla y nueces, lentejas, brócoli, coliflor, zanahoria	Contribuye con el mantenimiento de la salud del corazón y la salud inmunológica.
Proteínas soya	Proteína	soja y alimentos a base de soja como la leche, el yogur, el queso y el tofu	Puede reducir el riesgo de cardiopatía coronaria.
Sulfitos y tioles	Sulfuro de dialilo, Alil metilo trisulfuro	ajo, cebollas, puerros,	Mejora la desintoxicación de compuestos no deseados; contribuye con el mantenimiento de la salud del corazón, el sistema inmune y digestivo.
	Dirioliones	verduras crucíferas (brócoli)	Puede mejorar la desintoxicación de compuestos no deseados; contribuye con el mantenimiento de una función inmune saludable.

(De Ramesh et al., 2012)

El desarrollo de alimentos funcionales implica varias y distintas etapas desde el concepto hasta la implementación exitosa en el mercado e involucra sectores como el de: investigación-desarrollo, la industria, los organismos regulatorios y consumidores dentro de un ciclo que es llamado de la innovación y es desarrollado por Jones y Jew (2007) (figura 1.1). El ciclo comienza con la identificación de un concepto hasta la elaboración de un prototipo aceptable comercialmente, luego requiere de una evaluación de la eficacia y la seguridad a través de pruebas en animales y humanos, la posterior publicación de los datos contribuye a la credibilidad en el alimento funcional desarrollado, la aceptación de los consumidores y también es la base para la aprobación por los organismos regulatorios y el desarrollo de alegaciones de salud. La aceptación del consumidor y la provisión de alegaciones de salud facilita la penetración del producto en el mercado y en sí mismo estimula iniciativas para la creación de nuevos productos siguiendo el mismo ciclo.

El desarrollo de alimentos funcionales como se puede ver es un proceso complejo con etapas algo diferentes de las del desarrollo tradicional de nuevos productos y ha sido descrito también como costoso y arriesgado (van Kleef et al., 2002; Siro, Kaplona, Kaplona, y Lugasi, 2008), lo que señala la necesidad de nuevas competencias para el personal y las empresas que trabajan en ello (Mark-Herbert, 2002; Khan et al., 2013).



Figura 1. 1 Ciclo de sucesos en el desarrollo de alimentos funcionales
(De Jones y Jew, 2007)

Siro et al. (2008) señalan que la estrategia para crear un alimento funcional se apoya en las siguientes premisas:

1. La eliminación de un componente conocido identificado como causante de un efecto perjudicial cuando se consume (por ejemplo, una proteína alergénica).
2. El aumento de la concentración de un componente presente de forma natural en los alimentos a un nivel en el cual induce efectos beneficiosos (por ejemplo, fortificación con un micronutriente) para llegar a una ingesta diaria superior a la ingesta diaria recomendada pero compatibles con las directrices dietéticas para la reducción del riesgo de enfermedad.
3. Adición de un componente que no está presente normalmente en la mayoría de los alimentos y no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente pero para el que los efectos beneficiosos se han

- demostrado (por ejemplo, antioxidantes no vitamínicos o fructanos prebióticos).
4. Sustitución de un componente, generalmente un macronutriente (por ejemplo: grasas), cuya ingestión es generalmente excesiva y por lo tanto causa efectos nocivos, por un componente para el que los efectos beneficiosos se ha demostrado, y finalmente
 5. El aumento de la biodisponibilidad o la estabilidad de un componente conocido por producir un efecto funcional o por reducir el riesgo de enfermedad.

Betoret et al. (2012) mencionan que para el desarrollo de un alimento funcional hay que tener en cuenta:

- a. Necesidades del consumidor, preocupaciones sociales. Según las últimas encuestas llevadas a cabo las enfermedades que más preocupan a los consumidores son las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades del sistema digestivo y la obesidad (Drbohlav et al., 2007; Hilliam, 1998; Keller, 2006; Korzen-Bohr y O´doherty Jensen, 2006; Van Kleef et al., 2002, 2005).
- b. Estudio de mercado que permita detectar nichos de oportunidad. Previamente al desarrollo es necesario realizar un estudio que permita identificar los nichos de oportunidad existentes en el mercado.
- c. Revisión bibliográfica. La revisión bibliográfica permite identificar los avances científicos existentes en el área de interés, las tecnologías disponibles para llevarlos a cabo, las áreas sin desarrollar así como la libertad para operar y definir el desarrollo del producto.
- d. Identificación de compuestos fisiológicamente activos y desarrollo de una matriz alimentaria. Es necesario seleccionar o desarrollar una matriz alimentaria adecuada que tanto en su estado fresco como después del procesado proteja a los compuestos fisiológicamente activos y al mismo tiempo permita la liberación de los mismos en el organismo en el lugar y momento adecuado.

- e. Análisis de los cambios durante el proceso. El éxito comercial de los productos funcionales depende en última instancia del sabor, la apariencia, el precio y la alegación saludable dirigida a los consumidores. Para la obtención de un alimento funcional de calidad y efectivo es necesario analizar los cambios que experimentará dicho alimento durante el procesado tanto a nivel microscópico como macroscópico. Los cambios durante el proceso de fabricación sobre los compuestos con actividad funcional o sobre la propia estructura del alimento afectan directamente a la eficacia y a la aceptación del producto funcional desarrollado.
- f. Evaluación de la eficacia y la seguridad del alimento funcional completo. La evaluación de la eficacia y la seguridad es una etapa esencial para demostrar el efecto del alimento funcional y puede llevarse a cabo realizando estudios *in vitro* o *in vivo*. Los sistemas celulares proporcionan información biológica básica sobre las interacciones de los nutrientes en procesos bioquímicos. Sin embargo, para evaluar la actividad biológica sobre una base fisiológica de cuerpo entero es preferible el uso de animales o seres humanos. Los estudios *in vivo* con animales permiten un alto grado de control de la dieta, el medio ambiente y la genética, si bien, existen casos en donde los modelos animales no imitan adecuadamente las respuestas fisiológicas de los seres humanos. Existen numerosas diferencias en el metabolismo de los lípidos entre las diversas especies que deben ser consideradas cuando se evalúa la relevancia en humanos de los resultados obtenidos en la investigación con modelos animales (Bergen y Mersmann, 2005). La confirmación de la eficacia del alimento funcional en un sistema humano proporciona una base sólida que permite establecer las alegaciones de propiedades saludables para ese producto específico.
- g. Legislación. Los aspectos legales no pueden dejarse a un lado. Especialmente en Europa, las empresas que tratan de poner en marcha un alimento funcional se han enfrentado a una variedad de marcos legislativos que regulan la aprobación de productos, los tipos de información nutricional requerida en las etiquetas y los tipos de alegaciones funcionales y de salud en relación con un producto, normalmente de manera muy inconsistente

entre los estados miembros (Bech-Larsen y Scholderer, 2007). Sin embargo, el “Reglamento (CE) No. 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre la nutrición y de las propiedades saludables en los alimentos” ha entrado en vigor (European Commission (CE), 2006) y unifica los criterios legales de todos los estados miembros a tener en cuenta a la hora de comercializar un alimento funcional. Este reglamento fija los procedimientos de autorización necesarios para garantizar que las declaraciones que figuran en el etiquetado, la presentación o la publicidad de alimentos sean claras, precisas y se fundamenten en pruebas aceptadas por toda la comunidad científica. Este reglamento se ha ido modificando con reglamentos posteriores de tal manera que la última modificación corresponde al reglamento (UE) No. 432/2012 de la Comisión de 16 de mayo de 2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo la salud de los niños.

El mercado de alimentos funcionales está en continuo crecimiento a nivel mundial como lo demuestra los innumerables productos que se están introduciendo continuamente. La competencia en este campo es cada vez más intensa y para sobrevivir a esta competencia un alimento funcional necesita ser comprado continuamente y por lo tanto tiene que ser desarrollado considerando las necesidades del consumidor para lograr su fidelidad. Por lo que la investigación del consumidor es crucial. Desde la revisión de las principales definiciones de alimentos funcionales es posible enlazar conceptos claves (salud- tecnología- nutrición) con los principales actores que están involucrados en la investigación y desarrollo de procesos y alimentos funcionales: tecnólogos de alimentos, nutricionista y especialistas, la combinación de habilidades propias de estos actores es esencial para el desarrollo de productos innovadores (Bigliardi y Galati, 2013) como se precisa en la figura 1.2. Estos mismos autores señalan que la innovación no sólo es desde el punto de vista tecnológico sino incluye el aspecto social y cultural con el objetivo de satisfacer no sólo necesidades nutricionales sino personales y sociales.

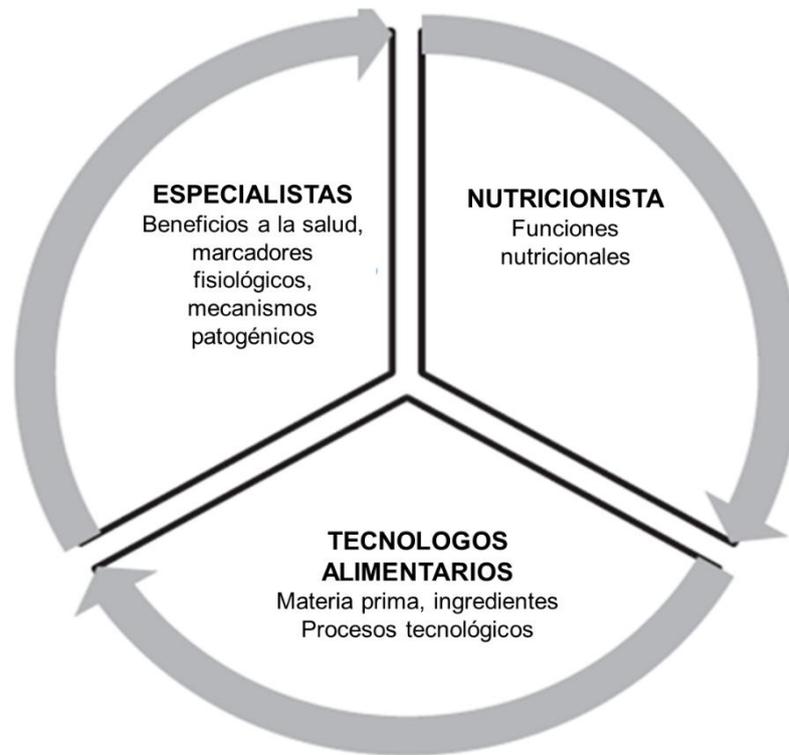


Figura 1.2 Tres principales actores involucrados en el proceso de investigación y desarrollo para el diseño de alimentos funcionales (De Bigliardi y Galati, 2013).

Betoret et al. (2012) distinguen tres tendencias en las tecnologías empleadas para el desarrollo de alimentos funcionales: a) tecnologías tradicionales: formulación y mezcla, la cual constituye una tecnología simple, barata y muy adaptable. Ejm. fortificación con vitaminas y minerales b) tecnologías diseñadas para prevenir el deterioro de compuestos fisiológicamente activos, entre los que se encuentran la: microencapsulación, recubrimientos y films comestibles, impregnación al vacío y c) tecnologías emergentes en el diseño personalizado de alimentos funcionales (nutrigenómica).

Desde el año 2001 en el que se dio a conocer el primer bosquejo de la secuencia del genoma humano se han dado pasos importantes para poder describir los

procesos biológicos a nivel molecular determinando cuáles son los genes que se activan o se bloquean, cuáles son las proteínas que se producen y cómo estas proteínas influyen en los procesos metabólicos. También se han abierto nuevas perspectivas sobre la forma en que el ambiente puede modificar estos eventos moleculares y la manera en que el genotipo puede predecir el fenotipo e influir en la respuesta del individuo al estilo de vida. Esto ha dado paso a la aplicación de nuevos campos de la ciencia en el desarrollo de alimentos funcionales.

Las tecnologías emergentes basadas en la información genética ofrecen una amplia ventana de oportunidades en el área de alimentos funcionales pero aún está en sus etapas iniciales, por lo que muchos aspectos tienen que ser estudiados, pero su futuro seguro será muy prometedor para la innovación en el desarrollo de este grupo de alimentos. Dentro de estas ciencias emergentes la nutrigenómica es una ciencia que busca dotar de una explicación molecular al modo en que los componentes químicos ingeridos en la dieta pueden modificar el estado normal de salud alterando la estructura de la información genética (Afman y Muller, 2006; Mutch et al., 2005).

La introducción de la genética en el campo de los alimentos funcionales permitirá un alto nivel de personalización de la dieta (nutrición personalizada) que se base en el perfil genético de las personas y el desarrollo de productos específicos adaptados a las necesidades particulares de segmentos de la población.

Fernandez y Benito (2008) mencionan algunos postulados de la nutrigenómica que explicarían resultados discrepantes en los estudios clínicos del efecto de componentes funcionales en la salud y de la rigurosidad con que estas evidencias son tratadas: a) bajo ciertas circunstancias y en algunos individuos la dieta puede ser un factor de riesgo serio para desarrollar ciertas enfermedades b) componentes moleculares de la dieta pueden actuar en el genoma humano tanto directa como indirectamente alterando la estructura genética o su expresión c) el grado en el que la dieta influye en el equilibrio entre salud y enfermedad dependerá de la estructura genética individual d) algunos genes

regulados por la dieta son propensos a jugar un papel en el establecimiento, incidencia y progresión de las enfermedades crónicas.

De modo que es perfectamente posible en base a la información de los genes que se posee, proporcionar un consejo personalizado sobre la nutrición y la salud, de manera de predecir susceptibilidades futuras en materia de salud y orientar la elección de las mejores opciones preventivas y el diseño de la dieta (Dwyer, 2006; Gibney et al., 2005).

Otro campo que está emergiendo con auge en el desarrollo de alimentos funcionales es la modificación genética. La combinación de la genómica y de la biología molecular ha proporcionado a los científicos una nueva manera de generar variedades vegetales que presentan un valor nutricional mejorado y un espectro funcional más amplio y mayor precisión que con los métodos convencionales de cultivos vegetales. En una primera instancia el uso de esta tecnología respondía a meras razones agroeconómicas para conseguir resistencia a herbicidas y agentes patógenos hoy su espectro de acción va en la mejora de las cualidades nutricionales y funcionales. No obstante, la potencialidad de esta ciencia en el desarrollo de alimentos funcionales por modificación genética está todavía en debate y vista con cierto temor en algunas ciudades especialmente en Europa, por las preocupaciones que tienen los consumidores y las entidades reguladoras de los efectos de estos cultivos a largo plazo. Falta aún alcanzar un consenso sobre muchos aspectos de tipo ético y regulador (The cluster competitiveness group, 2007).

Un aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de alimentos funcionales es la influencia de la matriz (microestructura) que contiene el componente funcional, no son suficientes los estudios con los componentes aislados, ha sido demostrado extensamente que la matriz donde se encuentran y los componentes que lo acompañen pueden ejercer efectos activantes, anuladores, sinergistas o antagonistas o que interfieran en el metabolismo, la absorción y biodisponibilidad del componente (Jeffery, 2005), de ahí las exigencias de

demostrar la eficacia del consumo de los alimentos funcionales en el alimento tal como va a ser consumido (Titta et al., 2010). Un ejemplo son los estudios conducidos por Titta et al. (2010) en el que se reporta que la antocianina de varias fuentes reduce la ganancia de peso y el desarrollo de adipocitos en pruebas con ratones con una dieta alta en grasa. Sin embargo, cuando las antocianinas purificadas son usadas en lugar de las antocianinas en su fuente nativa, el impacto en la ganancia de peso no es observado, esto prueba que la eficacia de los fitonutrientes esta influenciada tremendamente por la matriz que acompaña al fitonutriente, un factor que puede explicar muchas de las evidencias conflictivas del rol y efectividad de los fitoquímicos en promocionar la salud, consideración que tiene que ser tomado en cuenta en el diseño de los experimentos de intervención especialmente con humanos (Martin, 2012). Clifton et al. (2004) estudió el enriquecimiento de leche, pan, cereales y yogurt con esteroides y descubrieron que aunque el nivel de colesterol LDL fue bajo para los cuatro tipos de alimentos, la matriz láctea fue casi tres veces más efectiva que el pan y los cereales. En otro estudio se ha demostrado que la vitamina C regenera la vitamina E y mejora el efecto antioxidante de los compuestos carotenoides (Yeum et al., 2004), del mismo modo estudios in vitro han demostrado que flavonoides se comportan de manera sinérgica con la vitamina E para prevenir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Hwang, 2000). En otra investigación se ha confirmado que la biodisponibilidad de algunos componentes funcionales altamente lipofílicos como los carotenoides es muy baja cuando son consumidos en frutas y vegetales crudos, pero se incrementa apreciablemente cuando los alimentos son procesados, mezclados con otros componentes alimenticios o incorporados en soportes bien diseñados (Lemmens et al., 2014; Oehlke et al., 2014; Davidov-Pardo y McClements, 2014; McClements, 2015). Así, dada la diversidad de interacciones que existen dentro de los componentes nutrientes y no nutrientes, estos efectos deben de ser estudiados para el desarrollo de alimentos funcionales con mayor potencial e impacto sobre la salud.

Uno de los aspectos determinantes para el crecimiento y aceptación futura de los emergentes alimentos funcionales está relacionado con los estudios de intervención con voluntarios bien controlados que confirmen la eficacia de estos alimentos y proporcionen el fundamento científico a las alegaciones. Dentro de este contexto se hace necesario la mejora en el diseño y optimización de los protocolos de ensayos, la selección de adecuados biomarcadores que maximicen la capacidad de identificar la respuesta de relevancia clínica en estos estudios de intervención que demuestren de manera confiable esta eficacia (Verhagen et al, 2004).

1.2 Alimentos funcionales y salud: una perspectiva desde la interacción de los prebióticos, probióticos y fitoquímicos con la microbiota intestinal y sus consecuencias en la salud humana

La microflora del tracto gastrointestinal del ser humano es un complejo y dinámico ecosistema de 300-500 especies, en su mayoría bacterias que principalmente se encuentran en el colon e intestino delgado distal, mientras que en el estómago e intestino delgado proximal hay un escaso número de bacterias. Al nacer, el tracto gastrointestinal es estéril. La flora intestinal es adquirida durante el periodo neonatal y puede modificarse negativamente de forma temporal o de manera definitiva por estilos de vida y con el uso de antibióticos o positivamente con la introducción de especies de bacterias deseables para el tracto gastrointestinal que son precisamente los probióticos.

Esta microbiota compleja desarrolla estrategias para regular la adquisición y utilización de nutrientes en simbiosis con el huésped y en respuesta a la dieta. La actividad bioquímica de este complejo ecosistema genera compuestos saludables, así como compuestos potencialmente nocivos a partir de la dieta, y su equilibrio es esencial para mantener un estado saludable. Esto podría conseguirse por diversas estrategias nutricionales, incluyendo la administración de bacterias probióticas y otros componentes de los alimentos funcionales (Laparra y Sanz, 2010).

Los estudios con colonización intestinal controlada han permitido identificar tres funciones primarias de la microflora intestinal: (a) funciones de nutrición y metabolismo, como resultado de la actividad bioquímica de la flora, que incluyen la recuperación de energía en forma de ácidos grasos de cadena corta, producción de vitaminas y efectos favorables sobre la absorción de calcio y hierro en el colon; (b) funciones de protección, previniendo la invasión de agentes infecciosos o el sobrecrecimiento de especies residentes con potencial patógeno, y (c) funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal, y sobre el desarrollo y modulación del sistema inmune (Guarner,2003).

La condición y función del tracto gastrointestinal depende del mantenimiento de un balance apropiado del ecosistema intestinal. La composición de la flora intestinal difiere entre individuos y también en el transcurso de la vida dentro del mismo individuo. Muchos factores, como el clima, la dieta, edad, medicación (especialmente antibióticos), xenobióticos, enfermedad, estrés, pH, infecciones, localización geográfica, raza, circunstancias socio–económicas y el estilo de vida pueden afectar este balance. De estos factores, la dieta se considera un elemento importante para los cambios en la diversidad bacteriana intestinal que pueden afectar su relación funcional con el hospedero (Ley et al., 2008).

Componentes de la dieta con efectos biológicos son susceptibles de ser metabolizados por las bacterias intestinales durante el paso por el tracto gastrointestinal, antes de ser absorbidos. El colon tiene la mayor carga bacteriana y constituye un sitio activo del metabolismo en lugar de una simple ruta de excreción (Aura et al., 2008).

La actividad metabólica de la microbiota intestinal en los componentes bioactivos de los alimentos puede modificar la exposición del huésped a estos componentes así como a sus efectos saludables potenciales. Además, algunos de los componentes funcionales de los alimentos influyen en el crecimiento y/o

actividad metabólica de la microbiota intestinal y, con ello su composición y funciones (Campbell et al., 1997; Gibson et al., 2005). Por ejemplo, los flavonoides son componentes presentes en las plantas como o-glicósidos, su rol como promotor de la salud ha sido ampliamente documentado demostrando evidencias de su impacto sobre enfermedades cancerígenas, cardiovasculares, osteoporosis etc (Gioia et al., 2014). Estos compuestos son hidrolizados por las enzimas de la flora microbiana en sus aglicones, y esta transformación es esencial para la absorción, biodisponibilidad y el desarrollo de sus propiedades funcionales (Jou et al., 2012; Rossi et al., 2010).

Los fitoquímicos, prebióticos y probióticos son los compuestos bioactivos más ampliamente caracterizados de la dieta.

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos no nutrientes que son de interés por sus efectos anti-estrogénico, anti-inflamatorio, inmunomodulatorio y anti-cancerígeno. Sin embargo, la biodisponibilidad y efecto de estos compuestos es muy dependiente de su transformación por la microbiota, existe una creciente evidencia de que la microbiota juega un papel integral en los beneficios potenciales de salud relacionados con una dieta rica en compuestos fenólicos (van Duynhoven et al., 2011; Crozier et al., 2009; Rodriguez-Mateus et al., 2014). Por ejemplo, Larrosa et al. (2010) demostraron que las urolitinas, metabolito derivado de la acción de la microbiota sobre los elagitaninos, presentan efecto antiinflamatorio en experimentos con animales modelos. En otro estudio *in vitro*, conducido por Verzelloni et al. (2011), se ha encontrado que ciertos metabolitos derivados de la acción de la microbiota son claves en la prevención de la diabetes. Otra evidencia más son los resultados reportados por Hidalgo et al. (2012) quienes señalan que la acción de la microbiota del colon sobre las antocianinas, produce metabolitos como el ácido protocatecuico, ácido siríntrico, ácido gálico y ácido vanílico que han sugerido en estos estudios *in vitro* un papel protector contra la aterosclerosis.

El efecto beneficioso de los probióticos principalmente recae en su influencia en la composición de la microbiota intestinal y su habilidad para generar productos de fermentación con numerosos roles bioactivos.

Los prebióticos son principalmente ingredientes alimenticios no digeribles, principalmente oligosacáridos, que afectan de manera positiva al estimular la actividad de bacterias intestinales específicas. Los efectos de los prebióticos incluye el control del tránsito intestinal y una reducción del riesgo de padecer patologías como: obesidad, aterosclerosis, diabetes y alergias (Pang et al., 2012; Roberfroid, 2007). La utilización de los prebióticos por las bacterias colónicas conlleva en muchos casos a la producción de ácidos grasos de cadena corta lo que posee un impacto importante sobre el ambiente del intestino grueso, el metabolismo de los macronutrientes y la prevención de enfermedades. Los ácidos grasos de cadena corta se absorben con rapidez, utilizándose como fuente de energía entre comidas, al influir en el pH de las heces y en la función colónica puede incluso disminuir el riesgo de cáncer.

En general, una composición de la microbiota intestinal equilibrada confiere beneficios para el huésped, mientras que los desequilibrios microbianos están asociados con trastornos metabólicos e inmunitarios (Nadal et al., 2007; Santacruz et al., 2009).

Por lo tanto, la microbiota intestinal es tanto un objetivo para la intervención nutricional para mejorar la salud y un factor que influye en la actividad biológica de los otros compuestos de los alimentos.

La forma más antigua y todavía más ampliamente usada para aumentar el número de bacterias saludables en el tracto intestinal ha sido el consumo directo de bacterias vivas. Estas bacterias se llaman probióticos y hasta la fecha han sido predominantemente seleccionados de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y ambos forman parte normal de la microbiota intestinal y de la mucosa.

En la figura 1.3 se sintetiza las reacciones de estos tres componentes funcionales con la microflora colónica para la producción de metabolitos responsables de sus efectos saludables.

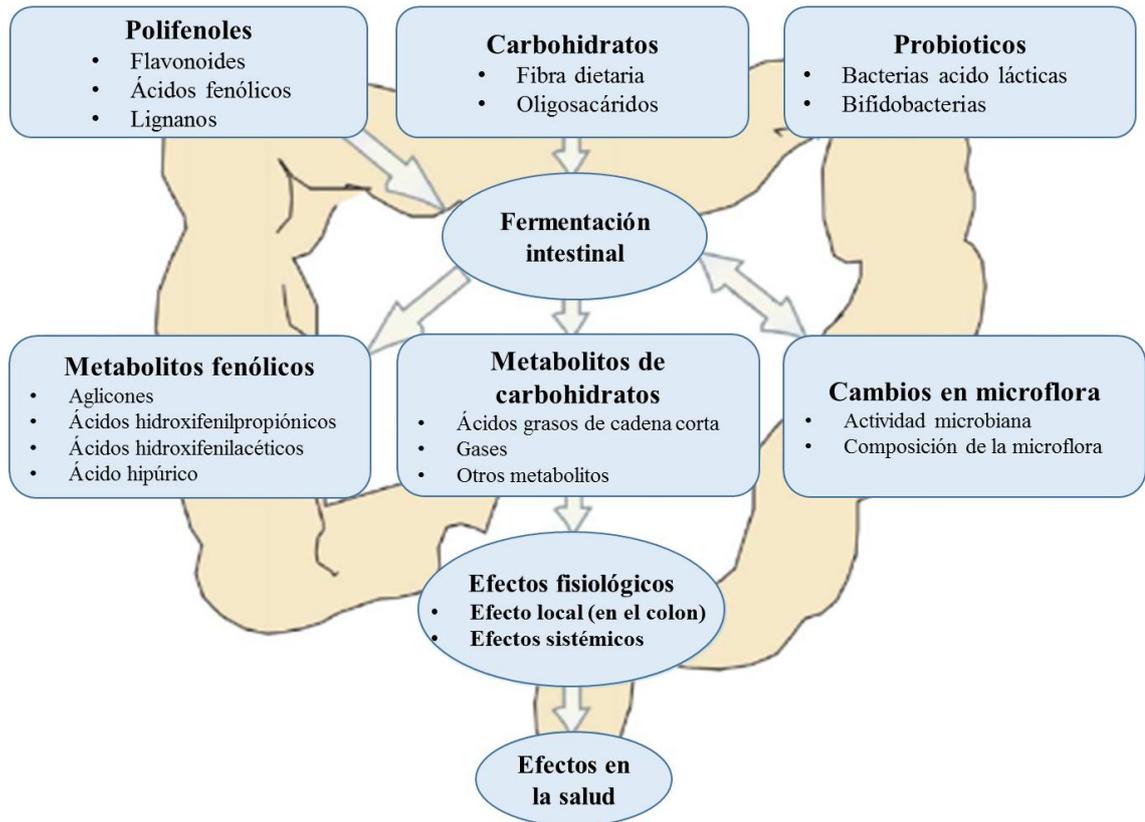


Figura 1.3 Interacciones de los componentes alimenticios funcionales con la microflora colónica para la manifestación de sus efectos saludables (De Puupponen-Pimia et al., 2002)

1.3 Percepción del consumidor respecto a los alimentos funcionales

Para el éxito en el desarrollo de alimentos funcionales resulta interesante conocer las actitudes, creencias y el comportamiento del consumidor frente a este tipo de alimentos, a fin de diseñar alimentos más acordes a sus expectativas y/o promover procesos de difusión que amplíen el conocimiento y/o la

información respecto a aspectos relacionados con la funcionalidad de los alimentos. El proceso de selección y compra de un alimento es un fenómeno complejo en el que además de las características sensoriales, los beneficios nutricionales, la imagen, las preferencias familiares y culturales, los hábitos de compra, de calidad y precio, influyen otros aspectos como la actitud del consumidor hacia el producto. Las propiedades químicas y físicas de los alimentos son percibidas por los consumidores como atributos sensoriales, siendo éstos los que influyen en su selección al exteriorizarse como preferencia hacia un determinado alimento. Los investigadores se han dado cuenta además que es importante estimar y evaluar el grado de conocimientos que maneja el consumidor en el momento de seleccionar un alimento funcional. Esta información permitirá recomendar el énfasis que debe darse a las campañas de educación en nutrición, con el fin de promover una alimentación equilibrada y diversificada. Se hace necesario que el consumidor reciba mayor información sobre las alternativas de nuevos alimentos que pueda consumir y de los beneficios que derivan de su ingesta, con el fin que su elección esté basada en un mayor conocimiento de lo que es apropiado y beneficioso para su salud, lo que trascendería en una mejor calidad de vida (Reinhardt, 2011).

El conocimiento de la percepción, características y las necesidades de los potenciales consumidores de alimentos funcionales es de vital importancia y ha sido motivo de numerosas investigaciones que han puesto al descubierto la posición del comprador final frente a este tipo de productos y han proporcionado las bases para el desarrollo de estrategias de diseño del producto, comercialización y marketing de los mismos para una penetración más segura en el mercado (Aaker y Lee, 2001; Van Kleef, 2005; Annunziata y Vecchio, 2011; Krystallis, Maglaras y Mamalis, 2008; Menrad, 2003, Siegrist et al., 2008 Carrillo et al., 2013). No hay que olvidar que la fidelidad del consumidor hacia un producto nace de su experiencia positiva, del cumplimiento de sus expectativas y de la seguridad y credibilidad que le ofrece la publicidad del mismo, lo que exige un especial conocimiento de lo que espera el consumidor como punto de partida para el diseño del producto.

Algunas conclusiones interesantes de estos estudios son las siguientes:

- a. Los productos que son considerados intrínsecamente saludables como yogurt, cereales y jugos son preferidos y confiables como vehículos de elementos funcionales.
- b. El grupo de consumidores de sexo femenino es un grupo objetivo más promisorio ya que presenta mayor aceptación a este tipo de alimentos.
- c. Los consumidores de mayor edad manifiestan mayor intención de compra.
- d. La existencia de un miembro de la familia con un problema específico de salud afecta positivamente a la aceptación.
- e. Existe la necesidad de una mayor difusión de noticias de estos productos a través de la implementación de campañas de información y actividades de educación pública. En este sentido tienen un alto grado de credibilidad y un impacto positivo la información proveniente de doctores y autoridades públicas que de las provenientes de los productores.
- f. A los consumidores les interesan más los productos que disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis, sobre aquellos basados en el estrés y la fatiga.
- g. Los consumidores suelen preferir los productos funcionales que producen beneficios directos, antes que aquellos que disminuyen el riesgo de padecer enfermedades.

1.4 Probióticos, prebióticos y simbióticos en el mercado de alimentos funcionales

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos incluyendo: alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más comúnmente utilizadas como probióticos, pero la

levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son incluidos en este grupo (Vacharaksa y Finlay, 2010, Arumugan et al., 2011).

Varios aspectos, incluyendo la seguridad, funcionalidad y características tecnológicas, tienen que ser tomadas en consideración en el proceso de selección de microorganismos probióticos. Aspectos de seguridad incluyen especificaciones como: origen (tracto gastrointestinal de humanos sanos), no patogenicidad y resistencia característica a antibióticos (Mattila-Sandholm et al., 1999; O'Brien et al., 1999; Salminen et al., 1998).

Aspectos funcionales incluyen la viabilidad y persistencia en el tracto gastrointestinal, propiedades inmunomodulatorias, antagonistas y antimutagénicas. No menos importantes son las propiedades tecnológicas para que puedan ser fabricados e incorporados en productos alimenticios sin perder viabilidad y funcionalidad o sin la generación de sabores y texturas desagradables. Deben sobrevivir al paso por el tracto superior gastrointestinal (GI) y llegar vivos a su sitio de acción, y deben ser capaces ejercer acción en el entorno intestinal (Puupponen-Pimia, 2002). En la figura 1.4 se resume estos criterios.

La condición básica de todo probiótico es la de tener un efecto beneficioso sobre el portador y, ampliando el espectro según Granato et al., (2010), debe reunir las siguientes características:

- ✓ Debe ser de procedencia humana con probada seguridad y tolerancia y no ser patógeno para el ser humano incluso para las personas con inmunocompromiso, no ser tóxico y no ir asociado con enfermedades gastrointestinales ni con otras como la endocarditis infecciosa.

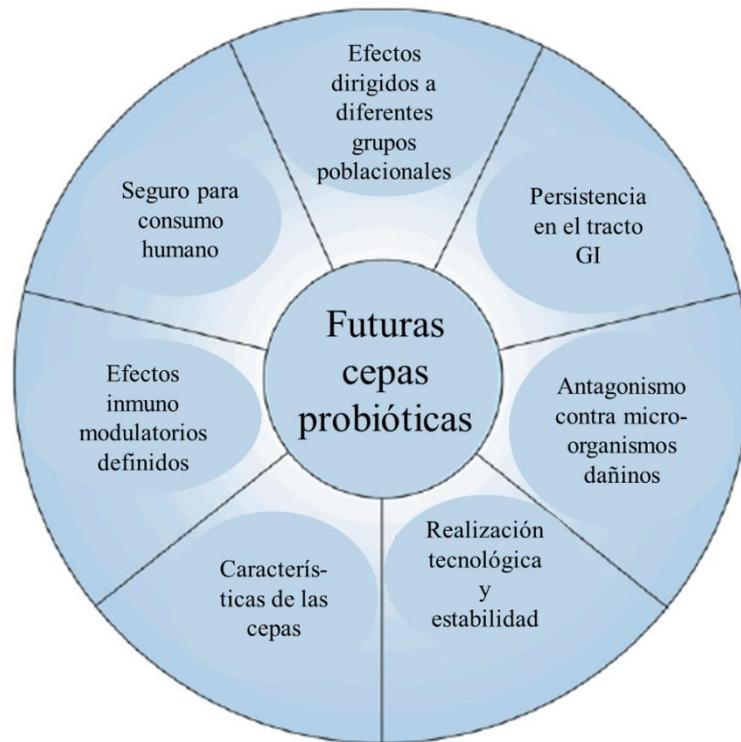


Figura 1. 4 Propiedades deseables en las bacterias probióticas (De Puupponen-Pimia et al., 2002)

- ✓ Debe tener una alta resistencia a su paso por el tránsito intestinal y por lo tanto una alta resistencia a las enzimas proteolíticas de la luz intestinal. Ser estable frente a ácidos y bilis y no conjugarse con las sales biliares. En resumen, tienen que tener una alta supervivencia en el ecosistema intestinal permaneciendo vivo y estable.
- ✓ Debe activar el sistema inmune a través de una estimulación sin efecto proinflamatorio.
- ✓ Debe poseer un mecanismo específico de adhesión a las mucosas para de esta manera prevenir la colonización de gérmenes patógenos.
- ✓ Debe permitir un crecimiento rápido en las condiciones habituales del ciego y todo el trayecto colónico.

El rol de los probióticos para prevenir y tratar una variedad de enfermedades humanas ha sido conocido empíricamente por mucho tiempo, sin embargo los

estudios para documentar, explicar y validar estos beneficios han aumentado en los últimos años. Estos estudios han dado lugar a avances significativos en la comprensión de estos microorganismos y sus mecanismos de acción. Solo para tener una idea de la importancia que están dando los científicos al tema, en un estudio de la evolución del número de publicaciones identificadas con el término probióticos en los últimos 20 años teniendo como base de datos la ISI Web of Knowledge, sólo 5 publicaciones se registraron en 1990, mientras que más de 1000 publicaciones se produjeron en el 2010 (Figuroa-Gonzales et al., 2011). Estos incluyen numerosos estudios de intervención humana y un número de revisiones que integran estudios individuales. En general, la evidencia clínica más fuerte a favor de los probióticos está relacionada con su uso en mejorar la salud del intestino y estimular la función inmunitaria. Los estudios varían mucho en calidad y se han llevado a cabo con una gama de cepas probióticas, alegaciones de salud, y poblaciones objetivo. Los resultados que se reportan documentan los efectos beneficiosos sobre la salud y los mecanismos de acción de las cepas probióticas. Entre otros, se les ha atribuido acción contra la intolerancia a la lactosa, actividad antipatogénica, actividad inmunomodulatoria, efectos hipercolesterolémicos, prevención de enfermedades inflamatorias del estómago y prevención del cáncer. Estas evidencias han contribuido a que el consumo de probióticos para prevenir y tratar una amplia variedad de enfermedades gane popularidad en la última década. Esto se debe en parte, a una necesidad de encontrar alternativas a las terapias tradicionales tales como antibióticos así como la falta de tratamientos efectivos para enfermedades gastrointestinales y otras (Al-Sheraji et al., 2013).

En la figura 1.5 se presenta de forma esquemática los beneficios que han sido reportados por diversos estudios. Es importante tener en cuenta que los efectos que se reportan sólo pueden ser atribuidos a la/las cepas consideradas en cada investigación, y no se puede generalizar a toda la especie ni a todo el grupo de bacterias ácido lácticas u otros probióticos. Por lo tanto, ninguna cepa probiótica proporcionará todas las prestaciones propuestas, ni siquiera las cepas de la misma especie, y no todas las cepas de la misma especie serán eficaces en

todas las condiciones. También es importante no asumir que cuando una cepa probiótica que ha demostrado ser beneficiosa para la salud de manera individual, va a tener el mismo beneficio cuando se administra en combinación con otras cepas. Por lo tanto, cualquier nueva mezcla de cepas probióticas, incluso si contiene una cepa probiótica bien estudiada, debe demostrarse por otros estudios.

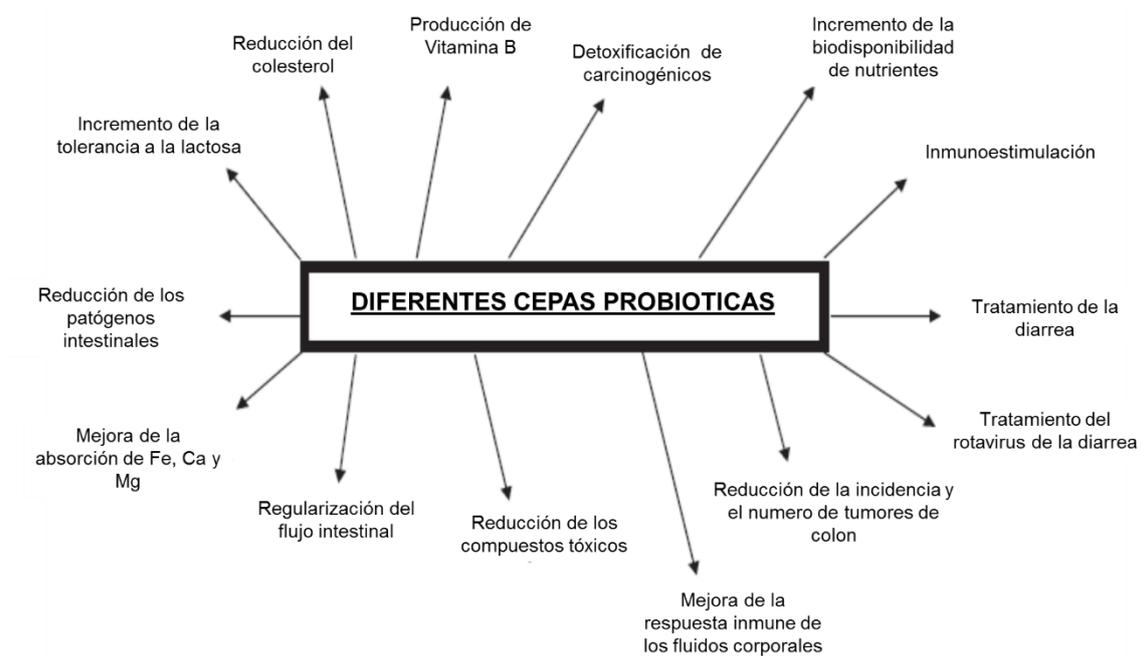


Figura 1.5 Beneficios atribuidos a los microorganismos probióticos
(De Granato et al., 2010)

Otro aspecto a tener en cuenta es el eventual papel beneficioso de las sustancias de vehículo/relleno. Algunos efectos pueden no reproducirse cuando se cambia el vehículo/relleno utilizado, por ejemplo, debido a una disminución de la viabilidad de la cepa. Estas consideraciones además de la heterogeneidad de los estudios y problemas metodológicos, explican la dificultad que existe aún ahora a pesar de las numerosas investigaciones en aceptar las alegaciones de salud para las aplicaciones de probióticos en alimentos. Hasta la fecha, ninguna reivindicación de salud para algún producto probiótico ha recibido la resolución

positiva de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El único caso donde una alegación de salud relacionada a un probiótico ha sido considerado justificada ha sido para yogur estándar y mala digestión de lactosa (EFSA NDA panel, 2010). En este caso, la actividad beneficiosa se atribuyó a los cultivos iniciadores del yogur (que contienen los microorganismos "*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*"), los cuales consumen completamente la lactosa por fermentación, en lugar de una cepa probiótica *per se*. La mayoría de las alegaciones presentadas han sido rechazadas por la EFSA por no presentarse evidencia científica consistente (Makinen et al., 2012).

Los prebióticos representan una segunda estrategia para mejorar el equilibrio de las bacterias intestinales. En lugar de introducir cepas exógenas en el tracto intestinal de un individuo, los prebióticos tienen el objetivo de estimular selectivamente la proliferación y/o actividad de los grupos de bacterias beneficiosas presentes en la microbiota intestinal. Estos son ingredientes no digeribles de los alimentos que alcanzan intactos el colon, donde pueden ser fermentados preferentemente por grupos de bacterias benéficas (Raghuveer, 2009). Las moléculas prebióticas líderes en el mercado alimentario europeo son los fructoligosacaridos (FOS), que son oligómeros compuestos en su mayoría por moléculas de fructosa unidas por enlaces β -glicosídicos, con una molécula de glucosa en su extremo reductor. Se pueden obtener mediante la hidrólisis de la inulina o síntesis enzimática por invertasas o fructosil-transferasas a partir de sacarosa (Manning y Gibson, 2004; Sangeetha et. al., 2005)

Una definición formal del término prebiótico fue postulada en 1995 por Gibson y Robertfroid quienes lo definieron como moléculas fermentables (substratos añadidos al ecosistema) que poseen un efecto favorable sobre la flora intestinal indígena, estimulando el crecimiento selectivo (número y cepas) de bacterias del colon. El efecto beneficioso de los prebióticos se debe por un lado a favorecer el crecimiento selectivo a nivel del colon de bacterias saludables (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) y por otro lado la fermentación colónica. Existen una serie de

requisitos que han sido postulados para que un alimento o componente alimentario pueda ser considerado un prebiótico estos son: no debe ser hidrolizado, absorbido ni digerido en el intestino delgado, debe presentar una fermentación selectiva por bacterias favorables y debe ser fermentado total o parcialmente por la flora colónica, debe ser sustrato de una a varias bacterias beneficiosas estimulando de manera selectiva su crecimiento y así favorecer el equilibrio de la flora colónica con predominio de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

La acción favorable para la salud de los prebióticos se centra en tres campos:

- ✓ Acción inmunomoduladora: la flora microbiana con mayor cantidad de bifidobacterias favorecida por los oligosacáridos prebióticos se asocia a una menor prevalencia de atopía.
- ✓ Acción metabólica: fermentación colónica con producción de ácidos grasos de cadena corta AGCC (propiónico, butírico y acético).
- ✓ Acción nutricional: las bifidobacterias favorecen la síntesis de algunas vitaminas como las vitaminas B6, B12, Ac. fólico, Ac. nicotínico y favorecen a través de la fermentación colónica la absorción de calcio, magnesio, hierro y zinc.

En la figura 1.6 se presenta los beneficios atribuidos a los prebióticos de tipo oligosacáridos reportado por diferentes investigaciones (O'Neil, 2008; Roberfroid, 1993; Delzenne y Williams, 2002; Cashman, 2002; Scholz-Ahrens et al., 2001; Rumney y Rowland, 1995; Naughton et al., 2002; Manning y Gibson, 2004; Saavedra et al., 1999; Macfarlane y Cummings, 1999) y esquematizadas por De Kothari, Patel y Goyal (2014).

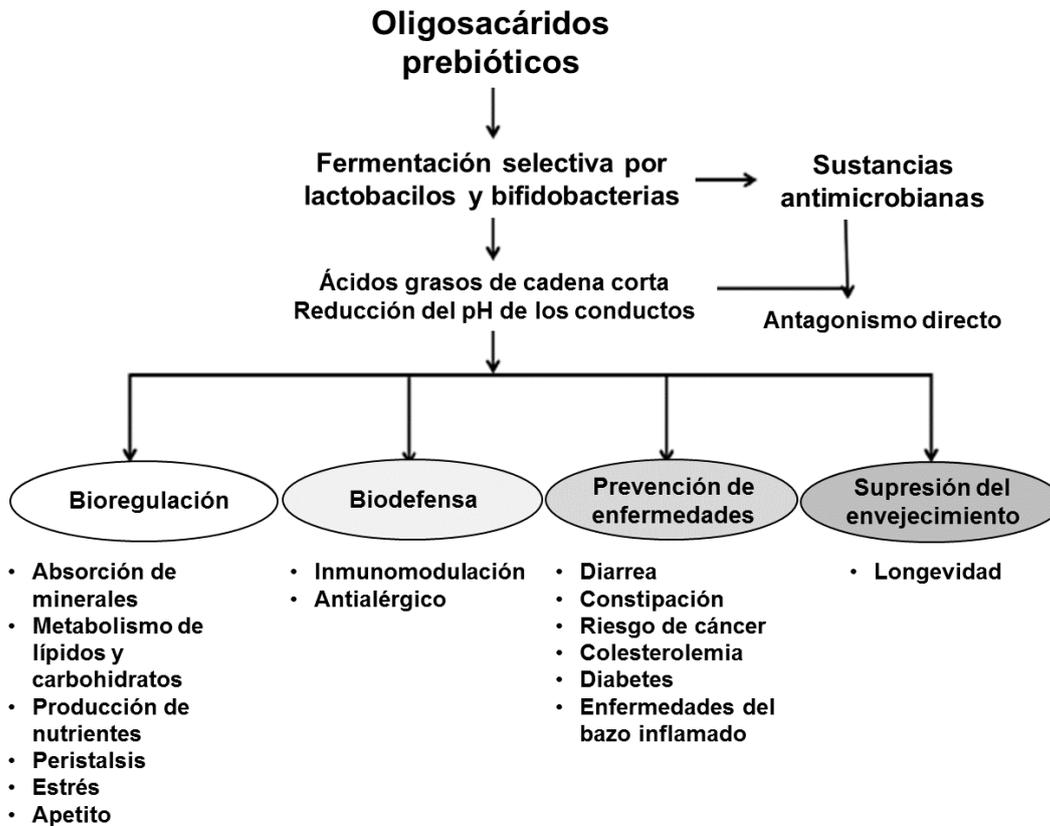


Figura 1.6 Beneficios para la salud de los oligosacáridos prebióticos
(De Kothari, Patel y Goyal, 2014)

Otra alternativa que se presenta y que potencia la acción individual de los probióticos y prebióticos son los simbióticos que son definidos como una mezcla de ambos que afectan al ser humano mejorando la supervivencia e implantación de microorganismos vivos en el tracto gastrointestinal por estimulación selectiva del crecimiento y/o activación del metabolismo de uno o un número limitado de bacterias promotoras de la salud (Gilson y Roberfroid, 1995), este concepto marca una tendencia promisoria en el sector de alimentos funcionales de como una combinación de probióticos y prebióticos puede conferir beneficios superiores que usando los compuestos individuales. A nivel tecnológico es atribuido a la adición de prebióticos la sobrevivencia de bifidobacterias durante el tiempo de vida de los productos lácteos (Lourens–Hattingh y Viljoen, 2001)

El efecto simbiótico en la microflora fecal en experimentos con animales ha sido demostrado por el incremento del recuento de anaerobios, aerobios, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y decrecimiento de clostridio, enterobacterias y *Escherichia coli* (Suskovic et al., 2001). Bouhnik et al. (1996) reportaron un incremento en el número de bifidobacterias fecales en voluntarios sanos después del consumo de un simbiótico mezcla de inulina y *Bifidobacterium* spp. Kiebling et al. (2002) observaron un significativo decrecimiento de la relación de colesterol tipo LDL/HDL después de un periodo largo de consumo de yogurt simbiótico en humanos (*L. acidophilus* y *B. longum* más inulina).

1.5 Desarrollo de alimentos no lácteos con incorporación de prebióticos y probióticos

Como se ha mencionado anteriormente, el mercado de alimentos funcionales está dominado por productos destinados a la salud intestinal y en particular por los probióticos. Ouwehand (2007) reporta 379 lanzamientos de productos probióticos en todo el mundo en el año 2005. Hasta hace unos años el yogur y las leches fermentadas fueron los alimentos probióticos más difundidos comercialmente, sin embargo nuevas alternativas de derivados lácteos especiales se están investigando y algunos introduciéndose en el mercado a fin de ofrecer una más amplia variedad de sabores y texturas así como mejores matrices para estos microorganismos. Entre estas alternativas se tiene: postres, leche en polvo para bebés recién nacidos, helado, mantequilla, mayonesa, varios tipos de quesos, entre otros (MaKinen-Aakula, 2006; Ly, Szigeti, Ma'the 'Szaka, y Szente, 2007). En parte el empleo de la leche como base para el desarrollo de alimentos probióticos puede ser explicado por la imagen en general positiva y saludable de este alimento entre los consumidores (Makinen-Aakula, 2006). Desde el punto de vista de la conveniencia como sustrato para probióticos está bien documentado que los sustratos derivados de la leche son los mejores medios para el crecimiento de microorganismos probióticos.

En general, los puntos principales a ser considerados al momento de incorporar los probióticos en alimentos son: la selección de una cepa probiótica compatible con las características de la matriz alimenticia que favorezca el crecimiento y/o supervivencia del probiótico (si la fermentación es requerida), condiciones de procesado del alimento compatibles con la supervivencia del probiótico; el embalaje, y condiciones ambientales para asegurar una adecuada supervivencia del mismo en la cadena de suministro del producto y durante el almacenamiento, y finalmente asegurar que la adición del probiótico no tenga efectos adversos en el sabor y la textura del producto.

Por otro lado, ciertas tendencias de comportamiento y exigencias por razones de salud de los consumidores están marcando pautas en la utilización de otros vehículos a parte de la matriz láctea para estos microorganismos, alentando a los investigadores y la industria a explorar nuevas matrices alimentarias. Los acontecimientos que marcan esta dirección son, por ejemplo: el crecimiento de un sector de consumidores vegetarianos, consideraciones de salud como evitar el consumo de alimentos con colesterol, consumidores intolerantes a la lactosa o alérgicos a proteínas lácteas y razones económicas por las que en los países en desarrollo se quiere incentivar el empleo de materias primas alternativas (Heenan et al., 2004; Yoon et al., 2006).

La aplicación de cultivos probióticos en medios no lácteos representa un gran desafío, ya que la viabilidad de éstos depende de diversos factores que interactúan tales como: pH, producción de peróxido de hidrógeno, concentración de azúcares (estrés osmótico), actividad de agua, metabolitos, temperatura de almacenamiento, niveles de oxígeno y presencia de microorganismos competidores e inhibidores (Donkor et al., 2006; Hull et al., 1984; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001; Reid et al., 2007; Talwalker y Kailasapathy, 2004).

Además, el soporte que conduce al probiótico tiene influencia en su función fisiológica como: la regulación de la colonización del microorganismo en el tracto gastrointestinal, efecto buffer al paso de las bacterias por el estómago, inducción

de cambios en la composición celular y el estado fisiológico. También la presencia de manera natural, añadida o producida por la fermentación, de otros componentes fisiológicamente activos tales como: fibras, ácidos orgánicos, bacteriocinas o péptidos bioactivos, entre otros, pueden presentar efectos sinérgicos o antagonistas, por lo que una combinación apropiada, puede fomentar el crecimiento de estas bacterias favorables y mejorar su eficacia funcional (Gibson et al., 2003; Sanders, 1998; Gibson et al., 2004; Bomba et al., 2006).

Los vegetales, en general, contienen nutrientes beneficiosos como minerales, vitaminas, fibra dietética y antioxidantes, lo que los hace sustratos ideales para los cultivos probióticos, mientras que carece de los alérgenos lácteos que pueden impedir el consumo en ciertos segmentos de la población. Se han estudiado como medios de crecimiento o soportes grupos de alimentos que son parte de la dieta normal del día a día como son: las frutas (Lavermicocca, 2006), hortalizas (Yoon, et al., 2006), legumbres (Heenan et al., 2004) y productos de cereales (Helland et al., 2004). En la tabla 1.3 se presenta diversas propuestas de sustratos alimenticios no lácteos reportados por las investigaciones y con resultados exitosos.

Sin embargo, hay algunos aspectos tecnológicos que se tienen que superar, especialmente en matrices alimenticias a base de frutas que por su bajo pH y la presencia de ácidos orgánicos en altos niveles son inhibitorios para bifidobacterias (Saarela, 2009). El pH tiene influencia en el crecimiento y la viabilidad del probiótico, particularmente para las especies de bifidobacterias (Kailasapathy et al., 2008; Shah y Ravula, 2000). Los zumos de frutas típicamente tienen un pH por debajo de cuatro o incluso tres (Saarela et al., 2006; Saarela et al., 2009), las bifidobacterias son sensibles a valores de pH por debajo de 4.6 (Boylston et al., 2004). El daño causado por la exposición a medios ácidos incluye una acumulación intracelular de protones, así como daños estructurales en la membrana celular, ADN y proteínas (Corcoran et al., 2008). Los zumos de

frutas son una matriz alimentaria desafiante para la mayoría de las cepas de bifidobacterias.

Tabla 1. 3 Propuestas alimenticias no lácteas para el desarrollo o soporte de microorganismos probióticos

Grupo	Matriz Alimenticia	Microorganismo Probiótico	Nivel de crecimiento	Referencia
Basados en frutas	Jugo de manzana Manzana impreganda de jugo de manzana Manzana impreganda de jugo de manzana deshidratada	<i>L. casei</i> spp.rhamnosus	1.9E+8 cfu/ml 4.5E+5 cfu/g 1.8E+8 cfu/g	Betoret et al. (2003)
	Pulpa de plátano homogenizado	<i>L. acidophilus</i> CCRC 10695b células libres y células inmovilizadas en perlas de κ-carragenano y Ca-alginato	8.698- 9.716 log UFC/mL	Tsen et al., (2009)
	Jugo de noni	<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Bifidobacterium longum</i>	cercano a 10 ⁹ UFC/mL	Wang et al. (2009)
	Jugo de granada	<i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> y <i>L. plantarum</i>	2.9- 9x10 ⁸ , 3.07- 9x10 ⁸ , 3.6-9x10 ⁸ y 3.9-9x10 ⁸ UFC/mL respectivamente	Mousavi et al. (2011)
	Jugo de melón	<i>L. casei</i> B-442	8.93 log UFC/mL(20 h fermentación) 8.3 log UFC/mL al final de 42 días de almacenamiento	Vidal Fonteles et al. (2011)
Basados en verduras	Jugo de tomare	<i>L. acidophilus</i> LA 39 <i>L. casei</i> A4, <i>L. delbrueckii</i> D7, <i>L. plantarum</i> C3	1.0 - 9.0 x 10 ⁹ UFC/mL después de 72 h de fermentación	Yoon et al. (2004)
	Jugo de remolacha roja	<i>L. acidophilus</i> LA 39, <i>L. casei</i> A4, <i>L. delbrueckii</i> D7, <i>L. plantarum</i> C3	9.2 x10 ⁸ -27.8x10 ⁸ UFC/mL	Yoon et al. (2005)

Grupo	Matriz Alimenticia	Microorganismo Probiótico	Nivel de crecimiento	Referencia
	Leche de maní	<i>B.pseudocatenulatum</i> G4	7.12-8.39 log UFC/mL	Mustafa et al. (2009)
	Jugo de col	<i>Lactobacillus casei</i> A4, <i>Lactobacillus debrueckii</i> D7, y <i>Lactobacillus plantarum</i> C3	17.5 ± 7.05 × 10 ⁸ 72 h	Yoon et al. (2006)
	Jugo de zanahoria con fructooligosacáridos	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (clasificados como DSM 20 081 y ATCC 11 842) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (DSM 20 711)	5.0-5.2 x10 ⁹ UFC/mL 4.8-5.2x 10 ⁹ UFC/mL	Nazzaro et al.(2008)
Otros granos y cereals	Postre helado de soya no fermentado	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MJLA1, <i>L. rhamnosus</i> 100-C and <i>Bifidobacterium lactis</i> BDBB2 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> Lp-01 and <i>B. lactis</i> Bb-12 <i>Saccharomyces boulardii</i> 74012	>10 ⁷ UFC/g despues 28 semanas -20°C	Heenan et al. (2004)
	Leche de soya	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb1466 <i>S. thermophilus</i> St1342 <i>L. acidophilus</i> L10 <i>L. acidophilus</i> La4962 <i>B. lactis</i> B94 <i>B. longum</i> BI536 <i>L. casei</i> L26 <i>L. casei</i> Lc279	7.88 log UFC/mL 8.24 log UFC/mL 7.37 log UFC/mL 8.81 log UFC/mL 8.44 log UFC/mL 9.54 log UFC/mL 9.13 log UFC/mL 8.88 log UFC/mL	Donkor et al. (2007)
	Leche de soya suplementada fructooligosacaridos (FOS), inulina, manitol,	<i>Lactobacillus</i> sp. FTDC 2113, <i>Lactobacillus acidophilus</i> FTDC 8033, <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393, <i>Bifidobacterium</i> FTDC 8943 y	Todas las cepas mostraron viabilidad excediendo 7 log UFC/mL después de 24 h.	Yeo y Liong,(2010)

Grupo	Matriz Alimenticia	Microorganismo Probiótico	Nivel de crecimiento	Referencia
	maltodextrina y pectina	<i>Bifidobacterium longum</i> FTDC 8643		
	Leche de soya con pure de fresa	<i>L. lactis</i> ATCC11545 y <i>L. lactis</i> LL3.	Después de la fermentación y durante 3 semanas a 6°C los recuentos fueron mayores de 8 log UFC/mL	Beasley et al.(2003)
	Pudin de cereales (harina de maíz y arroz)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 y 1748, <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb12, y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	más alto crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> GG 8 log UFC/g, en 12 h	Helland et al.(2005)
	Arroz tratado enzimáticamente con enzimas sacarolíticas y formulado con 3% caseína, 3% aceite de soya y 0.4% lactato de calcio , pectina y fresa	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i>	7.6×10 ⁷ UFC/g.	Boonyaratanakornkit y Wongkhalaung (2000)
	Bebida basada en harina de avena (5.5%); sacarosa (1.5%); combinación aspartamo, ciclado de sodio y sacarina	<i>Lactobacillus plantarum</i> B28	7.5 × 10 ¹⁰ UFC/mL 6-8 h	Angelov et al.(2006)
	Diluciones de harinas de avenas comerciales Adavena® M40 (M40 product) y Adavena® G40 (G40 product)	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730, <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 y <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730 mantuvo la más alta viabilidad (10 ⁸ UFC /mL) después de 30 días a 6°C	Martensson et al. (2002)
	Bebida en base a malta	<i>Lactobacillus reuteri</i>	8.41 log UFC/mL. 30 h	Kedia et al. (2007)
	Leche de soya suplementada con	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314, <i>L. acidophilus</i>		

Grupo	Matriz Alimenticia	Microorganismo Probiótico	Nivel de crecimiento	Referencia
	vitaminas del grupo B	FTDC 8833, <i>L. acidophilus</i> FTDC 8633 Y y <i>L. gasseri</i> FTDC 8131	Mayor 7 log UFC/mL	Ewe et al. (2010)

La tolerancia de las bacterias probióticas a estas condiciones adversas se puede mejorar empleando estrategias como: la selección de cepas adecuadas, tratamientos de estrés previos a la fermentación, la aplicación de materiales protectores por encapsulamiento, y la optimización del proceso de producción de la cepa y del alimento (Champagne, 2009; de Vos et al., 2010; Doleyres y Lacroix, 2005; Gomes y Malcata, 1999; Muller et al., 2009; Saarela et al., 2004; Saarela et al., 2011).

Aunque una adecuada selección de la cepa, tolerante a medios ácidos es una solución inmediata, otra alternativa muy estudiada es la microencapsulación que permite la protección de las células en matrices formadas por gomas, gelatinas o proteínas. Esto mejora la tasa de supervivencia durante los procesos tecnológicos y bajo condiciones fisiológicas del estómago, mejorando la viabilidad en comparación con células libres (Burgain et al., 2011).

También se ha señalado que la fermentación de los medios a base de frutas produce sabores y olores perceptibles y no agradables (Luckow y Delahunty, 2004; Luckow et al., 2005; Luckow et al., 2006), que puede ser una limitación para el éxito en el mercado. Luckow y Delahunty (2004) reportaron, que cuando *Lactobacillus plantarum* se empleó en la fermentación de zumo de naranja los consumidores prefirieron las características sensoriales de los zumos convencionales de naranja a su homólogo funcional (jugo que contiene probióticos), pero señalan que las preferencias podrían cambiar si paralelamente se proporciona información sobre los beneficios que implica su consumo sobre la salud y finalmente proponen como estrategia para enmascarar estos sabores la adición de 10% (v/ v) de zumos de frutas tropicales.

No obstante estos inconvenientes, los zumos de fruta han sido considerados medios apropiados para la fortificación con cultivos probióticos entre otras razones por su posicionamiento como productos alimenticios saludables y refrescantes (Tuorila y Cardello, 2002; Yoon et al., 2004; Sheehan et al., 2007), por su frecuencia de consumo y porque tienen perfiles de sabor atractivos para todas las edades (Tuorila y Cardello, 2002).

Otra alternativa planteada en las investigaciones es la utilización de trozos de frutas como soporte donde se inmovilizan los microorganismos probióticos. Por ejemplo, Kourkoutas et al. (2005) reportaron que la inmovilización de *Lb. casei* en piezas de manzana y membrillo, presentan buena adaptación al medio ácido sobreviviendo durante largos períodos de almacenamiento. Betoret et al. (2003) combina los efectos beneficiosos de un probiótico (*Lb. Casei*), zumos de fruta y manzana para elaborar un aperitivo funcional. Aprovechando la estructura porosa del tejido vegetal de la manzana, utilizando zumos de fruta como medios de fermentación y mediante la aplicación del proceso de impregnación a vacío lograron incorporar los microorganismos a la estructura celular a niveles para ser considerado un alimento probiótico. Por otro lado, sugieren un efecto protector de la matriz después de un proceso de estabilización por secado por aire a 40°C que permitió mantener el contenido del probióticos a un nivel mayor a 6 log UFC/g después de almacenamiento a temperatura ambiente durante 2 meses. Otros métodos de incorporación de probióticos en matrices alimenticias se presentan en la tabla 1.4

Los probióticos no sólo tienen que sobrevivir a un nivel que garantice su funcionalidad sino además no deben afectar negativamente las propiedades sensoriales de los jugos de frutas. La cuidadosa selección de la matriz de la fruta, las cepas de probióticos y la adición de otros ingredientes son las opciones más inmediatas para optimizar la fabricación de bebidas probióticas no lácteas (Mousavi et al., 2010).

Los efectos protectores de diversos antioxidantes y vitaminas, y mezclas de los mismos (por ejemplo, extracto crudo de semilla de uva blanca, el extracto de té verde, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B6, vitamina C y vitamina E), se han estudiado en un sistema modelo de zumo de fruta usando cepas de *L. rhamnosus* HN001, *B. lactis* HN001 y *L. paracasei* LPC 37. Las diferencias en el comportamiento entre las bacterias probióticas se encontró en presencia de compuestos y extractos después de seis semanas de almacenamiento. Los jugos modelo que contenían vitamina C, extracto de uva o extracto de té verde presentaron mejores tasas de supervivencia (Shah, Ding, Fallourd, y Leyer, 2010).

Tabla 1. 4 Métodos de incorporación de probióticos en matrices alimentarias

Metodo de incorporación	Ejemplos		
	Cepa probiótica	Matriz de soporte	Referencia
Adhesión en la superficie por fermentación	<i>L. plantarum</i> (ITM21B) <i>L. paracasei</i> (IMPC2.1)	Alcachofa	Valerio et al. (2006)
	<i>L. plantarum strain</i> (L4), <i>L. mesenteroides</i> (LMG 7954)	Repollo (col fermentada)	Beganovic et al. (2011)
	<i>L. paracasei</i> (IMPC2.1)	Aceitunas de mesa	Lavermicocca et al. (2005)
Impregnacion a vacío	<i>S. cerevisiae</i> (CECT 1347) <i>L. casei</i> spp. <i>rhamnosus</i> (ECT 245)	Manzana	Betoret et al. (2003)
	<i>L. rhamnosus</i> (CECT 275)		Puente et al. (2009)
Inmersión de una matriz en solución con el microorganismos e incubación	<i>L. casei</i>	Manzana y membrillo	Kourkoutas et al. (2005)
	<i>L. rhamnosus</i> (GG)	Manzana	Alegre et al. (2011)
	<i>B. lactis</i> (Bb-12)	Manzana/papaya	Tapia et al. (2007)

Metodo de incorporación		Ejemplos		
		Cepa probiótica	Matriz de soporte	Referencia
Recubrimientos a base de alginatos y gellan (Films comestibles)		<i>L. acidophilus</i> (La-5) <i>B. lactis</i> (Bb-12)	Fresa	Moayednia et al. (2010)
Incorporación como células inmovilizadas	Perlas de gel de K carragenina	<i>L. acidophilus</i> (BCRC 10695)	Puré de manzana	Tsen, et al. (2004)
			Jugo de tomate	Tsen et al. (2008)
	Cal-alginato	<i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. lactis</i> (Bi-04, Bi-07)	Jugo de naranja y manzana	Ding y Shah, (2008)
			<i>L. acidophilus</i> (BCRC 10695)	Jugo de tomate
Fermentación		<i>L. acidophilus</i> (LA 39), <i>L. plantarum</i> (C3), <i>L. delbrueckii</i> (D7), <i>L. casei strain</i> (A4)	Jugo de remolacha roja	Yoon et al. (2005)
			<i>L. delbrueckii</i> (DSM 20081), <i>L. rhamnosus</i> (DSM20711)	Jugo de zanahoria

También se han planteado productos a base de cereales como buenos vehículos de probióticos. Los granos de cereales como la avena y cebada son considerados fuentes importantes de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra soluble tal como β -glucano y arabinosilano, oligosacáridos (galacto-y fructooligosacáridos) y almidón resistente (Chavan y Kadam, 1989; Shah, 2001; Andersson et al., 2001), que promueven varios efectos fisiológicos beneficiosos y que tienen función prebiótica al estimular selectivamente el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentes en el colon (Andersson et al., 2001). Los granos enteros también son fuentes de muchos fitoquímicos,

incluyendo los fitoestrógenos, compuestos fenólicos, antioxidantes, ácido fítico y esteroides (Katina et al., 2007).

Otras alternativas, se encuentran dentro del grupo de las leguminosas como es el caso de la soja, rica en proteínas de alta calidad (Wang et al., 2006), sin embargo, una de las limitantes en su consumo y utilización industrial es el sabor poco agradable que presenta y su contenido de rafinosa y estaquiosa componentes que producen flatulencia. Frente a estos obstáculos la fermentación se presenta como una alternativa ya que tiene el efecto adicional de aumentar la digestibilidad y la palatabilidad (Han et al., 2001). La leche de soja es un buen sustrato para bacterias de las especies de *Lactobacillus*: *Lb. Casei* (Garro et al., 1999), *Lb. Helveticus* (Murti et al., 1993), *Lb. Fermentí* (Chumchuere y Robinson, 1999), *Lb. fermentum* (Garro et al., 2001, 2004), *Lb. reuteri* (Tzortzis et al., 2004), y *Lb. acidophilus* (Wang et al., 2002, 2003, 2006). Adicionalmente, productos de soja tradicionalmente juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas como trastornos en la menopausia, cáncer, aterosclerosis, y osteoporosis (Liu et al., 2006).

El contenido de grasa, concentración y tipo de proteínas, azúcares y pH del producto son algunos de los factores que podrían afectar el crecimiento de probióticos y la supervivencia en los alimentos. Por lo tanto, la formulación del producto puede ser diseñada para contribuir a su eficacia y mejorar la idoneidad de un sustrato, evaluando fuentes de energía (por ejemplo, glucosa), antioxidantes adecuados, vitaminas o sales minerales que puedan ser añadidos (Kurmann, 1988; Ishibashi y Shimamura, 1993; Dave y Shah, 1998; Gomes, Malcata, y Klaver, 1998).

Los nutrientes esenciales para el crecimiento y la supervivencia microbiana pueden también ser añadidos a los jugos vegetales. Rakin et al. (2007) reportaron que cepas de *L. plantarum* y *L. acidophilus* mostraron un crecimiento y acidificación óptima en el jugo de remolacha cuando se añadió extracto de levadura.

1.6 La impregnación a vacío (IV) como técnica en el desarrollo de alimentos funcionales

Existen una variedad de tecnologías que se han venido estudiando y empleando para desarrollar alimentos funcionales. Fito et al. (2001) mencionan como tecnologías utilizadas con mayor frecuencia: a) Mejoras de los sistemas de producción vegetal y animal (formulación de dietas que propicien el metabolismo para la acumulación de determinados componentes funcionales), b) modificación genética (arroz mejorado con alto contenido de β -caroteno y hierro, c) mezcla de compuestos fisiológicamente activos con los alimentos tradicionales de uso general en la formulación de alimentos líquidos, geles o reestructurados y d) tecnologías basadas en la ingeniería de matrices donde se aplica el conocimiento de la matriz alimentaria: composición, estructura y propiedades para promover y controlar los cambios adecuados para mejorar algunas propiedades sensoriales y/o funcionales en los productos alimenticios (fritura, expandidos extruidos etc).

Otra clasificación presentada por Betoret et al. (2011) agrupa las tecnologías en tres grupos principales: el primer grupo formado por las tecnologías tradicionalmente empleadas en el procesado de alimentos como la formulación y mezcla, cultivo y cría. El segundo, constituidas por aquellas que forman una estructura para tratar de impedir el deterioro de compuestos fisiológicamente activos como: microencapsulación, películas y recubrimientos comestibles y la impregnación a vacío. Por último, el tercer grupo formado por tecnologías emergentes utilizadas para diseñar alimentos funcionales personalizados (nutrigenómica).

El término ingeniería de matrices ha sido usado para definir un área de la ingeniería de alimentos que aplica el conocimiento de la conformación de la matriz alimentaria, estructura y propiedades con el objetivo de promover y controlar cambios adecuados que mejoran algunas propiedades sensoriales y/o

funcionales así como su estabilidad (Fito et al., 2003), se incluyen dentro de este grupo: los geles, emulsiones, extruidos y expandidos y dentro del grupo de procesados no tradicionales basado en las propiedades de la microestructura está la impregnación a vacío. Con este término están clasificados algunas tecnologías basadas en el empleo de la fracción de espacios vacíos de los alimentos con el objeto de introducir de una manera controlada compuestos químicos orgánicos en los capilares de los tejidos biológicos.

La impregnación a vacío es una operación de transferencia de materia entre un medio líquido y un sustrato sólido con estructura porosa como lo puede ser una fruta o verdura. La creación de gradientes de presión en el sistema constituido por el sólido sumergido en el seno del líquido provoca la salida de gas y una importante entrada de líquido en el interior de la estructura porosa (Fito, 1994). De esta forma es posible eliminar el aire ocluido en los poros e incorporar solutos de forma controlada en la estructura matricial del alimento poroso modificando convenientemente su composición original sin prácticamente afectar su estructura. Como no se requiere de la utilización de altas temperaturas se minimiza el daño a los tejidos y se preserva el color, el sabor y los aromas y componentes activos naturales (Betoret et al., 2012). La posibilidad de incluir en la estructura matricial de un alimento poroso componentes de interés apunta a la impregnación a vacío como una técnica eficaz para el diseño de nuevos productos nutricionalmente equilibrados, saludables y/o funcionales (Fito et al., 2001). El hecho de que los componentes incorporadas se queden incluidos en la matriz estructural del alimento natural supone una importante protección de los mismos frente a las reacciones de deterioro (Betoret et al., 2011) y ayudan a modular la liberación de los mismos pudiendo influir en la asimilación (Ribereiro et al., 2006).

El proceso de impregnación a vacío es afectado por numerosos factores internos y externos. Los factores internos incluyen propiedades del tejido a impregnar tales como su estructura (porosidad, tortuosidad), propiedades mecánicas, la forma y tamaño de los capilares, así como la forma y tamaño de la muestra. Los

factores externos más importantes que influyen en la velocidad de impregnación incluye el nivel de presión aplicado, la composición y concentración de la solución, temperatura, la relación solución/matriz, el tiempo requerido para alcanzar y permanecer en presión de vacío así como la exposición a la presión atmosférica (Grass et al., 2003; Zhao y Xie, 2004; Fito et al., 1996).

Dentro de la numerosas aplicaciones que se han planteado se puede clasificar según el objetivo perseguido en dos grupos: a) modificación de las propiedades físico-químicas y atributos sensoriales del producto (reducción del pH, reducción de la actividad de agua, cambios en la propiedades térmicas, mejora en la estructura de frutas y vegetales, mejora en el color, sabor y aroma) y b) modificación de las propiedades saludables y funcionales del producto.

La aplicación de esta técnica se inició buscando incrementar la velocidad de transferencia de masa en la deshidratación osmótica a través de la impregnación de capilares con soluciones hipertónicas, desde ahí y en los últimos años se han planteado numerosas aplicaciones industriales que la ha alzado como una tecnología no destructiva alternativa en el desarrollo de productos en los que manteniendo la ventaja de la estructura porosa original de los alimentos frescos se modifica la composición de los mismos a través de la incorporación de líquidos que sirven de vehículo de componentes que evitan el oscurecimiento, agentes que dan firmeza, preservantes, anticongelantes, agentes antimicrobianos, ácidos, azúcares, depresores de la actividad de agua (a_w), vitaminas y compuestos bioactivos funcionales entre otros (Betoret et al., 2003; Park et al., 2005; Xie y Zhao, 2003), con el objeto de prolongar el tiempo de vida útil, fortificar, enriquecer o cumplir requisitos de calidad (Martínez-Monz et al., 1998; Martínez-Monzó et al., 2000; Derossi et al., 2012).

En la figura 1.7 se presenta un flujo propuesto por Zhao y Xie, (2004) para la aplicación de la técnica de impregnación a vacío en el desarrollo de productos y el aprovechamiento de subproductos de la misma.

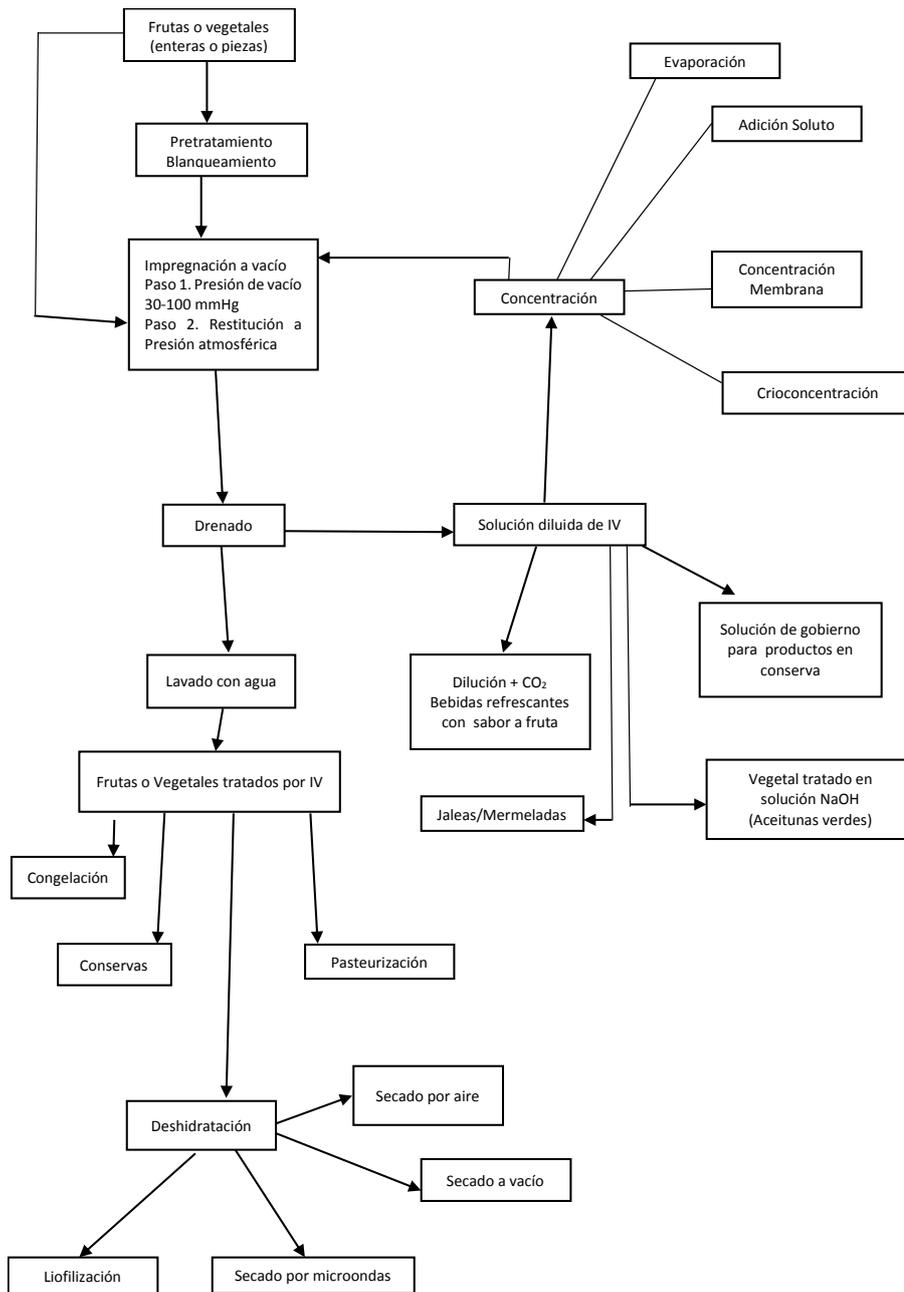


Figura 1. 7 Flujo de procesado bajo la técnica de impregnación a vacío (De Zhao y Xie, 2004)

En la tabla 1.5 se presenta algunas investigaciones donde se emplean la impregnación a vacío en el desarrollo de alimentos demostrando el potencial de esta técnica y en la tabla 1.6, ejemplos de aplicación orientados a la modificación de las propiedades funcionales.

Tabla 1. 5 Ejemplos de aplicación de la técnica de impregnación a vacío para modificar propiedades fisicoquímicas y atributos sensoriales.

Matriz Alimenticia	Metabolito impregnado	Funcionalidad	Referencia
Durazno	Pectinmetil esterasa Cl ₂ Ca	Incremento de la firmeza en duraznos enlatados	Javeri (1991)
Fresa	Solución de Cl ₂ Ca y espermine	Incremento de la firmeza	Ponappa et al.(1993)
Manzana	Extracto de uva ,sucrosa y pectina de alta metilación	Mejora de las propiedades mecánicas y estructurales del tejido. Reducción del agua congelable, mejora de la resistencia al daño por congelación	Martinez-Monzó, (1998)
Manzana	Solución de Cl ₂ Ca	Mejora de la textura	Del Valle, (1998)
Manzana	Solución isotónica de sucrosa	Incremento de la conductividad térmica	Martinez-Monzó, (2000)
Manzana, fresa, frambuesa	Pectina de alta metilación Cl ₂ Ca,	Reduce la pérdida de firmeza después de la pasteurización	Degraeve et al.(2003)
Fresa, papaya	Soluciones de sacarosa	Reducción de la aw	Moreno et al. (2004); (2000)
Fresas	Jarabe de fructosa de maíz pectina de alta metilación calcio y zinc	Mejora de la calidad textural y reducción de la pérdida por goteo después de la descongelación	Zie y Zhao,(2004)
Berenjena	Pectinmetil esterada derivada de <i>aspergillus niger</i> extraída de manzana y pomelo y Cl ₂ Ca	Incremento de la firmeza	Banjongsinsiri et al., (2004)
Manzana	Miel	Prevención del oscurecimiento enzimático, mejora actividad antioxidante	Jeon y Zhao, (2005)
Fresa	Pectina de alta metilación Cl ₂ Ca, pectina de manzana	Reduce el daño estructural después de la congelación rápida	Van Buggenhout et al., (2006)
Manzana	Solución de sucrosa, ácido ascórbico, hexilresorcinol Cl ₂ Ca	Efectivo inhibidor del oscurecimiento y ablandamiento durante el almacenamiento	Bieganska-Marecik y Czapski, (2007).
Espinaca	Solución de trealosa	Mejora de la tolerancia a la congelación	Phoon et al. (2008)

Matriz Alimenticia	Metabolito impregnado	Funcionalidad	Referencia
Zanahoria	Solución acuosa de chitosan y ácido acético (film comestible)	Mejora la resistencia a la transmisión de vapor. Mejora la preservación de color y la resistencia mecánica durante el almacenamiento en frío	Vargas et al. (2009)
Berros	Proteínas anticongelantes	Estabilización de la estructura para prevención de problemas en procesos de congelación y la cadena de frío debido a fluctuaciones de temperatura.	Cruz et al. (2009)
Pomelo (impregnación a vacío+deshidratación osmótica)	Lactato de calcio	Extensión del tiempo de vida útil por reducción de la velocidad de respiración	Moraga et al. (2009)
Pimienta , cetas, calabacín	Soluciones ácido láctico	Incremento del grado de acidificación	Derossi et al. (2010), (2013), (2011).
Manzana	Solución isotónica de fructosa, ácido ascórbico, esencia de manzana verde	Mejora del sabor	Comandini et al.(2010)
Calabacín	Solución de maltodextrina NaCl Cl ₂ Ca	Mejora de la ganancia de soluto y agua, cambios texturales y microestructurales limitados	Occhino et al. (2011)
Peras minimamente procesadas	EDTA, 4-hexylresorcinol, citrato y ascorbato, lactato de calcio	Prevención del oscurecimiento enzimático. Preservación de propiedades mecánicas	Perez Cabrera et al. (2011)
Piña	Film formado por emulsión de caseinato	Extension de la vida útil	Talens et al. (2012)
Fresa	Solución de trealosa y extracto de trigo	Mejora de la tolerancia a la congelación	Velickova et al. (2013)
Aceitunas	Solución de NaCl NaOH	Acorta los tiempos de desamargado	Tamer et al. (2013)

Tabla 1. 6 Ejemplos de aplicación de la impregnación a vacío para modificar las propiedades saludables y funcionales de frutas y vegetales.

Alimento	Componente incorporado	Funcionalidad	Referencia
Vegetales (berenjena, champiñones, zanahoria)	Calcio	Enriquecimiento con minerales	Grass et al. (2003)
Manzana	Solución isotónica con lactato de calcio y gluconato ferroso	Enriquecimiento con calcio y hierro	Barrera et al. (2004)
Manzana	Jarabe de fructosa de maíz, caseinato de calcio acetato de alfa tocoferol Gluconal y lactato de zinc	Enriquecimiento con vitamina E y calcio y zinc	Park et al. (2005)
Pera	Solución diluida de miel con alfa tocoferol	Enriquecimiento con vitamina E	Lin et al. (2006)
Papa entera	Vitamina C	Enriquecimiento antioxidante	Hironaka et al. (2011)
Broccoli, endivia, zanahoria, coliflor	Aloe Vera	Antioxidante	Sanzana et al. (2011)
Hojas de lechuga	Solución isotónica de sacarosa con lactogluconato de calcio	Enriquecimiento de minerales	Grass et al. (2011)
Manzana	Derivados de quercetina de piel de manzana	Enriquecimiento con flavonoides	Eschulze et al., (2012)
Manzana	Jugo de mandarina	Flavanonas (hesperidina)	Betoret et al. (2012)
Manzana	Jugo de manzana comercial enriquecido con extracto de cáscara de manzana (alto contenido de flavonoides)	Flavonoides (quercitina)	Schulze et al. (2012)

Parte II

Objetivos y Plan de Trabajo

Capítulo 2

2. Objetivos y plan de Trabajo

2.1 Justificación e interés social de la tesis doctoral

En las siguientes líneas se detallan las evidencias científicas que sustentan la selección de los componentes: manzana, zumo de mandarina, probiótico (*Lactobacillus salivarius*) y prebiótico (oligofruktosa) que forman parte de las propuestas de aperitivos funcionales desarrolladas en la presente investigación:

1. Numerosos estudios han demostrado que el consumo de frutas y verduras puede reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares y algunos cánceres (Knain et al., 2006; Temple, 2000). Los efectos beneficiosos de las frutas y verduras han sido atribuidas a su contenido de fibra y antioxidantes.
2. Según un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente junto con la Fundación Española de la Nutrición (FEN), el consumo de frutas y hortalizas por parte de los españoles ha aumentado en los últimos años aunque sigue sin alcanzar los niveles recomendados para lograr una alimentación saludable. Desafortunadamente, el consumo diario de verduras y frutas se estima inferiores a las dosis (400 g, excepto papas y otros tubérculos fuente de almidones) recomendada por la Organización

Mundial de la Salud (OMS) y Alimentación y la Agricultura (FAO) (Di Cagno et al. 2013). Un análisis de la tendencia de consumo realizado por Cerdeño (2011) concluye que dentro de las frutas los cítricos (naranja y mandarina) y la manzana lideran las preferencias con 1242.58 y 557. 26 millones de kilos en el año 2010 respectivamente. En este contexto la industria puede jugar un papel muy importante en el incremento de esta tendencia proponiendo formas de consumo alternativas y atractivas.

3. La manzana es ampliamente consumida a nivel mundial, constituye una parte significativa de la dieta humana, es reconocida como una de las principales fuentes dentro de la dieta de fitoquímicos y antioxidantes principalmente en forma de fenólicos tales como flavonoides y ácidos fenólicos, y exhiben alta capacidad antioxidante (Boyer y Liu, 2004; Wu et al., 2004; Khanizadeh et al., 2008). Varios estudios en animales y en humanos han demostrado que su consumo inhibe la proliferación de las células cancerosas (Waladkhani y Clemens, 1998; Dragsted y Strube, 1993), disminuye la oxidación lipídica, reduce significativamente el colesterol en plasma, el colesterol LDL (C-LDL) y triglicéridos (Aprikian et al., 2001; Leontowicz et al., 2001; Sablé-amplis et al., 1983; Salgado et al., 2008), reduciendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, además se le ha reconocido actividad antiinflamatoria. Los principales compuestos responsables de estos efectos son la fibra y los polifenoles (Boyer y Liu, 2006; Aprikian et al., 2003; Leontowicz et al., 2003; Nagasako-Akazome et al., 2007). Serra et al. (2012) demostraron en ensayos con ratas que la reducción del colesterol y LDL oxidado esta directamente correlacionada con la presencia de compuestos fenólicos como: catequina, epicatequina y procianidina B1, actividad antioxidante, y β -caroteno. La manzana dentro de las frutas tiene uno de los niveles más altos de actividad antioxidante y también alta concentración de compuestos fenólicos totales, y quizás más importante, tienen la mayor parte de fenoles libres en comparación con otras frutas (Sun et al., 2002). Esto significa que no están unidas a otros compuestos en los frutos por lo que

pueden estar más disponibles para la absorción en el torrente sanguíneo (Boyer y Liu, 2004).

4. Hay mucha literatura científica acerca de los efectos beneficiosos que el consumo de zumos de cítricos ejerce en la salud humana. La ingesta de zumos de cítricos afecta positivamente a la concentración de vitamina C y biomarcadores del estado antioxidante en sangre humana (Sanchez-Moreno et al., 2003), contribuyendo así a la reducción de la morbilidad y la mortalidad por cardiopatía coronaria (Rouseff y Nagy, 1994) y el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cánceres (Block, 1992; Steinmetz y Potter, 1996; So et al., 1996). Estos efectos beneficiosos se atribuyen además de la vitamina C al contenido de una amplia variedad de compuestos biológicamente activos, tales como: flavonoides, carotenoides y derivados polifenólicos. Todos estos compuestos poseen propiedades antioxidantes lo que les permite actuar como captadores de radicales libres. También se les ha reconocido actividad anti-inflamatoria anti-tumoral, anti-fúngica e inhibitoria de la coagulación de la sangre así como efectos protectores contra las enfermedades crónicas y degenerativas (Byers y Perry, 1992; Gorinstein et al., 2001; Trípoli et al., 2007; Middleton y Kandaswami, 1994; Olson, 1988; Yehoshua et al., 1995). Codonez-Franch et al., (2008) llevaron a cabo una investigación con el objetivo de determinar el efecto del consumo de 500 mL de zumo de mandarina durante 28 días sobre los biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo en 48 niños con hipercolesterolemia. Al final del estudio se concluyó que la ingesta regular de zumo de mandarina redujo significativamente los biomarcadores plasmáticos de la oxidación de lípidos y proteínas y mejoró el estado antioxidante de los consumidores. Los flavonoides, los compuestos fenólicos más abundantes en estas frutas han demostrado tener muchas funciones biológicas como antioxidante, anticancerígeno, cardiovascular, y anti-inflamatorios (Benavente-García y Castillo, 2008; Huang y Ho, 2010). Un reciente estudio in vivo con humanos (Martin et al., 2011) concluye que la hesperidina está causalmente relacionada con el efecto protector vascular tras el consumo de zumo de

naranja. Hesperidina, narirutina, y didimina pertenecen al grupo de flavanonas glicosiladas y son los flavonoides más abundantes en zumo de mandarina. De acuerdo con estudios in vitro, la hesperidina la más abundante entre las flavanonas, actúa como un antioxidante (Vinson et al., 2002; Wilmsen et al., 2005). En estudios en animales y humanos se ha demostrado su contribución a la reducción del colesterol (Park et al., 2001), la presión arterial (Yamamoto et al., 2008) y la pérdida de densidad ósea (Chiba et al., 2003). También reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (Zielinska- Przyjemska y Ignatowicz, 2008) y tiene efectos citotóxicos en las células humanas del cáncer de colon (Park et al., 2008).

5. Se sabe que la microflora intestinal juega un papel de vital importancia para la salud. Por esta razón, existe un creciente interés en la modificación de la composición de la flora intestinal con el fin de lograr una comunidad bacteriana intestinal más beneficiosa. Esto explica por qué actualmente los alimentos funcionales dirigidos a la mejora del balance y la actividad del medio intestinal son el mayor segmento del mercado funcional en Europa, Japón y Australia. Son dos los medios más estudiados que buscan aumentar el número de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* intestinales por incorporación de probióticos y prebióticos. Los componentes conocidos como probióticos, se utilizan para alterar la composición de la microflora en el colon (actividad bifidogénico). Sin embargo, estos cambios pueden ser transitorios y la resultante implantación bacteriana es muy limitada. Por otro lado, los prebióticos son componentes de la dieta que no son digeridos por los humanos, pero que tienen un efecto beneficioso a través de la selectiva estimulación del crecimiento y/o actividad de una única especie (o de un número limitado) de bacterias que ya residen en el colon, mejorando así la salud de las personas (Losada y Olleros, 2002). Los prebióticos representan un nutriente selectivo para microorganismos beneficiosos y tienen el potencial de aumentar la eficacia de los actuales productos probióticos (Hughes y Hoover, 1991).

6. Numerosos estudios *in vitro* e *in-vivo* resaltan el papel de los probióticos como una alternativa en el tratamiento de diversas patologías como se ha indicado más ampliamente en la introducción. Los resultados obtenidos les atribuyen efectos como reducción de la intolerancia a la lactosa, reducción de niveles de colesterol, efectos protectores, efectos anticarcinogénicos, efectos sobre la producción de células tumorales y efectos en patologías gastrointestinales. Dentro de este último grupo se consideran enfermedades gastrointestinales como la úlcera péptica, tanto gástrica como duodenal, y la gastritis, los que según numerosos estudios son consecuencias directas de la infección por la bacteria *Helicobacter pylori*. Cerca de la mitad de la población mundial es afectada por este microorganismo por lo que es considerado un problema importante de salud, por ejemplo en España afecta al 25% de la población infantil, porcentaje que aumenta hasta el 40% en los países en vías de desarrollo. Hasta el momento el tratamiento con dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones ha permitido erradicar la infección por *H. pylori* en el 90% de los casos por lo que es el tratamiento más utilizado para combatirlo (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007). Desafortunadamente es un tratamiento caro y causa efectos secundarios y resistencia a antibióticos. La administración de probióticos solos, no permite erradicar *H. pylori* pero la administración conjunta con antibióticos e inhibidores de la bomba de protones sí contribuye a la erradicación y disminución de los efectos secundarios.

6. Estudios con cepas de *Lactobacillus salivarius* lo indican como un microorganismo probiótico con excelentes características para combatir la infección generada por el *Helicobacter pylori*. Aiba et al. (1998) demostraron la eficacia del *Lactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) comparado con otras especies de *Lactobacillus* contra *Helicobacter pylori*, estos investigadores a través de pruebas *in vitro* propusieron el mecanismo de la supresión por la producción de gran cantidad de ácido láctico y por lo tanto la inhibición completa del crecimiento de *H. pylori* en un cultivo mixto. La validez de *L. salivarius* como un probiótico para

suprimir *H. pylori* y por lo tanto reducir la respuesta inflamatoria fue confirmado en el mismo estudio con pruebas in vivo con animales modelos. Estudios conducidos por Ryan et al. (2008), evaluaron la actividad anti-*Helicobacter pylori* de 28 cepas de *Lactobacillus salivarius* y otros 12 *Lactobacillus*, sus resultados demuestran que 9 de las 28 cepas de *L. salivarius* y 3/12 de otras especies de *Lactobacillus* inhibieron el crecimiento de *H. pylori*. La cepa *L. Salivarius* UCC119 mostró la mejor aptitud inhibiendo el crecimiento en 6/6 aislados clínicos de *Helicobacter pylori*, 5 de los cuales fueron resistentes a antibióticos. Posteriormente, Ryan et al. (2009) midieron la habilidad de las mismas cepas de *Lactobacillus salivarius* (UCC118 y UCC119) para modular la respuesta de las células epiteliales gástricas a la infección por *H. pylori*, sus resultados concluyen que adicionalmente a la producción de ácidos existen otros mecanismos de inhibición de la interleuquinas L8 (citocina de naturaleza proinflamatoria) a través de la secreción de un metabolito previamente formado o proteína que inhibe la transcripción del gen *cag* (gen de virulencia del microorganismo). Hsieh et al. (1012) demostraron que *L. salivarius* subsp. *Salicinius* AP-32 y *Lactobacillus johnsonii* MH-68 solo o en combinación reducen la carga de *H. pylori* en la mucosa gástrica, y reducen la expresión de citocinas inflamatorias y la infiltración de linfocitos (célula inflamatoria), suprimiendo eficazmente la viabilidad *H. pylori* lo que ayuda a reducir la inflamación gástrica. En otra investigación, Betoret et al. (2012) evaluaron el efecto potencial de un aperitivo, elaborado a base de zumo de mandarina, manzana y el probiótico *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063, contra la infección por *Helicobacter pylori*, los resultados obtenidos sugieren una mejora de los síntomas causados por la infección, no obstante señalan que es necesario llevar a cabo más estudios con más pacientes para evaluar de forma adecuada el consumo del aperitivo con el probiótico.

8. Por el lado de los prebióticos, hay numerosas pruebas que sustentan una gama de beneficios para la salud si se consumen regularmente (Macfarlane, Macfarlane, y Cummings, 2006; Roberfroid et al., 2010). Estos incluyen aumento en la absorción de minerales (Hawthorne y Abrams, 2008; Rastall, 2010), mejora en la respuesta inmune (Macfarlane, Steed, y Macfarlane, 2007; Seifert y Watzl, 2008) y hay cada vez más evidencias que desempeñan un papel en la prevención del cáncer colorrectal (Asad, Emenaker, y Milner, 2008) o la terapia del cáncer (Taper y Roberfroid, 2008). También se ha sugerido que existe una interacción entre el peso corporal y el efecto de la fibra sobre la saciedad y la ingesta de energía (Burton-Freeman, 2000).

Se eligió el prebiótico oligofruktosa producido por la empresa Beneo con su producto comercial Orafiti P95, el cual proviene de la hidrólisis de inulina de raíces de chicoria, con un grado de polimerización (DP) menor a 12, su selección se sustenta en los numerosos estudios *in vitro* e intervenciones *in vivo* que demuestran su efecto bifidogénico (ver referencia Kolida y Gibson 2007), Stewart et al., (2008) concluyeron en estudios en sistemas de fermentación *in vitro* que los fructooligosacáridos exhiben más rápida fermentación que inulina y prebióticos de cadena larga. Un último estudio *in vivo* conducido por Mazzola et al., (2015) tuvo como objetivo la evaluación de la actividad prebiótica de varios polisacáridos comerciales, incluyendo las fibras empleadas habitualmente en la dieta humana, tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y la inulina en cepas de *Bifidobacterium*. Como tendencia general, GOS, sc-FOS (DP 2-5) y la oligofruktosa (DP<12) podrían sostener el crecimiento de las cepas ensayadas, lo contrario con FOS de alto peso molecular (inulina) que estimularon el crecimiento de sólo un número limitado de cepas.

En las siguientes líneas se fundamenta por qué se ha seleccionado la impregnación a vacío.

El enriquecimiento de frutas y vegetales con probióticos, prebióticos, minerales, vitaminas y otros componentes fisiológicamente activos puede ser una buena elección para el desarrollo de alimentos funcionales. Existen diferentes técnicas para desarrollar este tipo de productos desde las tradicionales hasta las basadas en la ingeniería de matrices.

La Ingeniería de matrices utiliza la impregnación a vacío (IV) como mecanismo de incorporación de compuestos fisiológicamente activos, permitiendo introducir de manera controlada una cantidad de solución en la estructura porosa de frutas y vegetales. Esta solución puede contener además de estos compuestos, depresores de pH, aw, antimicrobianos u otros con el propósito de formular productos funcionales estables similares a los frescos (Fito et al., 2001).

Numerosas investigaciones demuestran la viabilidad de esta técnica para incorporar componentes fisiológicamente activos sin destruir la matriz inicial del alimento, como minerales (Barrera et al., 2004; Gras et al., 2002), compuestos fenólicos (Rozek et al., 2009, 2010; Rozek et al., 2010), probióticos (Betoret et al., 2003; Alzamora et al., 2005; Betoret et al., 2012) y vitaminas (Hironaka et al., 2011).

La respuesta de algunas frutas y vegetales a la IV con respecto a la deformación e impregnación han sido caracterizadas matemáticamente y experimentalmente (Fito, 1994). La manzana no sólo presenta los niveles más altos de porosidad efectiva, sino también su respuesta a la aplicación de vacío es lineal, lo que significa que la matriz sólida sufre deformaciones menores debido a los cambios de presión lo que permite un significativo enriquecimiento o fortificación.

Betoret et al. (2003) demuestran que es posible introducir células microbianas en la matriz del tejido celular de una manzana fresca mediante la técnica de IV. Impregnaron cilindros de manzana con tres líquidos de impregnación: zumo comercial de manzana inoculado con *S. cerevisiae* y *L. casei* (spp. *Rhamnosus*) y leche inoculada con *L. casei* (spp. *Rhamnosus*), logrando niveles de los

probióticos en el rango de 10^5 - 10^9 UFC/g de manzana fresca. Asimismo, demostraron la idoneidad del secado por aire caliente a 40°C como proceso de estabilización alcanzando valores del probiótico (10^6 - 10^7 UFC/g de manzana deshidratada) que se encuentran en los productos lácteos probióticos comerciales.

Adicionalmente, estudios señalan la conveniencia de la manzana como matriz que mejora la viabilidad de los probióticos en los alimentos. Piezas de manzana y pera, se mostraron como materiales adecuados para inmovilización de microorganismos probióticos como *L. casei*, los cuales al parecer son anidados en la estructura celulósica de estos frutos haciéndose resistentes por ejemplo a la fabricación de queso y procesos de maduración. Se señala a la celulosa como posible efecto protector durante el tránsito a través del tracto intestinal, lo que puede ayudar al microorganismo para alcanzar el colon (Kourkoutas et al., 2006). *L. rhamnosus* también demostró una buena adherencia a la superficie de pedazos de manzana (Alegre et al., 2011; Röβle et al., 2010). En otro estudio, piezas de manzana demostraron ser adecuadas para inmovilizar una levadura potencialmente probiótica *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de uva y para mantener la viabilidad del microorganismo durante más de cuatro meses bajo almacenamiento congelado, sin disminuir su actividad (Kourkoutas et al., 2006).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado hasta este punto se planteó desarrollar dos productos funcionales de tipo aperitivo a partir de manzana que potencien aún más los beneficios de esta fruta. El primero mediante la incorporación de un prebiótico y el segundo en el que el prebiótico unido al zumo de mandarina y a un probiótico luego de una incubación se constituya en un líquido de impregnación simbiótico, ambos incorporarlos en la matriz principal (manzana) por la técnica de impregnación a vacío. Se eligió tipo aperitivo (snack) por la facilidad de incorporación a una dieta diaria, su consumo extendido en todo tipo de población desde niños a personas adultas y el hábito de consumirlos entre comidas principales. En el mercado actual los aperitivos de mayor consumo son en su

mayoría: bocadillos dulces, galletas y salados (incluyendo papas fritas y aperitivos extruidos) y lamentablemente muchos de ellos tienen poco valor nutricional y aún menos funcional, bajos en fibra, y altos en calorías y grasas, muy dulces y salados por lo que su contribución a la salud es pobre. Queda mucho por hacer en términos de producción de aperitivos con un beneficio positivo a la salud, especialmente para los niños (Intel, 2009). Según Potter et al. (2013) una posible opción incluye la adición de ingredientes que tengan beneficios positivos para la salud, tales como frutas y verduras o fortificación con vitaminas, por ejemplo, o con ácidos grasos omega. En este contexto las frutas seleccionadas (manzana y mandarina) además de su importancia nutricional y funcional (en general, las frutas son bajas en calorías y grasa, más bien fuentes de fibra, vitaminas, minerales, antioxidantes), pueden ser una plataforma adecuada desde la cual desarrollar una merienda atractiva.

La presente tesis doctoral se plantea la siguiente hipótesis:

La manzana es una matriz conveniente para la incorporación por impregnación a vacío de prebióticos y un zumo simbiótico desarrollado a partir de la incubación de zumo de mandarina con un probiótico y enriquecida con prebiótico, aumentando la valoración funcional de esta fruta. Asimismo, es posible estabilizar las propiedades funcionales de la manzana fresca impregnada por secado por aire caliente, mejorando su estabilidad durante el almacenamiento.

2.2 Objetivos

La presente tesis doctoral se plantea como objetivo general:

El desarrollo de dos propuestas de alimento funcional de tipo aperitivo: un aperitivo funcional prebiótico a partir de manzana y oligofruktosa y otro que potencie las propiedades funcionales de la manzana por la incorporación de zumo de mandarina incubado con probiótico y prebiótico, ambos mediante impregnación a vacío y estabilización por secado por aire caliente.

Para alcanzar el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar y seleccionar la matriz base: variedad de manzana adecuada para el proceso de impregnación a vacío con prebiótico.
2. Determinar el efecto de los parámetros del proceso sobre el grado de impregnación de soluciones de prebiótico caracterizadas.
3. Determinar los parámetros de impregnación en solución isotónica de prebiótico.
4. Determinar el efecto del secado sobre el contenido de prebiótico.
5. Evaluar físico-química y funcionalmente el producto deshidratado después de almacenamiento.
6. Determinar el efecto de los factores: fuente/nivel de proteína, nivel de inóculo, concentración de prebiótico sobre el crecimiento microbiano en zumo de mandarina para el desarrollo del líquido de impregnación
7. Determinar el efecto de la incubación del zumo de mandarina formulado y su almacenamiento en refrigeración sobre las propiedades físico-químicas y funcionales.
8. Determinar la valoración físico-química y funcional de manzana impregnada con el líquido de impregnación desarrollado.
9. Determinar el efecto del secado por aire caliente en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la manzana impregnada.
10. Evaluar la evolución de las propiedades físico-químicas y funcionales de manzana impregnada con zumo de mandarina formulado y deshidratada durante su almacenamiento.

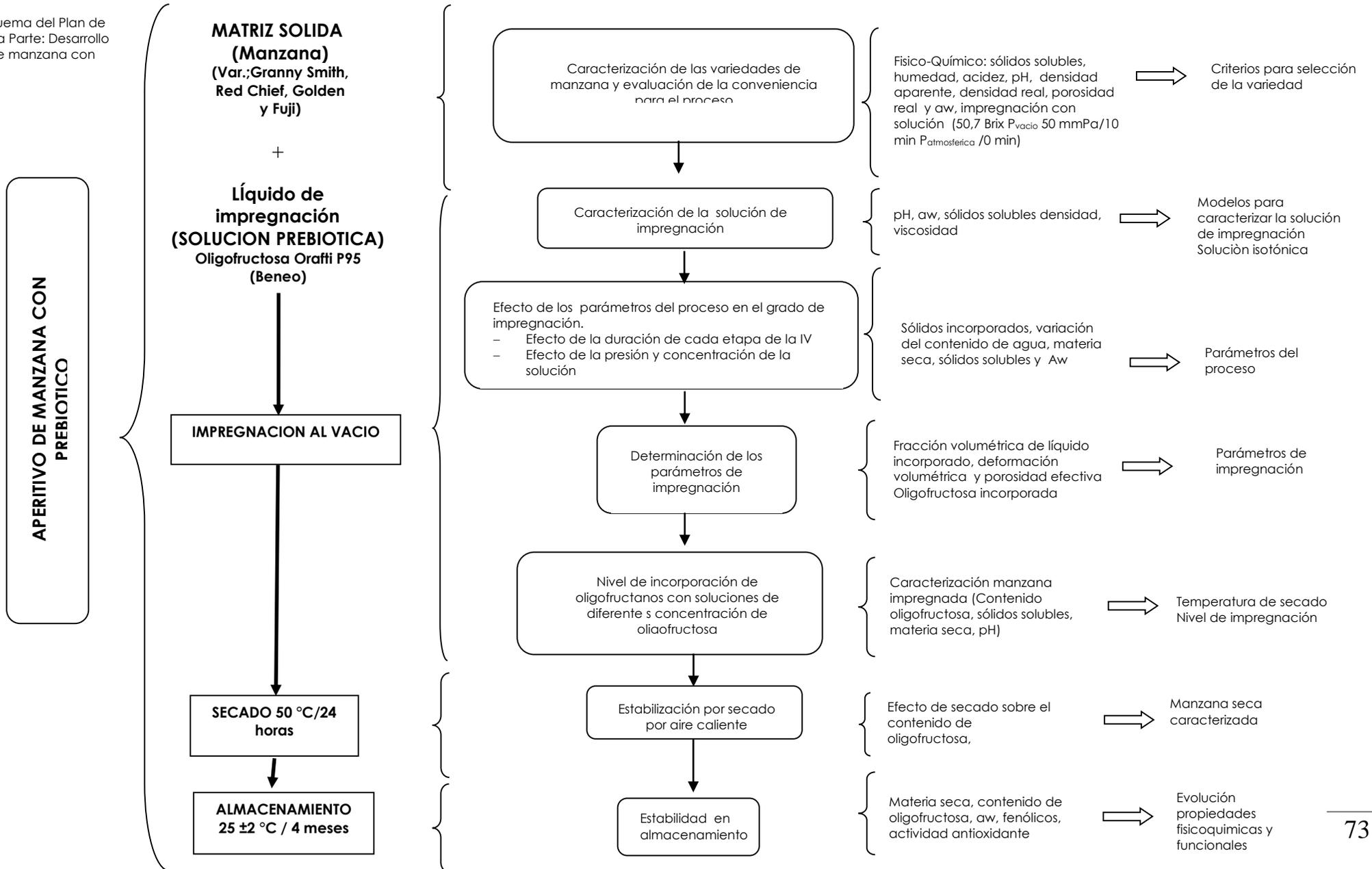
2.3 Plan de Trabajo

En las figuras 2.1 y 2.2 se presenta el plan de trabajo de manera esquemática y en las siguientes líneas se describen cada etapa.

2.3.1 Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica de las publicaciones científicas y técnicas sobre el tema en los últimos años a fin de ubicar el trabajo en el contexto de las necesidades y tendencias del mercado mundial de alimentos funcionales, las

Figura 2. 1 Esquema del Plan de Trabajo Primera Parte: Desarrollo de Aperitivo de manzana con prebiótico



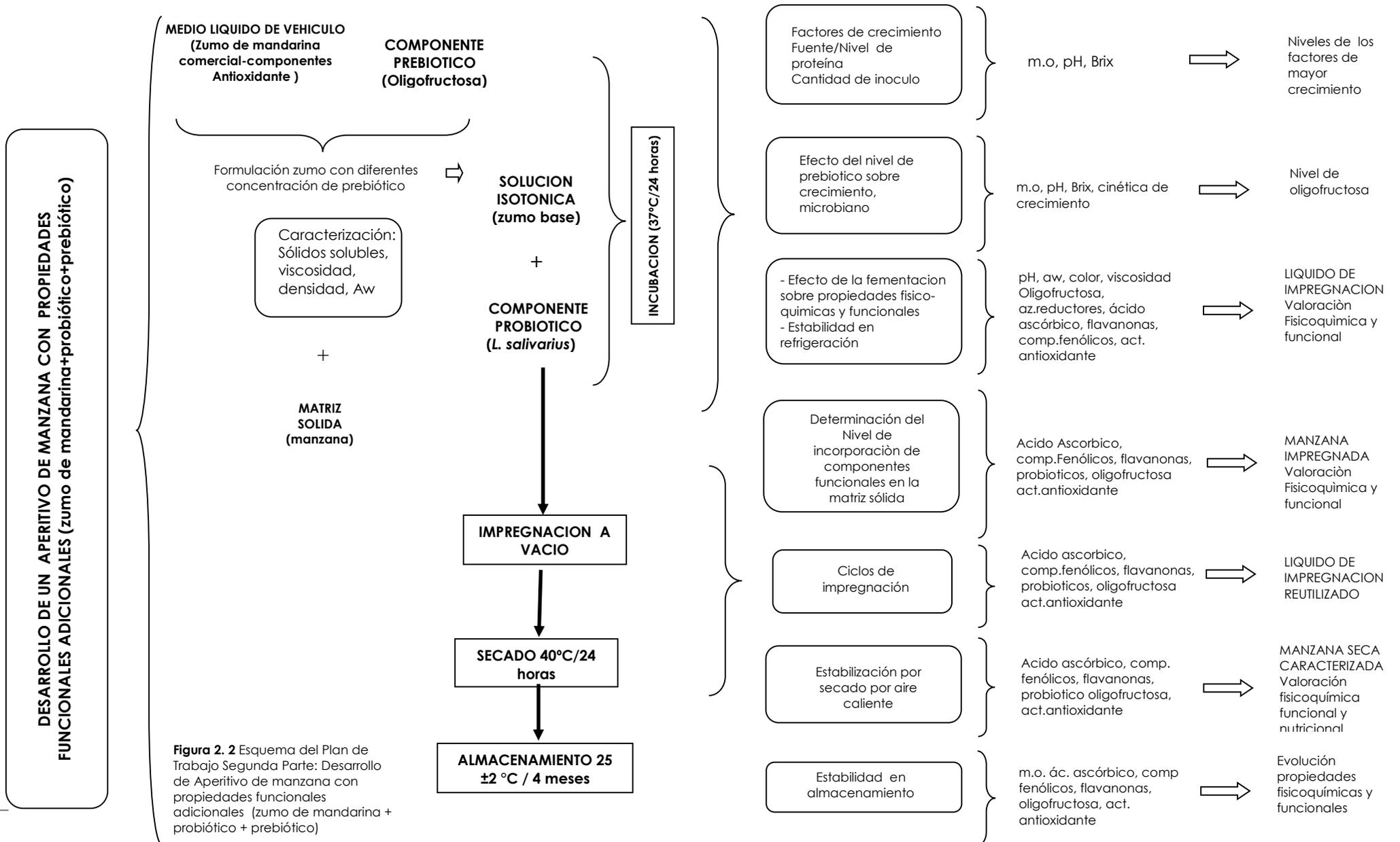


Figura 2. 2 Esquema del Plan de Trabajo Segunda Parte: Desarrollo de Aperitivo de manzana con propiedades funcionales adicionales (zumo de mandarina + probiótico + prebiótico)

tecnologías implicadas en el desarrollo de estos productos así como los avances científicos que pudieran predecir la funcionalidad de los aperitivos desarrollados a partir de los componentes bioactivos previstos en los alimentos elegidos para el desarrollo.

2.3.2 Desarrollo de un aperitivo de manzana con prebióticos

2.3.2.1 Caracterización de las variedades de manzana y evaluación de la conveniencia para el proceso.

Las variedades Granny Smith, Red Chief, Golden y Fuji se caracterizaron determinándose: sólidos solubles, humedad, acidez, pH, densidad aparente, densidad real, porosidad real y actividad de agua. Para evaluar la conveniencia de estas variedades a la técnica de impregnación a vacío, se determinó los sólidos incorporados después de la impregnación con una disolución de oligofruktosa de 50.7 °Brix, bajo una presión de vacío de 50 mbar durante 10 minutos seguido de una etapa a presión atmosférica durante 10 minutos adicionales.

El análisis de los resultados de esta caracterización así como consideraciones de disponibilidad de materia prima sirvió de base para la selección de la variedad adecuada para el proceso y con la que se siguió en las etapas siguientes.

2.3.2.2 Caracterización de las disoluciones de impregnación

Se prepararon disoluciones del producto comercial Orafiti P95 de la marca Beneo como fuente de oligofruktosa cuya ficha técnica indica una pureza de 93.2% de oligofruktosa, un grado de polimerización (DP) 2-8 y un contenido de azúcares: glucosa, fructosa sacarosa de 6.8%, en las concentraciones que se especifican en la tabla 2.1. Las disoluciones de impregnación fueron caracterizadas fisicoquímicamente, determinándose: sólidos solubles, pH, densidad, viscosidad y actividad de agua. Se evaluó el efecto de la concentración sobre estas

características y se ajustaron los datos experimentales a ecuaciones empíricas y modelos publicados.

Tabla 2. 1 Concentración de las disoluciones de impregnación

Disolución de impregnación	Concentración g/100mL ¹	Concentración g /100 g ²
1	5	4.82
2	20	17.96
3	35	29.87
4	50	40.89
5	65	50.90

¹ Expresado como g de producto Orafti P95 con un contenido de humedad de 3,01% en 100 mL de disolución.

² Expresado como g de oligofructosa+azúcares (93,2% oligofructosa, 7,8% azúcares) en 100 g de disolución.

2.3.2.3 Efecto de parámetros del proceso: presión y tiempo en el grado de impregnación

El efecto de las variables del proceso se estudió empleando muestras de manzana de la variedad Granny Smith. En todos los experimentos los frutos fueron pelados y cortados en rodajas de 5 mm de espesor en dirección perpendicular al eje longitudinal y descorazonadas con un sacabocados. Las dimensiones del diámetro externo e interno fueron 64.4 mm y 20.7 mm respectivamente.

Las pruebas de impregnación se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un equipo especialmente diseñado a nivel de planta piloto (Fito et al., 1996). Las muestras cortadas se pesaron individualmente y se sumergieron en la disolución de impregnación utilizando una rejilla para asegurar la inmersión completa en todo el proceso. Se mantuvo una relación de materia prima/disolución de impregnación de 2/100 p/p a fin de evitar cambios en la composición de la

disolución. Transcurrido el tiempo del proceso de impregnación, el cual consta de un tiempo bajo presión subatmosférica (vacío), restauración de la presión y tiempo bajo presión atmosférica, las muestras fueron sacadas, sacudidas y secadas superficialmente con papel adsorbente para eliminar la disolución adherida. Las muestras se pesaron y realizaron los análisis especificados en cada estudio.

Para el estudio de la influencia del tiempo durante el cual las muestras estuvieron sometidas a vacío (t_1) y a presión atmosférica (t_2), se empleó un diseño factorial completo que se presenta en la tabla 2.2 teniendo como factores: t_1 y t_2 y dos niveles en cada factor. Los experimentos fueron realizados por triplicado y a una presión de trabajo fijada en 50 mbar y con una disolución de 50.7°Brix. Las variables evaluadas fueron: sólidos incorporados y la variación del contenido de agua.

Para el estudio de la influencia de la concentración de la disolución y la presión de vacío se siguió el diseño factorial completo que se describe en la tabla 2.3, para el factor concentración de la disolución se seleccionaron 5 niveles y para el factor presión de vacío 3 niveles. El tiempo empleado para los tratamientos fue de 10 minutos para cada etapa. Las variables evaluadas fueron: sólidos incorporados, variación del contenido de agua, materia seca, sólidos solubles en el producto impregnado y actividad de agua.

Tabla 2. 2 Diseño experimental seguido para el estudio del efecto de la duración de la etapa a presión de vacío (t_1) y la etapa a presión atmosférica (t_2)

		t ₂ (min)	
		5	10
t ₁ (min)	5	X	X
	10	X	X
Presión de vacío (mbar)	50		
Variedad	Granny Smith		
Concentración de la disolución (¹)	65		

¹ Expresado como g de producto Orafti P95 con un contenido de humedad de 3,01% y 93,2% oligofruktosa en 100 mL de disolución

Tabla 2.3. Diseño experimental seguido para el estudio del efecto de la concentración de la disolución y la presión de vacío

		Presión de vacío (mbar)		
		50	200	350
Concentración de la disolución (¹)	5	X	X	X
	20	X	X	X
	35	X	X	X
	50	X	X	X
	65	X	X	X
t ₁ , t ₂	10 min			
Variedad	Granny Smith			

¹ Expresado como g de producto Orafti P95 con un contenido de humedad de 3,01% y 93,2% oligofruktosa en 100 mL de disolución

2.3.2.4 Determinación de los parámetros de impregnación característicos

Con la variedad de manzana seleccionada y la concentración de la disolución de impregnación isotónica se estudió los parámetros de impregnación: fracción volumétrica de líquido incorporado en el periodo a presión de vacío y al final del proceso, deformación volumétrica de la muestra en el periodo a presión de vacío y al final del proceso y porosidad efectiva, siguiendo el método propuesto por Fito et al. (1996). Asimismo, se determinó el contenido de oligofructosa incorporado por análisis químico y se caracterizó el producto mediante la determinación de pH, humedad, color y textura.

2.3.2.5 Efecto del secado sobre la estabilidad de los prebióticos y propiedades de color y textura

Muestras impregnadas fueron secadas a 50°C durante 24 horas y se evaluó el efecto del proceso sobre el contenido de oligofructosa y las siguientes evaluaciones físicas: textura, aw y materia seca.

2.3.2.6 Estabilidad de los prebióticos en almacenamiento

Las muestras impregnadas y secas fueron almacenadas a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) por espacio de 4 meses, al final del periodo se realizaron las siguientes determinaciones: materia seca, aw, contenido de oligofructosa, compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

2.3.3 Desarrollo de un aperitivo de manzana simbiótico con propiedades funcionales adicionales

2.3.3.1 Estudio de los factores de crecimiento en la incubación del zumo base con probiótico: fuente/concentración de proteína, cantidad de inóculo

El zumo base empleado en este segundo desarrollo fue un zumo comercial de mandarina de la marca Don Simon® y la cepa empleada *L. salivarius* spp *salivarius* CECT 4063 de la Colección Española de cultivos tipo (CECT) de la Universidad de Valencia y como fuente de oligofructosa se empleó el producto comercial de la marca Beneo Orafiti P95.

Un análisis de los componentes de un medio óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus* como es el caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y el zumo de mandarina, indica la deficiencia en los niveles de factores de crecimiento como: contenido de proteína, minerales y algunas vitaminas, del mismo modo el medio ácido característico de los zumos de cítricos no es un medio apropiado. En este último aspecto Betoret et al. (2012) determinaron el pH 6 como el más apropiado para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* y propusieron un ajuste con bicarbonato de sodio antes de la incubación, por lo que en las siguientes etapas del estudio del zumo base (solución isotónica: zumo de mandarina+prebiótico) ajustado a un pH de 6 con bicarbonato de sodio.

▪ Efecto de la fuente/concentración de proteína

Se evaluaron cuatro fuentes de proteína comercial: levadura fresca de panificación (Levital), levadura de cerveza (Deliplus) y proteína de soya (Ynsadiet), bajo dos niveles de fortificación 0.5 y 1% p/p. Las soluciones preparadas a partir del zumo base se incubaron a 37°C por 12 y 24 horas y se determinaron: el nivel de crecimiento del microorganismo y el pH.

▪ **Efecto de la concentración de microorganismo**

A fin de estudiar el efecto del nivel de inoculación sobre el crecimiento del microorganismos se evaluaron dos niveles: 0.4 y 4% v/v de cultivo madre en caldo MRS, el proceso de incubación se siguió como se explica en el apartado anterior.

2.3.3.2 Efecto de la concentración de prebiótico sobre el nivel de crecimiento del microorganismo y el nivel de impregnación

A fin de estudiar el efecto de la presencia de oligofruktosa sobre el crecimiento microbiano fueron ensayados tres niveles de fortificación del zumo: 5 (solución isotónica), 20 y 35% con la fuente y el nivel de proteína seleccionado en los pasos anteriores y se evaluó el nivel de crecimiento del microorganismo, pH, y la cinética de crecimiento durante 24 horas de incubación a 37°C.

2.3.3.3 Efecto de la incubación sobre las propiedades funcionales del líquido de impregnación

Se evaluó el efecto de la incubación 12 y 24 horas sobre propiedades físicas (pH, color, viscosidad, sólidos solubles, densidad) y los componentes funcionales determinándose: contenido de ácido ascórbico, oligofruktosa, flavanonas y actividad antioxidante. Fue seleccionado y formulado el zumo para las pruebas de impregnación.

2.3.3.4 Estudio de la impregnación con el líquido de impregnación desarrollado: valoración funcional

A fin de evaluar el enriquecimiento de la matriz de manzana con los componentes bioactivos del líquido de impregnación se realizó una valoración funcional de la manzana fresca y la manzana impregnada determinándose el contenido en: oligofruktosa, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, flavanonas y actividad

antioxidante. Asimismo, se determinó la incorporación teórica mediante la aplicación del modelo hidrodinámico propuesto por Fito (1994) y Fito y Pastor (1994).

2.3.3.5 Efecto de los ciclos de impregnación sobre las propiedades funcionales del líquido de impregnación

En esta parte se evaluó las propiedades funcionales del líquido de impregnación en 5 ciclos. Después de cada ciclo se determinó las propiedades fisicoquímicas (sólidos solubles, pH, color, viscosidad, aw), así como el contenido de microbiano, ácido ascórbico, compuestos fenólicos, flavanonas y actividad antioxidante.

2.3.3.6 Estudio de la viabilidad del microorganismo en el líquido de impregnación bajo almacenamiento a 4°C

Muestras del líquido de impregnación desarrollado fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C por 21 días y se evaluó semanalmente la estabilidad de sus propiedades fisicoquímicas (pH, aw, color y viscosidad) y el contenido del microorganismo probiótico.

2.3.3.7 Estabilización de las muestras impregnadas por secado en aire caliente

Para determinar el nivel de temperatura de secado las muestras fueron secadas a 30, 40 y 50 °C en un secador de aire caliente fabricado por POL-EKO-APARATURA a una velocidad del aire de 2 m/s y con renovación del aire total. Se determinó el nivel de supervivencia del microorganismo en el producto seco, seleccionándose aquella temperatura que aseguró el mayor contenido del probiótico en la matriz. Secado a esta temperatura y durante 24 horas se determinó la evolución del contenido de microorganismo, actividad de agua, y materia seca. La muestra seca se caracterizó en: color, textura, actividad de

agua, y la valoración funcional mediante la determinación del contenido de: flavanonas, ácido ascórbico, oligofructosa, fenólicos y actividad antioxidante.

2.3.3.8 Estudio del almacenamiento de manzanas impregnadas secas.

Las muestras secas fueron empacadas en bolsas SP-Film/Pouch 105 (Swiss Pack Pvt.Ltd) film constituido por tres materiales laminados: 12 μm Pet, 12 μm (Pet metalizado), 10 μm PE selladas herméticamente y se almacenaron a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) por espacio de 5 meses. Durante ese tiempo mensualmente se evaluó la evolución de: textura, color, aw y materia seca y propiedades funcionales como contenido de: flavanonas, ácido ascórbico, oligofructosa, fenólicos y actividad antioxidantes.

Parte III

Métodos Analíticos y Equipos

Capítulo 3

3. Métodos Analíticos y Equipos

Para el desarrollo de cada etapa del esquema experimental y el cumplimiento de los objetivos planteados se siguieron los métodos analíticos siguientes:

3.1 Análisis fisicoquímicos

3.1.1 Materia seca

Se determinó bajo el método oficial de la AOAC 20.013 el cual consiste en la medida de la diferencia de peso antes y después del secado de muestras en una estufa a vacío bajo una presión de 10 mmHg y temperatura de 60 °C hasta peso constante.

3.1.2 Sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles se determinó en un refractómetro ABBE ATAGO 3T (Atago CO LTD, Japón) termostatado a 20°C, mediante la lectura directa en grados Brix.

3.1.3 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las muestras sólidas se evaluaron mediante un ensayo de punción llevado a cabo con un analizador de textura marca Stable Micro Systems, modelo TA.XT plus y software Texture Exponent 32 versión 2.0.6.0. El ensayo se realizó con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 2 mm de diámetro a temperatura ambiente. Las condiciones del ensayo fueron: velocidad de avance del punzón de 2.0 mm/s, fuerza de activación de 0.04903N, distancia recorrida por la sonda de 10 mm y celda de carga de 50 kg. Los datos obtenidos en cada ensayo fueron fuerza máxima (N), distancia (mm) y pendiente de la parte lineal de la curva de deformación (N/mm).

3.1.4 Propiedades ópticas

El color de las muestras se midió con un espectrofotómetro Minolta modelo CM-3600d, utilizando un iluminante D65 y un observador estándar con un ángulo de visión de 10° (UNE 40-080, 1984). Para las muestras impregnadas y secas por tratarse de muestras translúcidas se corrigieron los valores obtenidos de acuerdo con la teoría de Kubelka-Munk de dispersión de luz múltiple (Hutchings, 1999) que describe las propiedades ópticas de una muestra a cualquier longitud de onda mediante un coeficiente de dispersión (S) y otro de absorción (K). Las medidas de color se expresaron en base a las coordenadas CIE L*a*b*.

3.1.5 Actividad de agua

Se determinó con un hidrómetro de punto de rocío Fast-Lab (GBX Francia) calibrado con soluciones saturadas de referencia. Las medidas fueron realizadas a 25°C.

3.1.6 Viscosidad

Se determinó la viscosidad aparente de las disoluciones de impregnación, bajo un gradiente de velocidad de 100 s^{-1} . El equipo empleado fue un reómetro rotatorio (marca HAAKE, modelo Rheo Stress RS1, Alemania) con un sensor cilíndrico cónico (Z34 DIN Ti) y con baño con control de temperatura (marca HAAKE, modelo Phoenix 2). Las medidas fueron realizadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.7 Densidad, densidad aparente y densidad real

La determinación de la densidad de las disoluciones de impregnación se realizaron por el método del picnómetro a 25°C .

Las determinaciones de las densidades real y aparente en manzanas frescas e impregnadas se realizaron mediante el método de desplazamiento de volumen, utilizando para ello un picnómetro de sólidos y agua destilada como líquido de referencia y a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. En la determinación de la densidad aparente se introdujo en el picnómetro 5 g de muestra sólida conservando toda su estructura y se enrasó con agua destilada evitando la formación de burbujas de aire en el interior del picnómetro y en la superficie de la manzana. Para la determinación de la densidad real se eliminó el aire presente en la muestra mediante la aplicación de vacío y se enrasó con agua destilada.

3.1.8 Porosidad real

La porosidad real se determinó a partir de las densidades real (ρ_r) y aparente (ρ_a) mediante la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_r = \frac{\rho_r - \rho_a}{\rho_a}$$

3.1.9 pH

Se realizó directamente sobre la pulpa molida de la manzana y el líquido de impregnación. Se empleó un multímetro Crison, modelo MM40 (Crison Instrument S.A. España) con multisensor 5059 con electrodo de diafragma cerámico, elemento de referencia Ag recubierto de Ag Cl y sensor de temperatura Pt 1000 para la compensación de temperatura, calibrado con buffer de pH 7.00 y 4.01

3.1.10 Acidez

Se determinó siguiendo el método oficial AOAC 942.15 (1997) que contempla una valoración con una disolución titulada de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. El contenido de ácido fue expresado en g de ácido málico.

3.1.11 Determinación de azúcares reductores

Fue determinado por espectrofotometría siguiendo el método del reactivo de p-hidrobenzoico hidrazida (PAHBAH) (AOAC 999.03) y expresado como glucosa.

3.2 Análisis funcional

3.2.1 Determinación de ácido L-ascórbico

El ácido L-ascórbico fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el método propuesto por Sánchez-Moreno et al. (2003) y empleando como solvente de extracción una disolución acuosa con 3% de ácido meta fosfórico y 8% de ácido acético. Para evitar la oxidación del ácido ascórbico, la extracción se realizó en atmósfera de nitrógeno. El extracto fue

filtrado con un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm . La separación del ácido ascórbico se realizó por HPLC (Alianza 1996-Water), usando una columna de fase inversa (Luna II Phenomenex) C18 (5 μm) de acero inoxidable (250 \times 4.6 mm de d.i.) y un detector de díodos. La fase móvil empleada fue una disolución al 0,01% de H_2PO_4 ajustada a pH 2.5–2.6, bajo un sistema isocrático con un caudal fijo de 1,0 mL/min y 20 μL de volumen de inyección. La identificación del ácido ascórbico se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de absorción UV–visible con los de un estándar de ácido L-ascórbico en una longitud de onda de 245 nm. Las medidas fueron realizadas por triplicado y la cuantificación fue realizada mediante el uso de una curva de calibrado del estándar de ácido L-ascórbico en un rango de 50 a 400 ppm.

3.2.2 Determinación del contenido de flavanonas

Las flavanonas fueron determinadas siguiendo el método propuesto por Cano et al. (2008), utilizando como solvente de extracción una disolución de dimetilsulfóxido y metanol (1:1 v/v). El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm . La separación de las flavanonas se realizó por HPLC (Alianza 1996-Water), usando una columna de fase inversa (Luna II Phenomenex) C18 (5 μm) de acero inoxidable (250 \times 4.6 mm de d.i.) y un detector de díodos. Las fases móviles empleadas fueron acetonitrilo (solvente A) y ácido acético al 0.6% (solvente B). Se empleó un sistema gradiente a 1 mL/min, con un tiempo de residencia de 30 minutos y un volumen de inyección de 10 μL . Las flavanonas fueron identificadas comparando su tiempo de retención y espectro de absorción a 280 nm con los patrones correspondientes. Se determinaron las concentraciones usando una curva estándar de calibrado entre 60 y 190 ppm para la hesperidina, entre 9 y 21 ppm para la narirutina y entre 2 y 7 ppm para la didimina.

3.2.3 Fructosanos

Para la determinación de fructanos se siguió el método espectrofotométrico/enzimático de la AOAC 999.03 utilizando un kit enzimático (Megazyme, Bray, Irlanda), el cual consiste en un proceso de extracción con agua a 80°C y un tratamiento de una alícuota del extracto con una mezcla de dos enzimas (sucrasa y amilasa) para hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa, y el almidón a glucosa bajo incubación a 40°C durante 30 minutos. Los azúcares reductores presentes son luego reducidos a sus alcoholes por tratamiento con una solución alcalina de borohidruro a 40°C por 30 minutos. La solución es neutralizada y el borohidruro en exceso removido con ácido acético diluido. Los fructanos luego son hidrolizados a fructosa y glucosa utilizando una fructanasa (mezcla purificada de exo y endo-inulinanasas) bajo incubación a 40°C por 20 minutos. Finalmente los azúcares reductores (glucosa y fructosa) se miden por espectrofotometría después de la reacción de la solución muestra con el reactivo ácido p-hidro-benzoico hidrazida (PAHBAH) en baño de agua en ebullición y lectura a 410 nm. El estándar empleado fue fructosa.

3.2.4 Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por triplicado, utilizando tres métodos diferentes: el catión radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), reportado por Roberta et al. (1999), el método radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), reportado por Brand-Williams et al. (1995) y el método FRAP descrito por Benzie y Strain (1996). La determinación de las muestras líquidas fue directa y, en los casos necesarios, se realizaron diluciones con agua destilada. Para las muestras sólidas se utilizó el método de extracción descrito por Michiels et al. (2012), utilizando como solvente acetona/agua/ácido acético (70:28:2 v/v/v) en presencia de nitrógeno para evitar reacciones de oxidación. El equipo empleado fue un

espectrofotómetro Perkin–Elmer UV/Vis Lambda 2 (Perkin–Elmer, Jügesheim, Alemania).

3.2.5 Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó según el método del reactivo Folin–Ciocalteu (FC) reportado por Singleton y Rossi (1965) en un espectrofotómetro Perkin–Elmer UV/Vis Lambda 2 (Perkin–Elmer, Jügesheim, Alemania). La determinación de las muestras líquidas, previamente diluidas, fue directa. El método de extracción para las muestras sólidas fue el mismo empleado para determinar la capacidad antioxidante y las mediciones se realizaron por triplicado.

3.3 Preparación de los cultivos microbiológicos y análisis microbiológicos

Cultivo liofilizado del microorganismo *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 de la Colección española de cultivos tipo fue recuperado mediante crecimiento en caldo MRS durante 24 horas a 37°C. El cultivo fue luego transferido a los zumos formulados en las concentraciones que se especifican en cada etapa del trabajo, en una proporción de 4 mL de caldo MRS por 1 L de líquido de impregnación. Los zumos inoculados fueron incubados durante 24 h a 37 °C. Para determinar el contenido de células microbianas en el líquido de impregnación y las muestras impregnadas, 1 mL ó 5 g de muestra respectivamente se mezclaron con 9 mL o 45 mL respectivamente de agua peptonada tamponada y se agitaron con un vórtex o trituraron con un homogenizador Stomaker respectivamente. De la solución madre se elaboraron diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} con agua pectonada y se sembraron en agar MRS por el método de doble capa e incubaron por 24 h a 37°C.

En la etapa de formulación para el estudio de la cinética de crecimiento del microorganismo probiótico se empleó el modelo modificado de Gompertz (Zwietering et al., 1990).

3.4 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los valores presentados corresponden a las medias \pm la desviación estándar. Por medio del software Statgraphics Centurion v. 16.1.11. se realizaron análisis de las varianzas (ANOVA para determinar las diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$)).

Parte IV

Resultados y Discusión

Capítulo 4

4. Desarrollo de un aperitivo de manzana con prebióticos

4.1 Caracterización de las variedades de manzana y evaluación de la conveniencia para el proceso.

En la tabla 4.1 se presenta la caracterización fisicoquímica y la capacidad de impregnación para las 4 variedades de manzana estudiadas: Granny Smith, Fuji, Golden, Red Chief. La composición concuerda con lo publicado por diferentes autores para estas variedades. A continuación se comentarán algunas de las variables, dada la influencia en el proceso de impregnación.

El pH y la acidez podrían condicionar la estabilidad de la oligofructosa durante las operaciones siguientes, sobre todo cuando éstas implican tratamientos a temperaturas elevadas como es el caso del secado.

Estudios realizados por Yun (1996) y Frank (2002) ponen de manifiesto que los fructooligosacáridos son altamente estables en el rango de pH de 4.0-7.0. A pH menores de 4, los enlaces tipo β de las unidades de fructosa, tanto en la inulina como en la oligofructosa, se hidrolizan con la consecuente formación de fructosa

perdiendo o reduciendo su capacidad prebiótica. Según los resultados obtenidos, las variedades que presentan un pH dentro del rango recomendado para la estabilidad de la oligofruktosa son: Fuji y Red Chief. Asimismo, es importante señalar que los pHs de las disoluciones de impregnación que se muestran en la tabla 4.2 están por encima de 4 por lo que su incorporación en las variedades mencionadas aseguraría valores de este parámetro en el intervalo recomendado para la estabilidad.

Tabla 4. 1 Caracterización fisicoquímica de diferentes variedades de manzana y evaluación del nivel de incorporación de oligofruktosa después de la IV

	Granny Smith	Fuji	Golden	Red Chief
Humedad¹	85.2±0.7	85.1±0.3	84.3±0.8	86.6±0.7
Sólidos solubles de la fracción líquida²	12.7±0.5	13.9±1.7	14.6±0.6	12.5±1.1
Acidez³	0.55±0.07	0.1645±0.0007	0.3326±0.0013	0.08569±0.00106
Actividad de agua (aw)	0.988	0.987	0.986	0.988
pH	3.26±0,02	4.033±0.012	3.637±0.006	4.27±0.02
Densidad aparente⁴	0.837±0.009	0.882±0.015	0.781±0.003	0.842±0.007
Densidad real⁴	1.054±0.002	1.059±0.012	1.055±0.003	1.051±0.002
Porosidad real⁵	20.5 ±1.1	16.7±1.3	26.0±0.3	19.9±0.6
Sólidos incorporados⁶	9.9±0.5	9.4±0.9	11.4±1.1	9.8±0.4
Contenido de oligofruktosa en el producto impregnado⁶	8.6±0.5	8.2±0.7	9.5±0.9	9.2±0.4

¹ g agua / 100 g muestra ²°Brix, ³ g ácido málico/100 g peso fresco, ⁴ g/mL, ⁵ %, ⁶ g/100 g producto fresco obtenido bajo la impregnación con una disolución hipertónica de 50,7 °Brix

Por otro lado, es importante analizar propiedades físicas (porosidad, densidad) relacionadas con la estructura de la manzana para explicar su comportamiento en la IV. Los tejidos vegetales se componen de espacios intercelulares altamente interconectados llenos de aire y que forman una complicada red de caminos tortuosos y clusters que contribuyen a la heterogeneidad del tejido. Particularmente la manzana es un tejido vegetal anisotrópico con alta porosidad. La porosidad y espacios intercelulares se incrementa del centro a la periferia del parénquima de la manzana (Schulze et al., 2012). Las células de la región interior tienen una forma elongada cilíndrica y son orientadas de manera uniforme, mientras que células esféricas de la región exterior no están orientadas uniformemente (Chalernchat et al., 2010).

La porosidad constituye una medida de los espacios llenos de aire en el tejido y a nivel de la impregnación a vacío (IV) representa el máximo espacio que puede ser ocupado por un medio líquido. Esta compleja red es dependiente de la especie, cultivar, estructura del tejido y funcionalidad (Raven, 1996). La manzana es reconocida por poseer altos valores de porosidad comparada con otras frutas. Los valores encontrados en la bibliografía para diferentes variedades se encuentran en el intervalo de 17.4 – 27.3 %. Las porosidades obtenidas para las variedades estudiadas son del orden de los valores publicados (Salvatori et al., 1998)

Como una observación particular las variedades Golden y Red Chief presentaron una textura quebradiza durante la manipulación en las operaciones de cortado en rodajas e impregnación, esto podría considerarse un inconveniente para lograr rodajas enteras que continúen el proceso.

En cuanto al grado de impregnación puede observarse en la figura 4.1, que la variedad Golden presenta el más alto grado de impregnación con 11.4 % de

sólidos incorporados, mientras que las variedades Fuji, Granny Smith y Red Chief no presentan diferencias significativas, con valores de sólidos incorporados de 9.4, 9.9 y 9.8 % respectivamente.

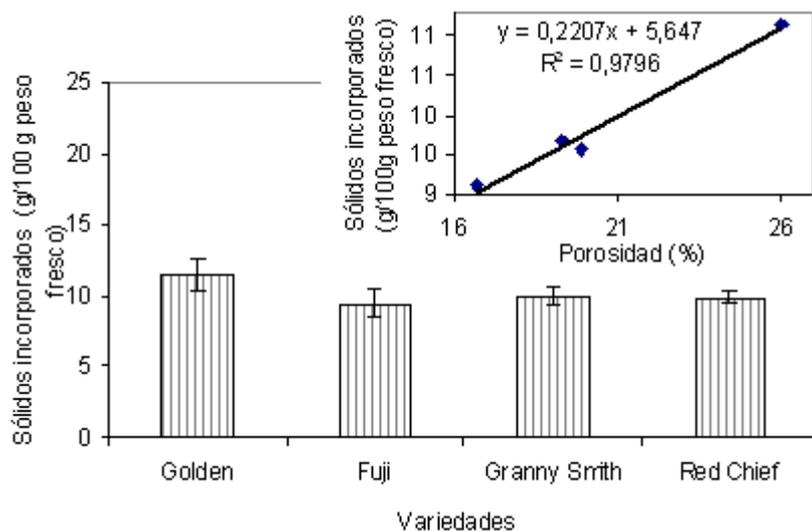


Figura 4. 1 Sólidos incorporados por impregnación y relación con la porosidad en variedades de manzana.

Como se ha mencionado anteriormente la impregnación de la muestra es dependiente de las características del material fresco como su morfología celular, fuerzas intercelulares y diámetro de los poros (Schulze et al., 2012). De esa manera tejidos con diferentes tamaños y geometría de los poros es de esperar muestren diferentes propiedades de transporte durante la IV (Panarese et al., 2013).

El mayor valor de sólidos incorporados obtenido para la variedad Golden podría atribuirse entre otros factores a la mayor porosidad que presenta (26%) con respecto a las otras variedades, corroborado por la buena correlación que presenta estas dos variables ($R^2=0.979$) (figura 4.1). Sin embargo, otras características también relacionadas con la estructura y propiedades mecánicas del material, estarían interactuando. Martínez-Monzó (1998) menciona que la estructura del tejido desempeña un papel importante no sólo por su porosidad

total sino también por el tamaño, forma y distribución de los poros, así como la forma de comunicación entre ellos y el líquido exterior, señala además que la existencia de poros más o menos impedidos a la transferencia de gas y líquido, condicionaría la deformación e impregnación del material.

La IV también depende de las propiedades mecánicas del material biológico (Derossi et al., 2011), los cambios de presión no solamente causan flujo de gas y líquido sino también una deformación/relajación de la matriz. Durante la primera etapa de la IV el producto generalmente se expande o aumenta de volumen al inicio, debido a la expansión del gas en los poros. Esto es seguido por una reducción del volumen cuando la matriz sólida se relaja en tanto el gas se libera del tejido. En la segunda etapa, la compresión causa deformación por relajación, debido a la penetración del líquido externo en los poros (Fito et al., 1996).

Schulze et al. (2012) estudiaron el efecto de la firmeza de frutos de 14 variedades de manzana (que incluye las variedades estudiadas en esta investigación) sobre el nivel de impregnación de un extracto rico en derivados de quercitina y reportaron una débil correlación negativa. Variedades más blandas presentaron mayor concentración de glicósidos de quercetina después de la IV, y señalaron que la rigidez afecta el proceso de enriquecimiento durante la deformación y relajación del tejido. Finalmente, añaden que las diversas características del tejido parenquimático influyen en el mecanismo hidrodinámico (HDM) y los fenómenos de relajación-deformación (DRP) y por lo tanto en el nivel de impregnación final. Por lo tanto, la estructura blanda de la variedad Golden unida a su mayor porosidad explicaría la mayor incorporación de líquido de impregnación.

El contenido de oligofructano estimado en las variedades estudiadas cuando la impregnación se llevó a cabo con una disolución hipertónica de 50.7 °Brix está comprendido entre 8.2 y 9.5 g/100 g producto impregnado, lo que demuestra una buena incorporación del prebiótico. Con disoluciones de diferente concentración

puede controlarse el nivel de oligofruktosa incorporada a fin de cumplir los requerimientos recomendados de este componente funcional.

4.2 Caracterización de las soluciones de impregnación

En la tabla 4.2 se presenta las características fisicoquímicas de las disoluciones de impregnación. Estas propiedades dictaminarán el desempeño del proceso y las características del producto impregnado. En la figura 4.2 se representa las relaciones entre la concentración de oligofruktosa y estas propiedades. Se han incluido valores bibliográficos para azúcares como sacarosa y/o fructosa con fines comparativos. Las ecuaciones ajustadas que modelan estas relaciones se presentan en la tabla 4.3.

Tabla 4. 2 Caracterización fisicoquímica de las disoluciones de impregnación

Disolución de impregnación	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Densidad (g/mL)	Viscosidad aparente (mPa-s)	aw
1	4.86±0.11	4.80±0.05	1.0173±0.0003	1.51±0.04	0.997±0.002
2	4.71±0.17	17.90±0.05	1.077±0.007	1.8848±0.0008	0.993±0.002
3	4.68±0.0	29.78±0.05	1.1262±0.0002	3.363±0.013	0.986±0.002
4	4.66±0.04	40.76±0.07	1.1795±0.0006	7.37±0.05	0.972±0.002
5	4.62±0.01	50.74±0.05	1.2322±0.0002	20.4±0.3	0.952±0.002

Los resultados muestran una relación lineal entre la concentración y las propiedades de: sólidos solubles y densidad (figura 5.2 A, B). Los valores de densidad de las disoluciones de oligofruktanos son ligeramente superiores a los valores publicados para soluciones de sacarosa.

Numerosas referencias reportan dificultades en la impregnación de frutas cuando se trabaja con disoluciones muy viscosas por una incompleta impregnación de los poros de la fruta, es por esto que la evaluación del grado

de aumento de la viscosidad con la concentración de oligofruktosa permitirá tener una idea del impacto de este parámetro sobre la facilidad o dificultad de penetración del fluido. En la figura 4.2 C se presenta el efecto de la concentración de oligofruktosa sobre la viscosidad. Cabe señalar que las viscosidades reportadas corresponden a la viscosidad aparente evaluada a una velocidad angular de deformación de 100 s^{-1} por lo que los valores deben ser tomados como valores de referencia y con fines de comparación.

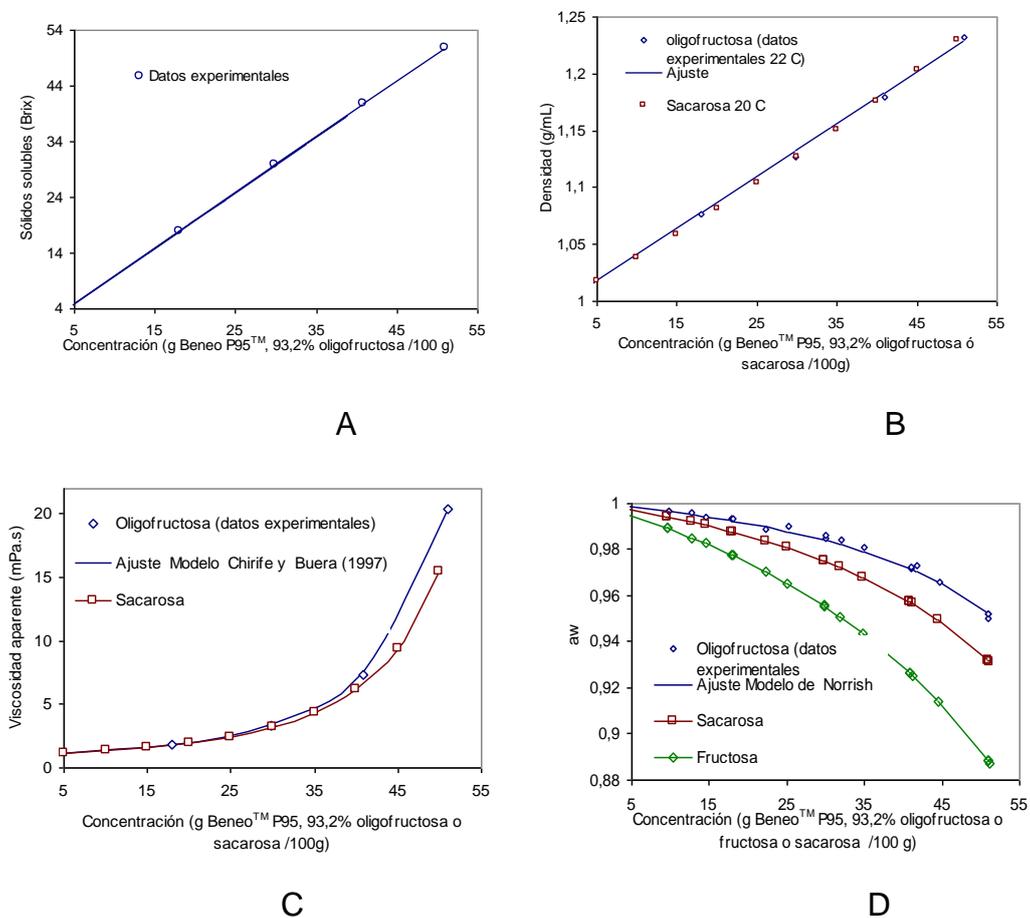


Figura 4. 2 Relación de las características fisicoquímicas: A) sólidos solubles, B) densidad, C) viscosidad aparente y D) actividad de agua de las disoluciones de impregnación con la concentración de oligofruktano.

A concentraciones por encima de 30 °Brix las disoluciones de oligofruktosa son más viscosas que sus correspondientes disoluciones de sacarosa, lo cual concuerda con lo señalado por Yun (1996), siendo esta diferencia más notoria

a mayores concentraciones. Respecto a esta propiedad, Martínez-Monzó (1998) trabajando con manzanas cortadas en forma cilíndrica de 2x2 cm de diámetro y altura, con tiempos de proceso de 15 minutos, y disoluciones isotónicas con viscosidades en el intervalo de 0.68-10 mPa.s encontró un descenso en el nivel de impregnación evaluado como fracción volumétrica de líquido incorporado desde 0.14 a 0.09 respectivamente, manteniéndose luego constante hasta niveles de 30 mPa.s. El intervalo de viscosidad de las disoluciones de impregnación del presente estudio fue de 1.5–20.4 mPa.s, por lo que es predecible encontrar un descenso en el nivel de impregnación. Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo propuesto por Chirife y Buera (1997) para disoluciones de no electrolitos mostrando un buen ajuste ($r^2= 0.999$). Los parámetros del modelo se presentan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Modelos ajustados y propuestos para las relaciones de las propiedades y la concentración de las disoluciones de impregnación.

Relación de propiedades	Ecuación	Modelo	R ²
°Brix-concentración ¹	$Brix=0.9968C$	Propuesto por la presente investigación	0.999
Viscosidad-concentración ²	$\mu=0.950\exp98.07X$	Chirife y Buera (1997)	0.999
Actividad de agua-concentración ³	$a_w=X_1 \exp (-16.873X_2^2)$	Norrish (1966)	0.992
Densidad-concentración ^{1,4}	$\rho=0.0046C+0.9952$	Propuesto por la presente investigación	0.999

¹C:concentración (g oligofruktosa/100 g solución). ² μ :viscosidad aparente (mPa.s), X: molalidad.

³ X₁:fracción molar agua, X₂:fracción molar oligosacáridos

⁴ ρ = densidad (g/mL)

Respecto a la actividad de agua el intervalo de valores obtenido en las disoluciones de diferentes concentraciones de oligofruktano fue de 0.997-0.952. En la figura 4.2 D se muestra la relación entre la actividad de agua y la

concentración de oligofruktosa, también se ha representado para disoluciones de sacarosa y fructosa estimadas a partir de la ecuación y parámetros de Norrish (1966). Se observa que los tres solutos presentan diferente capacidad para reducir la actividad de agua. La oligofruktosa provoca una menor depresión de la actividad de agua que la fructosa y la sacarosa, lo que repercutirá en la actividad de agua del producto final y por lo tanto en su conservación. Los resultados se ajustaron al modelo de Norrish, considerando un peso molecular promedio de 579 g/mol publicado por De Genaro et al. (2000), y obteniéndose un valor para el parámetro K de 16.873 ($R^2=0.992$). Comparado con los factores de 6.47 y 2.25 publicados para sacarosa y fructosa respectivamente, el valor es bastante más alto por el menor efecto depresor de la actividad de agua. Considerando una actividad de agua promedio en manzana de 0.987 puede señalarse que a concentraciones mayores a 29.9 % del producto comercial de oligofruktosa las disoluciones de impregnación resultan hipertónicas lo que provocaría junto a la impregnación por la acción del HDM, una deshidratación osmótica, debido a una acción acoplada de mecanismos dependientes de gradientes de concentración.

La bondad de ajuste de los modelos y ecuaciones empíricas reportadas en la tabla 4.3 pone de manifiesto que para el rango de concentraciones estudiadas, las propiedades pueden predecirse con estas ecuaciones con bastante aproximación.

4.3 Efecto de parámetros del proceso en el grado de impregnación.

En la figura 4.3 se presenta los balances de masa para los diferentes tratamientos y repeticiones, se ha representado la variación neta de masa total frente a la suma de las variaciones netas de agua y sólidos solubles. En todos los casos la distribución de los puntos experimentales se da sobre la recta de pendiente uno con intercepto en el origen, esto conjuntamente con la elevada correlación de la regresión ($r^2=0.9977$) valida los datos experimentales.

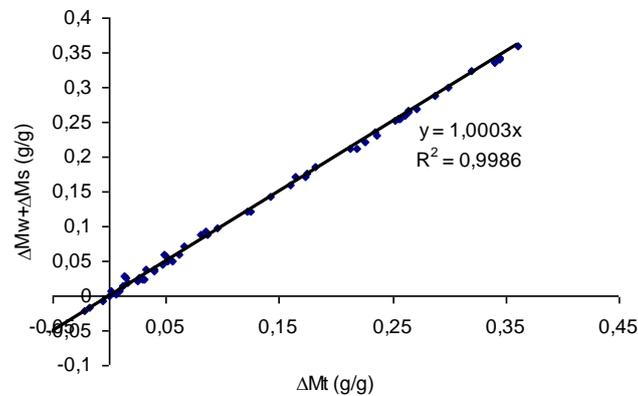


Figura 4. 3 Balance de Masa: Variación del contenido de agua y soluto ($\Delta M_w + \Delta M_s$) graficado contra variación de masa total (ΔM_t)

4.3.1 Efecto del tiempo de vacío y tiempo bajo presión atmosférica

Los altos valores de viscosidad de disoluciones de impregnación con alta concentración de la oligofructosa podrían determinar la necesidad de aplicar tiempos de tratamiento distintos para que se equilibren las presiones dentro del sistema. Existen diferentes investigaciones en las que se evalúa el efecto de esta variable en disoluciones isotónicas con geometrías variadas cuyas dimensiones características exceden de 1 cm y en las que se señala que el mecanismo hidrodinámico transcurre de manera muy rápida por lo que el tiempo no ha sido considerado limitante en la respuesta de la fruta a la impregnación (Salvatori, 1997; Mújica-Paz et al., 2003). Chiralt et al. (2001) señalan que la duración del periodo a presión de vacío en este tipo de proceso tiene que ser el necesario para alcanzar el equilibrio mecánico dentro del producto (igual presión interna y presión externa aplicada) con la consecuente salida de parte del gas interno y de líquido libre arrastrado con él. Asimismo, señalan que la cinética de la ganancia hidrodinámica de la disolución externa en el producto poroso durante el restablecimiento de la presión atmosférica en la segunda etapa del proceso es muy rápida comparado con un proceso difusional y es únicamente dependiente de la caída de presión durante el flujo del líquido determinada por su viscosidad, además de la porosidad y la tortuosidad de la matriz sólida.

Salvatori et al. (1998) estudiaron la respuesta de algunas frutas a la impregnación a vacío, evaluaron el efecto de la duración de los dos periodos en el proceso, en el intervalo de 5-15 minutos con disoluciones isotónicas. Los resultados no presentaron diferencias significativas en ninguna de las frutas estudiadas y lo atribuyen a la rápida cinética del fenómeno acoplado de deformación-penetración lo cual conduciría a una situación de equilibrio para la acción del mecanismo hidrodinámico (HDM) en el rango de tiempo estudiados en sus experimentos.

Sin embargo, otras investigaciones trabajando con disoluciones muy viscosas, consideran que el tiempo es un factor limitante y que debe ser evaluado para mejorar la eficiencia de la impregnación (Martinez-Monzó, 1998; Guillemín et al., 2008).

Guillemín et al. (2008) estudiaron el efecto de la viscosidad y la osmolaridad en la eficiencia de la operación de impregnación en cubos de manzana de 1cm, encontrando que la impregnación con disoluciones hipertónicas no viscosas fue bastante homogénea. Por el contrario cuando trabajaron con disoluciones hipertónicas y viscosas no obtuvieron una impregnación eficiente, bloqueándose el flujo de la disolución de impregnación en la zona superficial. Este resultado lo atribuyeron a un efecto sinérgico de la disipación de energía debido al fenómeno de fricción y la pérdida de rigidez de la estructura parenquimática de la manzana resultado de la pérdida de turgor por deshidratación osmótica de las células de manzanas.

Los resultados expuestos hasta ahora justifican la necesidad de evaluar el efecto de los tiempos de las etapas a presión de vacío y a presión atmosférica. Para estos ensayos se eligió la disolución de impregnación de mayor viscosidad a fin de considerar las condiciones menos favorables.

En la tabla 4.4 se presenta el efecto del tiempo de la etapa a vacío (t_1) y el tiempo de la etapa a presión atmosférica (t_2) sobre los sólidos incorporados y la variación del contenido de agua.

Tabla 4. 4 Efecto del tiempo de proceso (t_1 , t_2) sobre los sólidos incorporados y la variación del contenido de agua

t_1 (min)	t_2 (min)	Sólidos incorporados (g/100 g fruta fresca)	Variación del contenido de agua (g/100 g fruta fresca)
5	5	5.93±1.03	-4.4±0.4
	10	6.9±0.2	-5.1±0.9
10	5	5.8±0.2	-7.3±0.9
	10	6.9±0.5	-7.7±2.9

Un análisis estadístico puso de manifiesto con un nivel de confianza de 95 %, que ni el tiempo a presión de vacío ni el tiempo a presión atmosférica tuvieron un efecto significativo sobre la cantidad de sólidos incorporados. Estos resultados reflejan que la cinética de impregnación fue rápida a pesar de la elevada viscosidad de la disolución (20 mPa.s). El relativamente amplio espacio intercelular y una estructura celular elástica encontrado en la manzana, aunado al pequeño espesor de las muestras (5 mm) estarían contribuyendo a la rapidez del proceso. Sí que se observa cierta tendencia a una mayor impregnación bajo un tiempo de 10 minutos a presión atmosférica. A la vista de estos resultados se puede indicar que 10 minutos para cada etapa es un tiempo suficiente para permitir la expansión y salida del gas del interior de las muestras durante la etapa a presión de vacío y su posterior impregnación.

El hecho de utilizar como disolución de impregnación una disolución hipertónica hace que conjuntamente a la impregnación por la acción del mecanismo hidrodinámico se produzca una deshidratación osmótica, debido a la acción solapada de mecanismos dependientes de la concentración. Como puede

observarse en la tabla 4.4 existe una pérdida de agua comprendida entre 4.4 a 7.7 % para tiempos totales del proceso de 10 a 20 minutos respectivamente.

4.3.2 Efecto de la presión de vacío y la concentración de la disolución de impregnación.

En este apartado se estudió el efecto de la concentración de la disolución de impregnación sobre el nivel de incorporación de sólidos representados en su mayoría de oligofruktosa (93.2%), con el objetivo de determinar el nivel de la concentración de la disolución de impregnación que garantice los requerimientos diarios recomendados. Asimismo, se evalúa la influencia del nivel de presión de vacío sobre la impregnación.

En la tabla 4.5 se presentan los resultados de las variables estudiadas, según el análisis de varianza, con un nivel de confianza de 95 %, ninguna de ellas se ve afectada por el nivel de presión de vacío aplicado, por el contrario la concentración de la disolución de impregnación sí ejerce un efecto significativo.

Tabla 4. 5 Efecto de la concentración de la disolución de impregnación y la presión de vacío sobre los sólidos incorporados, la variación del contenido de agua y algunas características en el producto impregnado.

Concentración de la disolución de impregnación (°Brix)	Presión de vacío (mbar)	Sólidos incorporados (g/100 g fruta fresca)	Variación del contenido de agua (g/100 g fruta fresca)	Materia seca (%)	Sólidos solubles en el producto impregnado	Sólidos solubles en la fracción líquida del producto impregnado	aw
4,8	50	1±0.2	31±4	10.1±0.5	9.2±0.4	9.3±0.4	0.991
	200	1±0.8	31±5	10.6±0.2	9,8±0.2	9.8±0.4	0.989
	350	1±0.5	28±5	10.5±0.5	9.7±0.4	9.8±0.4	0.990
17,9	50	5.4±0.5	20.9±0.3	14.7±0.2	13.8±0.2	14±0,2	0.986
	200	5.7±1.3	21.07±1.14	14.9±0.8	14.1±0.8	13.86±0.99	0.987
	350	4.8±0.6	17.88±1.13	14.7±0.8	13.8±0.6	13.9±0,7	0.988
29,8	50	6.7±0.8	10±4	17.07±1.07	16±0.6	16,2±0,7	0.983
	200	7±0.5	8±3	17.6±0.9	16.7±1.2	17.3±0.9	0.983
	350	7.81±0.99	9.4±0.6	17.9±0.3	16.92±0.12	17.1±0.2	0.983
40.8	50	8.5±0.7	-1±2	20.16±1.13	18.5±0.8	18.8±0.9	0.981
	200	8.3±0.3	-1±4	20±0.5	18.6±0.6	17.93±1.07	0.981
	350	6.6±0.5	-2±3	19.0±0.7	17.5±1.4	17.8±1.3	0.983
50.7	50	9.3±1.14	-5±2	21.5±1.5	20.0±1.6	20.3±1.5	0.980
	200	9.89±1.07	-6±2	20.1±1.4	18.72±1.14	19.42±1.07	0.981
	350	9.89±0.16	-4.7±0.7	22±0.7	20.8±1.4	21.0±1.2	0.980

En la tabla 4.6 se presenta los valores promedios de los parámetros evaluados para las diferentes concentraciones de la disolución de impregnación y en la figura 4.4 se representa las tendencias de estos parámetros.

En general, como era de esperar, se observa que los sólidos ganados se incrementan con la concentración, obteniéndose niveles de ganancia de sólidos del orden del 1 al 9.9% no obstante la tasa de este incremento disminuye, esta tendencia es también reportada por Mujica-Paz et al. (2003). Esta observación

da un indicio que otros factores dentro de los cuales podría considerarse la viscosidad y/o las características mecánicas del tejido estarían limitando una completa impregnación. Esto se observa más claramente al comparar con los sólidos que se esperaba incorporar bajo una asunción teórica de un llenado completo de los poros y una deformación nula de la matriz, tendencia que esta representada en la misma figura.

Schulze et al. (2012) encontraron la misma tendencia al estudiar el efecto de la presión osmótica sobre el grado de impregnación de una solución rica en derivados de quercetina, estos autores señalan que la disminución de sólidos solubles de 11 Brix a 0.3 °Brix, viene marcado por un incremento en el contenido de flavonoides impregnados en manzana (cultivar Braeburn). La impregnación a vacío con fluidos

Tabla 4. 6 Valores promedios de sólidos incorporados, variación del contenido de agua y algunas características del producto final en función de la concentración de la disolución de impregnación.

Concentración de la disolución de impregnación (°Brix)	Sólidos incorporados (g/100 g peso fresco)	Variación del contenido de agua (g/100 g peso fresco)	Materia seca (%)	Sólidos solubles de la fracción líquida del producto impregnado (%)	Sólidos solubles del producto impregnado (%)	aw
4.8	1.054±0.014	30.1±1.5	10.4±0.2	9.6±0.3	9.6±0.4	0.990
17.9	5.3±0.5	20.0±1.8	14.77±0.13	13.92±0.05	13.90±0.13	0.987
29.8	7.2±0.6	9.1±1.3	17.5±0.4	16.8±0.6	16.5±0.5	0.983
40.8	7.81±1.03	-1.2±0.9	19.7±0.6	18.2±0.5	18.2±0.6	0.982
50.7	9.7±0.3	-5.0±0.5	21.19±0.96	20.2±0.8	19.82±1.03	0.980

externos hiperosmóticos se caracteriza por inducir un estrés osmótico con la consiguiente pérdida de agua del tejido de manzana, una pérdida de turgencia y rigidez celular (Guillemín et al., 2008). Esta deshidratación osmótica puede contrarrestar los resultados de la impregnación. Por el contrario, el uso de fluidos externos hipotónicos facilita la penetración de la solución de impregnación debido a la presión osmótica. El líquido hipotónico pasa la membrana celular (plasmalema) al citoplasma hipertónico. La transferencia de masa en las células aumenta la impregnación a vacío y aumenta la turgencia celular, por lo que la fortificación por impregnación a vacío con soluciones hipotónicas debe llevarse controlando el gradiente de concentración con el fin de evitar la ruptura de células por una excesiva ganancia de agua y aumento de la turgencia de las células del parénquima (Pitt, 1992).

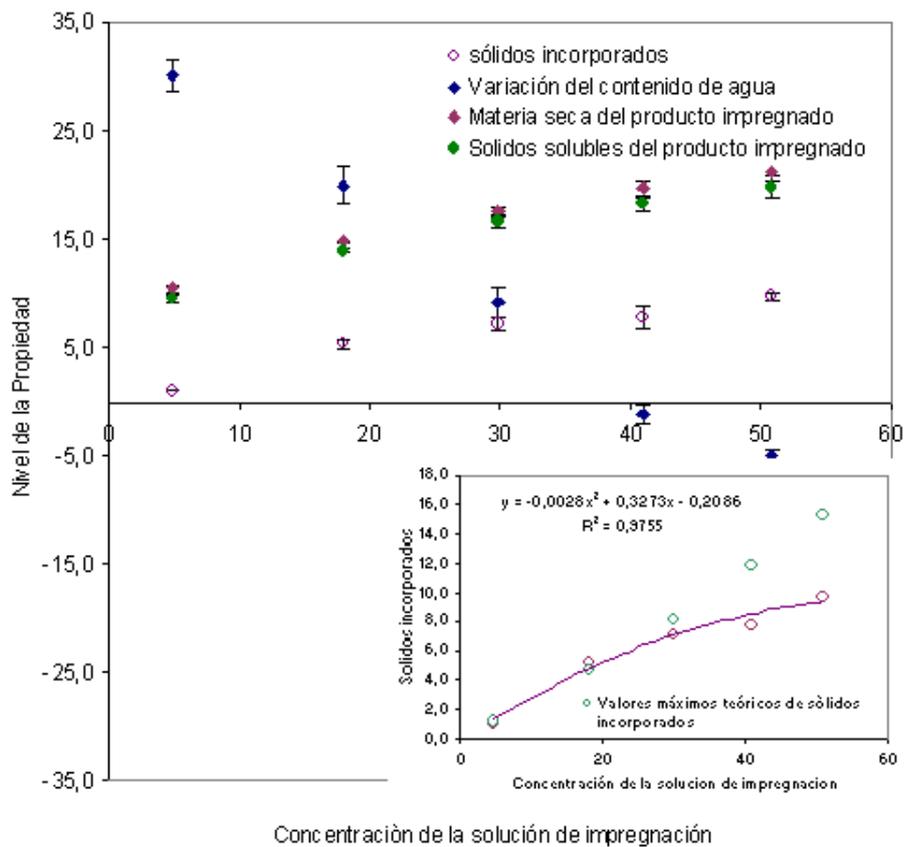


Figura 4. 4 Efecto de la concentración de la disolución de impregnación sobre el grado de impregnación y algunas características del producto impregnado.

La variación del contenido de agua presenta valores positivos y negativos. Los valores positivos se han obtenido empleando disoluciones hasta 29.8 grados Brix de concentración y el signo indica que hay una ganancia de agua. En las concentraciones de 40.8 y 50.7 grados Brix se observa en promedio valores negativos que indican una pérdida de agua. Estos resultados, en el primer caso pueden atribuirse al efecto de la baja viscosidad de las disoluciones de bajas concentraciones que favorece una rápida cinética de la impregnación (mecanismo hidrodinámico HDM), mientras que en las disoluciones más concentradas el ingreso estaría limitado por la viscosidad, presentando mayor dificultad en penetrar los poros de la fruta lo que acompañado de la mayor presión osmótica, favorecería el proceso de deshidratación.

En cuanto al efecto sobre la actividad de agua es importante señalar que la incorporación de sólidos ha permitido un descenso del nivel de actividad de agua con la disolución de más alta concentración (50.9 Brix) desde 0.987 correspondiente a la materia prima a 0,980 en el producto impregnado lo que significa un descenso de 0.7%. Martínez-Monzó et al. (1998) estudiaron la impregnación de manzana con mosto de uva rectificado a 50 grados Brix y consiguieron cambios del nivel de actividad de agua de 0.984 a 0.970 que implica un descenso de 1.4%. Mujica-Paz et al. (2003) obtuvieron descensos del orden de 1.88 % utilizando disolución de sacarosa de 50 °Brix como medio de impregnación. Estas diferencias se pueden atribuir a la mayor viscosidad de la disolución de oligofruktosa y al menor efecto depresor de este soluto.

4.4 Determinación de los parámetros de impregnación característicos: la fracción volumétrica de muestra impregnada con líquido (X), la deformación volumétrica de la muestra (γ) y la porosidad eficaz (ε) y aplicación del modelo de mecanismo hidrodinámico para estimar el contenido de fructooligosacárido impregnado

A la vista de los resultados y discusiones de los apartados anteriores, se seleccionó la variedad Fuji y Granny Smith para continuar con el estudio. Se

tomaron en consideración para esta selección factores como el pH dentro del intervalo adecuado para la estabilidad, incorporación de oligofruktosa a niveles recomendados y disponibilidad de la variedad a lo largo del año. Por otro lado, del estudio del efecto de la concentración de la disolución de impregnación sobre la incorporación de sólidos, puede deducirse que el empleo de una disolución isotónica lograría la incorporación de oligofruktosa a un nivel que contribuya a alcanzar los niveles de ingesta recomendados para este prebiótico unido al consumo de alimentos fuentes del prebiótico y de consumo habitual en la dieta. No obstante para poblaciones más vulnerables y con requerimientos especiales un mayor enriquecimiento sería recomendado.

En la tabla 4.7 se presentan los parámetros de impregnación. El valor positivo de la deformación volumétrica de la muestra en el periodo a presión de vacío (γ_1) indica un aumento del volumen de la muestra en esta etapa, debido a la expansión del gas ocluido en los poros (deformación-expansión). Asimismo, se presenta una salida de líquido nativo de los poros de la muestra arrastrado por el gas en la desgasificación deducido del valor negativo de la fracción

Tabla 4. 7 Parámetros de impregnación para rodajas de manzana Fuji y Granny Smith var. con disoluciones isotónicas de oligofruktosa

Variedad	$X_1^{1.3}$	$\gamma_1^{2.4}$	X^3	γ^4	Porosidad real % (ϵ_r)	Porosidad efectiva % (ϵ_e)	ϵ_e/ϵ_r
Fuji	-0.0044±0.0112	0.014±0.006	0.150±0.012	-0.013±0.004	16.7±1.3	16.2±0.5	0.97
Granny Smith	-0.0044±0.0112 ⁵	0.014±0.006	0.189±0.03	-0.032±0.004	16.7±1.3	19.644±0.016	0.95

^{1.3} Fracción volumétrica de líquido incorporado en el periodo de presión de vacío y al final del proceso respectivamente (m³ líquido /m³ muestra)

^{2.4} Deformación volumétrica de la muestra en el periodo de vacío y al final del proceso respectivamente (m³ de deformación/m³ muestra)

⁵ desviación estandar

volumétrica de líquido incorporado en la muestra (x_1). Al final del proceso de impregnación se estaría produciendo una contracción de la matriz sólida lo que explica el valor negativo de la deformación volumétrica final (γ). Estos resultados de los parámetros de impregnación concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones realizadas con esta materia prima.

Los valores bajos de las deformaciones demuestran la naturaleza viscoelástica del tejido parenquimático de la manzana de la variedad Fuji que le permite responder a los cambios de presión tendiendo a recuperar su forma cuando dejan de actuar los esfuerzos impuestos al sistema.

Asimismo, se muestra en la misma tabla 4.7 los valores de la porosidad efectiva (ε_e) obtenida a 50 mbar y la porosidad real (ε_r) determinada analíticamente. Se observa que la $\varepsilon_r > \varepsilon_e$ aunque estadísticamente no es significativo implicaría que tras el proceso de impregnación hay poros libres de solución para impregnar, esto explica el 1.3% de porosidad determinada en el producto impregnado. La razón entre la porosidad efectiva y la porosidad real representa la parte de la fracción porosa del material utilizable por el mecanismo hidrodinámico (HDM), en este caso entre el 95 y 97% de la fracción hueca de esta fruta quedaría llena de líquido después de un tratamiento de impregnación a 50 mbar. Salvatori (1997) estudiando la impregnación con disoluciones isotónicas en variedades de manzana obtuvo un intervalo de $\varepsilon_e / \varepsilon_r$ entre 0.69-0.94. El valor obtenido es mayor al reportado, probablemente debido a la baja deformación, al pequeño espesor de la muestra y las propiedades del fluido que han contribuido a una casi completa penetración de la disolución en los poros.

El grado de impregnación obtenido ha permitido un contenido final en el producto impregnado de 5.71 g de oligofructosa/100 g de manzana impregnada (tabla 4.8), nivel que se encuentra dentro del intervalo de valor recomendado.

Respecto a las características fisicoquímicas del producto impregnado, el pH corresponde al intervalo recomendado para la estabilidad del prebiótico. La densidad aparente se ha incrementado debido al reemplazo de los poros de la matriz vegetal con líquido de impregnación.

Tabla 4. 8 Contenido teórico, contenido por análisis químico de oligofruktosa y algunas propiedades fisicoquímicas en rodajas de manzanas impregnadas var. Granny Smith con disoluciones isotónicas de oligofruktosa

Contenido de oligofruktosa por análisis químico g/100 g producto impregnado	Contenido de oligofruktosa estimado por balances g/100 g producto impregnado	Contenido de azúcar reductor g/100 g impregnado	Materia seca (%)	pH	Densidad aparente (g/mL)	Densidad real (g/mL)	Porosidad (%)
5.71±0.52	5.54±0.55 ¹	13.85±0.57	20.93±1.02	4.51±0.01	1.047±0.005	1.061±0.004	1.3±0.18

¹ Desviación estandar

4.5 Efecto del secado sobre la estabilidad del prebiótico y caracterización del producto impregnado y seco: color y textura

La estabilidad de la oligofruktosa luego que las muestras impregnadas fueron secadas se muestra en la figura 4.6. Se observa que el contenido de oligofruktosa en el producto fresco impregnado no presenta diferencias significativas con las muestras sometidas a secado durante 12 y 24 h a 40°C, lo que demuestra una buena estabilidad de este prebiótico bajo estas condiciones. Como se señaló en un apartado anterior los pH menores de 4, provocan la hidrólisis de los enlaces de tipo β de las unidades de fructosa, además el proceso se acelera si va acompañado con exposición a altas temperaturas por tiempos

prolongados, lo que finalmente puede conducir a una reducción o pérdida de la capacidad prebiótica. Los niveles de pH del producto impregnado, la temperatura y el tiempo del proceso de este estudio han contribuido a la estabilidad del oligofrufructano.

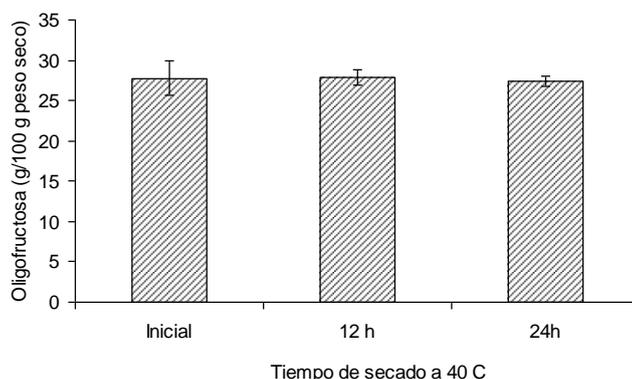


Figura 4. 5 Contenido de oligofrufructano de manzanas var. Granny Smith impregnadas al vacío e impregnadas y seca a 40°C después de 12 y 24 h.

En la tabla 4.9 se presenta los atributos de color: luminosidad (L) y coordenadas cromáticas (a^* y b^*) para las muestras en las diferentes etapas del proceso. Con respecto al efecto de la impregnación sobre la muestra fresca se observa una disminución del valor de luminosidad (L^*), un descenso de b^* y un aumento del valor de a^* . Estos cambios pueden explicarse teniendo en cuenta que la impregnación ha significado el reemplazo en el tejido de gas por disolución de impregnación, lo que ha significado pérdida de opacidad con el consiguiente aumento de la transparencia. La sustitución por disolución de impregnación induce a un índice de refracción más homogéneo en el tejido, promoviendo la absorción de la luz y una disminución de la reflectancia superficial.

Los parámetros de textura se muestran en la figura 4.5, asimismo las curvas típicas de ensayos de punción en las muestras frescas, impregnadas e impregnadas y secas. Para las muestras frescas, se trata de curvas en las que se observa un aumento rápido de la fuerza con la distancia lo que corresponde a una deformación previa a su fractura. Una vez alcanzada la fuerza necesaria, la fractura de algún elemento estructural permite la entrada del punzón a la

muestra lo cual provoca un cambio brusco en la pendiente de la curva de punción. A partir de ese momento la fuerza necesaria para empujar la sonda se mantiene con cambios en la fuerza en un intervalo de fuerza más o menos constante hasta una caída brusca. Este comportamiento es común de los tejidos vegetales frescos y porosos constituidos por células turgentes y fuertemente unidas, con grandes espacios intercelulares llenos de aire que oponen apenas resistencia al paso de la sonda. En el caso de las muestras impregnadas también se observa la misma tendencia, esto es debido a que las células permanecen intactas en el proceso. Al tratarse de disoluciones isotónicas no ha habido deshidratación. La incorporación de líquido más viscoso que el aire, explicaría la mayor fuerza implicada en la ruptura de las muestras impregnadas.

Tabla 4. 9 Atributos de color en rodajas de manzana var. Fuji, frescas, impregnadas e impregnadas y secas

Tratamiento	L	a*	b*	ΔE
Fresco (Humedad 85.1±0.4%)	67.29	-0.52	12.69	-
Impregnado (humedad 79.07±1.02%)	36.00	-0.29	6.78	31.84
Secado 12 h/40°C (Humedad 14.2±0.3 %)	55.22	-0.25	21.64	15.02
Secado 24 h/40°C (Humedad 10.8±0.3%)	56.81	-0.26	23.58	15.11

En cuanto a los atributos de textura el secado modifica la curvas de fuerza-deformación. Como se observa en la figura 4.5 las muestras presentan un único pico, con una mayor fuerza con respecto al producto fresco e impregnado para la ruptura debido a los cambios composicionales y estructurales que provoca la deshidratación, se observa asimismo una mayor deformación (menor pendiente) previa a la fractura, lo que está relacionado con el estado gomoso alcanzado por las mismas al final del proceso.

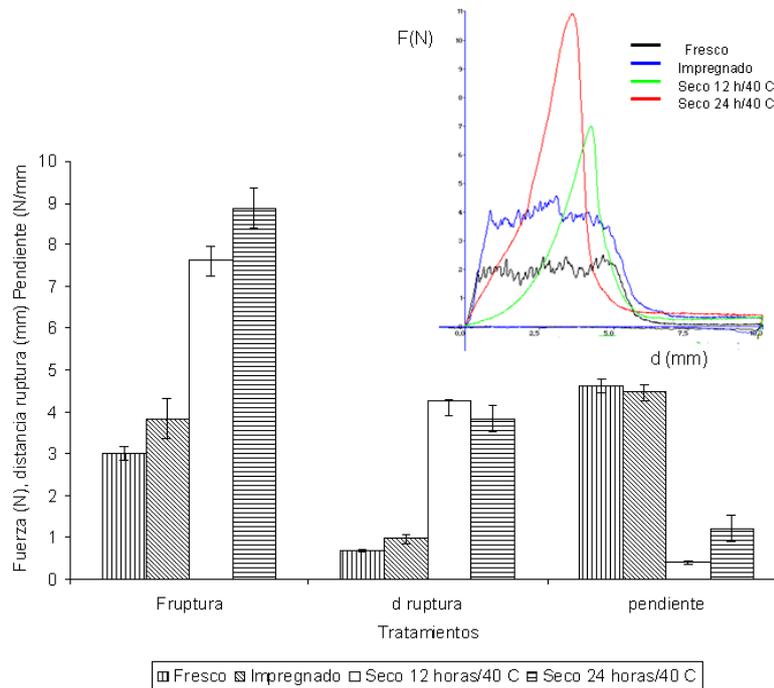


Figura 4. 6 Parámetros de textura para manzanas var. Granny Smith frescas, impregnadas e impregnadas secas y con oligofructosa y curvas de fuerza-deformación.

Respecto a las características de color del producto seco se observa que el secado recupera en alguna medida la luminosidad, aumenta ligeramente el valor de a^* y aumenta el valor de b^* con respecto a las muestras frescas impregnadas. Estos cambios tienen su explicación en la pérdida de agua que involucra la deshidratación.

4.6 Estabilidad del producto impregnado seco después de 4 meses de almacenamiento

En la tabla 4.10 se presenta los cambios en el contenido de agua, a_w y propiedades funcionales del aperitivo prebiótico desarrollado después de 4 meses de almacenamiento bajo condiciones ambientales (25°C).

Tabla 4. 10 Efecto del almacenamiento a 25 °C sobre las características físicas y funcionales del aperitivo prebiótico

Tiempo (días)	Humedad (g/100g)	aw	Oligofructosa (g/100g)	Actividad Antioxidante DPPH ¹	Compuestos Fenólicos Totales mg GAE ² /100g
0	5.99±0.34 ³	0.326±0.003	8.67	645.24±20.60	564.37±40.19
120	5.16±0.32	0.290±0.005	8.13	559.29±37.36	486.02±31.95

¹Método del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), expresados como mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de producto seco.

²Acido gálico equivalente (GAE)

³Desviación estandar

El valor de aw se encuentra por debajo del valor reportado como límite para asegurar una estabilidad microbiológica. Rahman (2010) señala que por debajo de una aw de 0.6 no hay crecimiento de hongos y levaduras, lo que garantizaría la seguridad microbiológica del aperitivo. Respecto al contenido de oligofructosa ésta presenta buena estabilidad con un descenso de 6% al final del periodo de almacenamiento. Existe una cantidad considerable de información sobre la estabilidad de los prebióticos, en particular, galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS) e inulina, principalmente en experimentos con sistemas modelo empleando tampón y en condiciones que no son aplicables para productos alimenticios que han sido enriquecidos con estos prebióticos y menos se ha evaluado la interacción entre la matriz alimenticia y la estabilidad de estos componentes (Vega y Zuniga-Hansen, 2015). Inulina y FOS son menos estables que otros oligosacáridos en condiciones de bajo pH y altas temperaturas, especialmente bajo la interacción de los dos factores, bajo estas condiciones los enlaces $\beta(2-1)$ entre las unidades de la fructosa pueden ser parcialmente hidrolizados (Vega y Zuniga-Hansen, 2015). Se ha reportado que el calentamiento de una solución de FOS a pH 3.5 y a 145 °C por sólo 10 s

produce la hidrólisis de aproximadamente 10% de FOS (Voragen et al., 1998), mientras que la exposición de una solución de FOS a temperaturas similares a los tratamientos de pasteurización (85 °C para 30 min), resultó en una reducción significativa en su actividad prebiótica (Huebner et al., 2008). Del mismo modo, en otro estudio bajo condiciones de pasteurización en rango de temperaturas entre 60 C y 70 ° C y pH entre 2.0 y 2.5 la degradación de FOS estuvo entre 10 y 30% (Wang et al., 2009).

Los resultados publicados por Matusek et al. (2009) en fructooligosacáridos bajo soluciones buffer en un rango de pH de 2.7-3.3 y en un intervalo de temperatura de 60-100°C, señalan que bajo condiciones ácidas la hidrólisis de fructo-oligosacáridos fue insignificante a 60 °C, sin embargo, en el intervalo de 70–80 °C la degradación fue considerable y a 90-100 °C todos los oligómeros fueron degradados entre 1 a 1.5 h, señalan estos autores que la concentración de protones de la solución aceleran la velocidad de degradación.

En otro estudio en donde se evalúa la estabilidad en almacenamiento se demuestra que a pH 2, el 63 y 38% de los FOS se hidroliza después de 56 días de almacenamiento a 37°C y 18 semanas de almacenamiento a 4°C, respectivamente (Coutin et al., 2009).

A la vista de estas referencias y los resultados de la presente investigación y teniendo en cuenta las diferencias en las condiciones en que se han realizado las investigaciones mencionadas, los resultados estarían indicando que una combinación de la actividad de agua, el contenido de agua y probablemente la matriz que contiene el probiótico estarían ejerciendo un efecto protector.

Al respecto l'Homme et al. (2003) señalan que a menudo los productos alimenticios donde se añaden como ingredientes los fructooligosacáridos tienen actividad de agua muy bajas por lo que la concentración y la actividad de agua también podrían tener un efecto sobre la degradación de los fructooligosacáridos.

Respecto al contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se observa descensos de 13.1 y 14 % respectivamente, después de 4 meses de almacenamiento. Lavelli y Corti (2011) estudiaron la estabilidad de cáscara de manzana deshidratada bajo dos métodos: a 40°C bajo vacío y por aire caliente a 60°C y almacenada por nueve meses a 30° C bajo actividades de agua en el rango de 0.11 y 0.75. Sus resultados señalan una máxima estabilidad para todos los fitoquímicos evaluados a la más baja aw con descensos de 14 y 17% para ambos métodos respectivamente. Las muestras deshidratadas con niveles de aw bajo 0.32 correspondiente a una humedad de equilibrio de 5% presentaron descensos entre 15 y 20% respectivamente, por encima de aw 0.32 el descenso fue marcado estando el nivel de las pérdidas alrededor de 66%, por lo que estos autores señalan el valor de aw de 0.32 como un umbral límite para asegurar la estabilidad de este producto.

Los niveles de actividad de agua intermedia son críticos para la estabilidad de productos desde que el contenido de humedad es suficiente para favorecer reacciones de Maillard y de oxidación (Brennan, 1994). Vaikousi et al. (2008) señalan que la velocidad de reacciones de oscurecimiento no enzimático es alta en productos deshidratados con contenidos de aw entre 0.5-0.8 (alimentos de humedad intermedia) debido a la elevada concentración de reactantes. Añaden que bajo 0.5 la reacción está limitada por la baja movilidad de los reactantes mientras que arriba de 0.8 la velocidad del oscurecimiento decrece con el incremento de aw por el efecto de dilución. Lavagui y Vantaggi (2009) señalan que niveles de aw por encima de 0.3 aumenta la velocidad de degradación de los compuestos antioxidantes en manzanas, probablemente debido al aumento de la movilidad de los reactantes y a la presencia de catalizadores en solución (Lavelli & Vantaggi, 2009).

A la vista de los resultados evaluados el secado hasta un nivel de 5% de humedad y a_w de 0.326 y las buenas características de barrera al vapor de agua y oxígeno del empaque empleado estarían contribuyendo a la estabilidad del aperitivo durante su almacenamiento.

Capítulo 5

5. Desarrollo de un aperitivo de manzana simbiótico con propiedades antioxidantes adicionales

5.1 Desarrollo del líquido de impregnación simbiótico a base de zumo de mandarina

En la tabla 5.1 se señalan las consideraciones positivas y negativas que se han tenido en cuenta para la selección del zumo de mandarina como base para el desarrollo de un medio de crecimiento para el probiótico, y su posterior incorporación a la matriz sólida de manzana por IV. Más adelante se evalúa su comportamiento como medio de crecimiento.

Tabla 5.1 Consideraciones positivas y negativas para la selección de frutas como vehículos alternativos de microorganismos probióticos.

Positivo	Negativo
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Son considerados alimentos saludables, ambos de probadas propiedades funcionales per se. ✓ Son consumidos regularmente (Sheehan et al., 2007). ✓ El crecimiento de probióticos en matrices alimenticias es mejor por su composición en componentes nutricionales y funcionales tales como prebióticos, vitaminas, minerales, fibra, enzimas que favoren su crecimiento (Ding y Shah, 2008, Sanders y Mateo 2010). ✓ Los zumos de fruta son ricos en ácido ascórbico agente reductor que disminuye el potencial redox promoviendo crecimiento y supervivencia de bifidobacterias (Grattepenche y Lacroix, 2013). ✓ Orientado a todo tipo de consumidor, incluso sectores limitados al consumo de productos lácteos: personas intolerantes a la lactosa, alérgicos a proteínas de leche, hipercolesterolémicos, vegetarianos estrictos (Granato et al., 2010). ✓ No contiene alérgenos (como las proteínas de la leche). ✓ No contienen cultivos iniciadores para competir con los cultivos probióticos por sustratos (Sohail et al., 2012). ✓ Jugos de fruta frecuentemente de forma natural o suplementada con ingredientes promueven condiciones anaerobias como el ácido ascórbico y contienen azúcares que pueden ser metabolizados por cultivos probióticos (Ding y Shah , 2008) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La adición de cultivos probióticos a los zumos de fruta presenta numerosos retos tecnológicos, debido a su acidez, la presencia de oxígeno, y las diferencias inherentes entre las frutas (Saeed et al., 2013; Vasudha y Mishra, 2013) lo cual hace más complicado el proceso. ✓ Los jugos de frutas contienen cantidad insuficiente de péptidos y aminoácidos libres requerido para el metabolismo del probiótico (Sheehan et al., 2007). ✓ Aplicaciones han demostrado barreras sensoriales luego de incubación con probióticos por el desarrollo de sabores y aromas no muy atractivos (Granato et al., 2010; Luckow y Delahunty, 2004; Saeed et al., 2013). No obstante, algunas frutas tropicales (piña, mango, maracuyá) contribuyen con sus aromas y sabores exóticos a prevenir la detección de esos sabores por los consumidores (Luckow et al., 2006). ✓ Los consumidores no están acostumbrados a que estos alimentos contengan probióticos.

5.1.1 Estudio de los factores que determinan el desempeño del zumo de mandarina como medio de crecimiento del probiótico para el desarrollo de un líquido de impregnación

Los *Lactobacillus* son miembros de las bacterias acidolácticas, un grupo definido ampliamente y caracterizado por la formación de ácido láctico como producto final único o principal del metabolismo de los carbohidratos. Ellos son estrictamente fermentativos, aerotolerantes o anaeróbicos, acidúricos o acidófilos, y tienen requerimientos nutricionales complejos (hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas). Utilizando glucosa como fuente de carbono, los *Lactobacillus* pueden ser homofermentativos (que producen más del 85% de los productos fermentativos como ácido láctico) o heterofermentativos (productores de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético en cantidades equimolares) (Tannok, 2004).

Los requisitos nutricionales de un microorganismo en general consisten de una fuente de carbono para la síntesis de las moléculas orgánicas y para la obtención de energía, una fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, algunos elementos esenciales como el azufre y el fósforo, así como otros micronutrientes incluyendo diversos minerales y vitaminas que son importantes cofactores comprendidos en las reacciones bioquímicas (Bionews, 2008). Los medios de cultivo comerciales son medios de propagación que proporcionan estos nutrientes y un pH óptimo en donde los microorganismos al ser incubados logran un desarrollo adecuado. Se han evaluado numerosos productos alimenticios como medios de incubación para la producción de microorganismos probióticos y en el desarrollo de alimentos funcionales. Tradicionalmente los medios más difundidos han sido las leches fermentadas y otros productos lácteos. Las bebidas tales como zumos de frutas o vegetales también han demostrado que pueden representar un medio ideal de vehículo de estos cultivos (Sheehan et al., 2007). Betoret et al. (2012), estudiaron el zumo de mandarina y zumo de piña/uva como medios de fermentación de los que se

seleccionó el primero como medio de crecimiento óptimo para el microorganismo *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063, previo a un acondicionamiento del pH con bicarbonato de sodio a pH 6 al nivel seleccionado como óptimo.

El pH de los jugos de frutas se encuentra en el rango 2.5-3.7, por lo tanto es una matriz segura desde el punto de vista microbiológico (Sheehan et al., 2007), sin embargo no lo es a nivel de tolerancia por los microorganismos probióticos. La sensibilidad bacteriana a condiciones ácidas afectan la viabilidad y la estabilidad de los mismos (Saarela et al., 2006; Sheehan et al., 2007; Saarela et al., 2009). Los valores de pH por debajo de 4 son normalmente perjudiciales para las cepas probióticas. También es preciso señalar que las bacterias probióticas varían en su tolerancia a los ácidos orgánicos y a los pH bajos (Champagne et al., 2008; Saarela et al., 2009; Sheehan et al., 2007). Los *Lactobacillus* son capaces de crecer y sobrevivir en productos fermentados con valores de pH entre 3.7 y 4.3 (Boylston et al., 2004). Especies de *Bifidobacterium* son reportadas ser menos ácido-tolerantes, y un nivel de pH inferior a 4.6 es perjudicial para su supervivencia (Dunne et al., 2001; Lee y Salminen, 2009; Boylston et al., 2004), por lo tanto su viabilidad y la estabilidad en zumos de fruta es normalmente pobre. De Vuyst (2000) reporta como rango óptimo de pH para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* el intervalo de 5.5-6.0 y 6.0-7.0, respectivamente.

Por otro lado, la tolerancia a medios ácidos de *Bifidobacterium* spp. depende de la cepa, de la especie y las características del sustrato. Por ejemplo, *B. longum* sobrevivió mejor en presencia de ácidos y sales biliares, y *B. lactis* en leches fermentadas (Korbekandi et al., 2011). Sheehan, Ross, y Fitzgerald (2007) observaron amplias diferencias en la resistencia a los ácidos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* cuando se añade a los zumos de naranja, piña y arándano. Todas las cepas sobrevivieron mejor en zumos de naranja y piña en comparación con el jugo de arándano. Entre las diferentes cepas, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei* sobrevivieron durante al menos 12 semanas en jugos de naranja y

piña en niveles superiores a 6.0 log UFC/mL (Rivera-Espinoza y Gallardo-Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010).

Zhao y Li (2008) estudiaron la adición de productos químicos (citrato de sodio, carbonato de calcio, D-isoascorbato o ascorbato de sodio) como un método simple para eliminar el estrés por acidez y niveles de oxígeno en cultivos de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*. Sus resultados muestran claramente la efectividad de estos productos químicos para mejorar las condiciones desfavorables de algunos medios para el crecimiento de probióticos.

El pH inicial del zumo de mandarina fue de 3.49 y por las razones expuestas fue estandarizado a pH 6 con bicarbonato de sodio para la continuación de los siguientes ensayos.

En base a un análisis de la composición del jugo de mandarina y del medio específico para *Lactobacillus* (caldo MRS) se planteó mejorar los componentes nutricionales que naturalmente ofrece el zumo a fin de acercarse a los requisitos del microorganismo y favorecer su crecimiento. Dentro de ellos además del ajuste del pH, se planteó la incorporación de una fuente de proteína y de un prebiótico.

5.1.1.1 Efecto de la fuente de proteína

Es bien sabido, que los *Lactobacillus* requieren medios complejos que contengan numerosos aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento relacionados, además de los carbohidratos fermentables (Morishita et al., 1981; Gomes y Malcata, 1999). Diferentes promotores de crecimiento tales como glucosa, vitaminas, minerales, caseína, proteínas hidrolizadas de suero, extracto de levadura y antioxidantes son empleados para fortificar los productos lácteos con el fin de incrementar la velocidad de crecimiento de especies probióticas cuando éstas especies han reportado pobre crecimiento en leche (Korbekandi et

al., 2011). Estos suplementos han tenido efectos positivos y significativos en la supervivencia de microorganismos probióticos en almacenamiento (Mohammadi et al., 2011). Ciertos derivados proteicos (concentrado proteico de suero, hidrolizado de caseína y triptona) promueven el crecimiento de los probióticos proporcionando los nutrientes a las células y reduciendo el potencial redox del medio, así como incrementando su capacidad buffer lo que resulta en una menor disminución del pH del medio (Dave y Shah, 1998; Mortazavian et al., 2010).

Diferentes investigaciones proponen la fortificación de jugos vegetales para mejorar la calidad nutricional antes de los procesos fermentativos con probióticos. Se ha demostrado que el empleo de levadura de cerveza autolisada incrementa el número de bacterias lácticas durante la fermentación (Aeschlimann y von Stocar, 1990; Rakin et al., 2004), reduce los tiempos de fermentación y enriquecen los jugos vegetales con aminoácidos, vitaminas, minerales y antioxidantes (Chae y In, 2001; Dziezak, 1987). Grattepenche y Lacroix (2013) señalan que las concentraciones añadidas de levadura de cerveza se encuentran en el rango de 1-2% para proveer los factores de crecimiento esenciales.

Ghaly et al. (2003) señalan que la adición de suplementos nutricionales como extracto de levadura o caseína hidrolizada entre otros, mejora la calidad del medio favoreciendo un rápido crecimiento celular debido a la presencia de la mayoría de los factores necesarios para el crecimiento bacteriano, que incluyen: aminoácidos, lípidos, nucleótidos (purinas y pirimidinas) y vitaminas (en caso de extracto de levadura), que promueven la propagación rápida de las células, mejoran el metabolismo y estimulan la actividad fisiológica de la células.

Con el objeto de estudiar si la fortificación de zumo de mandarina con proteína tendría un efecto positivo sobre el crecimiento del *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 se evaluó tres fuentes de proteína: una proteína unicelular (levadura de panificación), una proteína vegetal (proteína de soya) y levadura de cerveza, bajo dos niveles de fortificación: 0.5 y 1%. Las tres fuentes tienen un contenido

de proteína entre un 47 y 50% según datos tomados de la información comercial. Los resultados se presentan en las tablas 5.2 y 5.3, donde se observa que la fuente de proteína que promueve el mayor crecimiento microbiano es la levadura de cerveza, obteniéndose bajo un nivel de fortificación de 0.5%, un contenido final después de la incubación de 8.83 log UFC/mL seguido de la levadura de panificación con un contenido final de 8.53 log UFC/mL comparado con el blanco (sin aporte de proteína adicional y con control de pH) de 8.05 log UFC/mL. La proteína de soya no se presenta como buena alternativa bajo las dos concentraciones, probablemente debido a su baja accesibilidad al microorganismo por la baja solubilidad al observarse que queda en suspensión. La levadura de cerveza además de proporcionar proteínas de una buena calidad, una parte de ellas se encuentran en su forma hidrolizada como aminoácidos lo que la hace una fuente rápidamente aprovechable y asimilable. Dave y Shah (1996) mencionan que los microorganismos probióticos tienen débil actividad proteolítica y que requieren aminoácidos libres para una mejor multiplicación celular.

Tabla 5. 2 Efecto de la fuente y el nivel de proteína en el crecimiento del probiótico y descenso de pH después de la incubación de zumo de mandarina a 37°C por 24 horas

Fuente de proteína	Levadura Panificación		Levadura cerveza		Proteína de soya		Blanco ²	MRS
	0.5	1	0.5	1	0.5	1		
Nivel (%)	0.5	1	0.5	1	0.5	1		
log (UFC/mL)	8.51 ±0.09 ¹	8.61 ±0.14	8.833 ±0.106	8.92 ±0.06	8.09 ±0.02	8.344 ±0.013	8.06 ±0.09	9.032 ±0.117
pH	4.499 ±0.019	4.3858 ±0.0112	4.220 ±0.006	4.1038 ±0.0113	4.793 ±0.015	4.65 ±0.08	4.86 ±0.02	3.79 ±0.02
Aumento crecimiento microbiano (%con respecto a UFC)	182.7	262.9	486.4	610.9	4.6	86.7	100	-

1 desviación estándar, ² Zumo de mandarina con rectificación de pH a 6

Tabla 5.3 Valores comparativos del contenido microbiano (log UFC/mL) en el líquido de impregnación seleccionado con ajuste de pH y fortificación con proteína

Zumo	Log (UFC/mL)	Variación log (UFC/mL) con respecto al contenido inicial 6.92 ± 0.04 log UFC/mL (después de la inoculación)
Mandarina zumo comercial pH 3.49	7.30 ± 0.12	0.4
Mandarina zumo comercial rectificado pH 6	8.06 ± 0.09	1.1
Líquido de impregnación desarrollado pH 6, levadura de cerveza (0.5%)	8.833 ± 0.106	1.9

Adicionalmente, según los datos reportados en el producto comercial destaca en su composición su contenido de vitaminas del grupo B y minerales como: fósforo, zinc, cobre, hierro y manganeso, factores de crecimiento muy importantes para el microorganismo. Una mayor concentración de proteína (1%), si bien es cierto aumenta el recuento a 8.61, 8.92 y 8.344 log (UFC/mL) para la levadura de panificación, levadura de cerveza y proteína de soya respectivamente, no lo hace de manera proporcional. Se sabe que los microorganismos requieren micronutrientes y macronutrientes sólo en cantidades trazas, y además cantidades excesivas podrían ser responsables del retraso de la síntesis de material celular y las reacciones enzimáticas (Ghaly et al., 2003). Aeschlimann y von Stockar (1990) observaron que la suplementación de suero con concentraciones bajas de nutrientes mejora en gran medida la fermentación por *L. helveticus*, pero concentraciones más altas disminuyen la concentración de células como resultado de una toxicidad. En otro estudio conducido por Rakin et al., (2007) sobre la fermentación de los jugos de remolacha y zanahoria, la adición de autolizado de levadura de cerveza, contribuyó al aumento del número

de células viables de bacterias ácido lácticas durante la fermentación y en la producción de ácido láctico.

En todos los casos los niveles alcanzados por el microorganismos están dentro de los reportados como adecuados para tener un efecto funcional, algunas referencias señalan una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/g de células viables en el producto en el momento de consumo (Samona y Robinson, 1991), otras fuentes afirman que debe ser superior a 10^7 UFC/mL (Homayouni et al., 2008; Krasaekoopt et al., 2003).

En base a los resultados, la proteína de cerveza se presenta como el suplemento protéico más adecuado a una concentración de 0.5%. Mayor concentración es descartado porque el incremento no implica un aumento significativo de la carga del probiótico y además a concentraciones mayores la modificación del sabor se hace perceptible sensorialmente. Tomando como referencia la fermentación directa del zumo, sin modificación de pH y sin adición de proteína se puede observar que el ajuste del pH ha significado una mejora en 1.1 ciclos logarítmicos y la fortificación con proteínas una mejora de 1.9 ciclos logarítmicos.

5.1.1.2 Efecto de la concentración de microorganismo

Con el objeto de mejorar el contenido de probiótico en el líquido de impregnación, y en base a resultados de investigaciones en procesos de fermentación con probióticos donde se ha evidenciado que el nivel de inóculo ejerce un efecto sobre el contenido del probiótico al final de la fermentación (Angelov et al., 2006), se probó dos niveles de inoculación del cultivo madre del probiótico: 0.4 y 4% v/v. En la tabla 5.4 se presenta los resultados de estos ensayos, no se observa diferencias significativas bajo los niveles estudiados, debido probablemente a otros factores de crecimiento limitantes. A las 24 horas de incubación el nivel del aumento del recuento microbiológico por aumento de inóculo inicial fue de 11.26%. En cuanto al descenso del pH, el nivel de 4% de inóculo presenta mayor descenso de pH.

Tabla 5. 4 Efecto del nivel de inóculo sobre el desarrollo microbiano y descenso del pH

Tiempo fermentación (h)	Nivel de Inóculo inicial % (v/v)			
	0,4		4	
	log (UFC)/mL	pH	log (UFC)	pH
12	8.92±0.09 ¹	4.915±0.007	8.92±0.03	4.758±0.007
24	8.61±0.06	4.437±0.003	8.67±0.05	4.35±0.02

¹ Desviación estandar

5.1.1.3 Efecto de la concentración de oligofruktosa sobre el nivel de crecimiento microbiano

En los últimos años, ha habido un mayor enfoque en el desarrollo de productos simbióticos, una combinación de prebióticos y probióticos en un único producto (Bielecka, Biedrzycka, y Majkowska, 2002). Un simbiótico ha sido definido como una mezcla de probióticos y prebióticos que tiene un efecto benéfico en el huésped mediante la mejora de la supervivencia y la implantación de suplementos microbianos vivos en el tracto gastrointestinal o mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o activación del metabolismo de uno o un número limitado de bacterias benéficas (Gibson y Roberfroid, 1995). Existen investigaciones que evalúan el efecto de la inclusión de prebióticos sobre el crecimiento de microorganismos próbióticos, algunas de ellas concluyen que la presencia de prebióticos en las formulaciones puede favorecer el crecimiento y/o la supervivencia de microorganismos probióticos durante el procesado y almacenamiento. En un estudio conducido por Ho et al. (2009) se demostró que la adición de fructooligosacáridos promueve la fermentación de jugo de tomate por *Bifidobacterium* de las especies *B. breve* y *B. longum*. En otro estudio Shin et al. (2000) encontraron que la viabilidad de cepas de bifidobacterias comerciales en leche descremada enriquecida con fructooligosacáridos mejoró en un 55% con respecto al control después de 4 semanas en almacenamiento refrigerado, además concluyeron que el efecto se acentúa con el incremento de la concentración del carbohidrato hasta un 5%. Capela et al. (2006) estudiaron

el efecto de la inclusión de tres prebióticos en las formulaciones de yogurt sobre el contenido de probióticos, sus resultados demuestran que los fructooligosacáridos además de favorecer el crecimiento, presentan el mejor efecto sobre la viabilidad de probióticos seleccionados durante 4 semanas de almacenamiento a 4°C. Cabe señalar, que los niveles estudiados en estas investigaciones van desde 0,5 hasta 5%. Algunos autores (Livingston y Henson, 1998) sugieren que algunos fructanos (en particular inulina y fructooligosacárido) pueden ejercer un efecto protector contra condiciones de estrés tales como la congelación y la deshidratación debido a la probable interacción con los fosfolípidos de la membrana y a una más alta estabilidad de la membrana (Vereyken et al., 2001, 2003). Este efecto fue claramente demostrado por Schwab et al. (2007) para *L reuteri* que mostró una más alta estabilidad de la membrana cuando se congeló en presencia de fructooligosacárido con grado de polimerización (DP) de 12.

A la vista de estos antecedentes, se planteó evaluar si la presencia del prebiótico oligofruktosa podría contribuir a un mayor crecimiento del microorganismo en el zumo de mandarina y/o al mantenimiento de su viabilidad en el producto final. En la tabla 5.5 se presenta la caracterización de las disoluciones de impregnación que incluyen en su formulación el producto comercial Orafiti P95 como fuente de oligofruktosa a tres concentraciones: 5, 20 y 35%. Se seleccionaron estas concentraciones para asegurar después de la impregnación y deshidratación por aire caliente, contenidos de oligofruktosa en la manzana que se encuentren en el rango de requerimientos reportados en la literatura para un consumo normal y para consumo en regímenes especiales. En la misma tabla se indica la caracterización del producto impregnado y la estimación del contenido de oligofruktosa en un producto deshidratado con un contenido de humedad de 10%.

Tabla 5. 5 Caracterización del medio de impregnación y el producto impregnado con disoluciones de diferentes concentraciones de producto comercial ORAFTI P95 como fuente de oligofruktosa.

Características	Concentración de producto comercial fuente de oligofruktosa (ORAFTY P-95) en zumo de mandarina		
	5%	20%	35%
disolución de impregnación			
Sólidos solubles (°Brix)	15.75 ±0.02 ¹	28.56 ±0.08	41.4 ±0.1
Densidad (Kg/m ³)	1061.3 ±0.4	1118.3 ±0.3	1181.0 ±0.4
Viscosidad (mPa-s)	3.257 ±0.012	5.250 ±0.007	11.10 ±0.04
Actividad de agua	0.9895 ±0.0009	0.9815 ±0.0002	0.9662 ±0.0007
Manzana impregnada var. Granny Smith			
Sólidos solubles (°Brix)	13.67 ±0.17	15.725 ±0.106	17.6 ±0.2
Actividad de agua	0.990 ±0.002	0.988 ±0.002	0.9867 ±0.0013
Materia seca (g/100 g)	14.90	13.95	19.06
Contenido de oligosacárido (g/100 g b.h)	0.71 ±0.04	2.4 ±0.2	3.28 ±0.12
Contenido de oligosacárido (g/100 g b.s)	4.82	17.03	17.20
Estimación del contenido de oligosacárido en producto seco con 10% de humedad (g/100 g)	4.34	12.56	15.48
Estimación contenido de oligosacárido en una ración de 40 g snacks (g/40g)	1.7	5.02	6.2

¹ desviaciones estándares

Respecto al crecimiento microbiano bajo estos niveles de prebióticos, a diferencia de los resultados indicados por las investigaciones citadas anteriormente, se observa un efecto adverso en el crecimiento. Se presenta una reducción del crecimiento microbiano respecto al nivel inicial de 18.8, 61.6 y 93.6 % bajo los niveles de adición del producto comercial de 5, 20 y 35 % respectivamente.

Tabla 5. 6 Efecto de la concentración de oligofructosa en el desarrollo microbiano de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 durante la incubación de zumo de mandarina

Parametro evaluado	Nivel de oligofructosa en el líquido de fermentación			Medio referencial MRS	Blanco ¹
	5	20	35		
log(UFC)	8.6 ±0.1 ²	8.31±0.17	7.55±0.06	9.13±0.02	8.74±0.08
pH final	4.27±0.06	4.29 ±0.04	4.43±0.09	3.819±0.007	4.28±0.06
% Reduccion microbiana (UFC) respecto al blanco	18.8	61.6	93.6	-	0

1 Zumo de mandarina rectificado a pH 6 y con fortificación de 0,5% de proteína de levadura de cerveza

2 Desviación estandar

Los contenidos de sólidos solubles presentes en las formulaciones de los líquidos de impregnación al inicio de la incubación fueron de 15.75, 28.56 y 41.4⁰ Brix que representan los contenidos de azúcares presentes de forma natural en el zumo de mandarina junto con los oligosacáridos añadidos. Cabe mencionar que los azúcares y especialmente la glucosa son considerados como fuente de carbono en los medios de crecimiento y que la concentración recomendada esta alrededor de 2%. Los niveles estudiados en la presente investigación están muy por encima del valor recomendado lo que estaría

probablemente resultando en condiciones inhibitorias. Chikthimmah et al. (2001) reportaron un comportamiento similar bajo la presencia de niveles altos de NaCl (5 g/L), una inhibición del crecimiento de *Lactobacillus* y en consecuencia un incremento en el nivel de pH final. Gervais y Marechal (1994) mencionan que la disminución de la viabilidad de las células expuestas a altas concentraciones de hidratos de carbono puede ser debido a las altas presiones osmóticas, señalan que un estrés hiperosmótico muy grave puede llevar a la muerte celular por una salida pasiva de agua.

De Angelis y Gobbetti (2004) dan una explicación interesante de lo que sucede con los *Lactobacillus* al estar expuestos a estrés osmótico, señalan que aunque estos microorganismos con frecuencia están expuestos a cambios en las concentraciones de solutos en su hábitat natural, la concentración de solutos de su citoplasma necesita ser relativamente constante. Un repentino incremento en la osmolaridad del ambiente (estrés hiperosmótico) resulta en el movimiento de agua de la célula hacia el exterior lo cual causa una pérdida perjudicial de la presión de turgor de la célula, cambios en la concentración de solutos intracelular y cambios en el volumen de la célula. En general, condiciones de estrés hiperosmóticas impuesto por azúcar es mucho menos perjudiciales que altas concentraciones de NaCl y es únicamente transitorio porque los *Lactobacillus* son hábiles para equilibrar las concentraciones extracelulares e intracelulares. Para retener agua en la célula y así mantener la presión de turgor los *Lactobacillus* ponen en marcha mecanismos que les permiten acumular solutos específicos que no interfieren con la fisiología de la célula.

Poolman y Glaasker (1998) afirman que muchas bacterias son capaces de hacer frente a estrés hiperosmótico severo por la acumulación de solutos compatibles como la glicina, betaína y la carnitina, en el caso de las bacterias acidolácticas tienen poca o ninguna posibilidad de sintetizar estos solutos.

Los efectos explicados se manifiestan al evaluar la cinética del crecimiento microbiano en los tratamientos de 5 y 20% de concentración del producto

comercial. El uso de la ecuación modificada de Gompertz para describir la cinética de crecimiento del probiótico permitió cuantificar los parámetros: μ_m , tiempo lag λ y la asíntota ($A=\ln(N_\infty/N_0)$). Las diferencias en las velocidades de crecimiento observadas pueden atribuirse a la composición del sustrato y concentración de nutrientes presentes (Sharma y Mishra, 2014). Las curvas de crecimiento se presentan en la figura 5.1 con los ajustes al modelo de Gompertz. Los parámetros cinéticos estimados bajo el modelo se presentan en la tabla 5.7. En la figura 5.2 se presenta la evolución del pH en el mismo intervalo de tiempo.

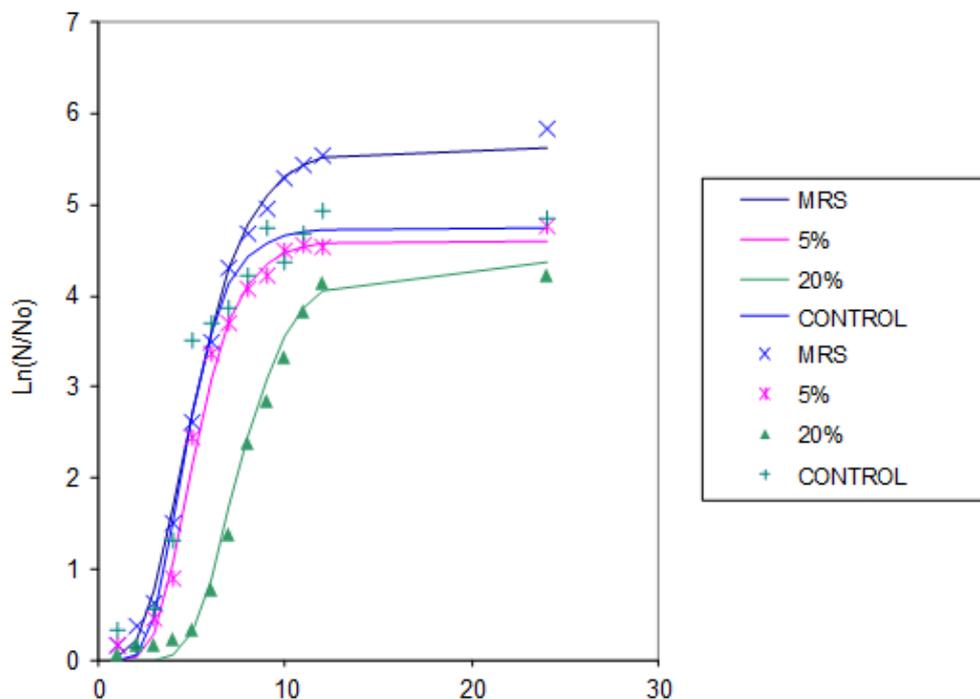


Figura 5. 1 Cinética de crecimiento microbiano de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en zumo de mandarina con oligofrutosa a 37°C por 24 horas

Tabla 5. 7 Parámetros cinéticos bajo el Modelo de Gompertz para crecimiento de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en zumo de mandarina con niveles de oligofruktosa incubada a 37°C por 24 horas

Parámetros cinéticos	Medio referencial MRS	CONTROL (0%)	Nivel de oligofruktosa	
			5%	20%
A ($\log N_{\infty}/N_0$)	5.6 ±0.2	4.73	4.60 ±0.13	4.36 ±0.19
μ_m ($\Delta \log \text{UFC}/\text{mL}\cdot\text{h}$)	1.1 ±0.2	1.22	1.08±0.06	0.81±0.03
λ (h)	2.36±0.13	2.75	3.01±0.06	4.9±0.4
R ²	0.996	0.986	0.993	0.988

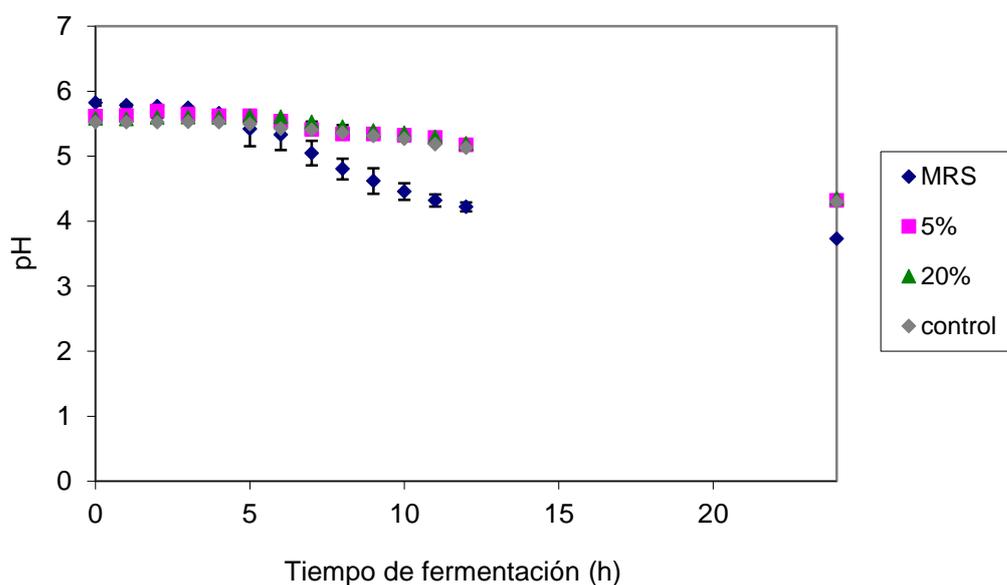


Figura 5. 2 Evolución del pH durante la incubación de zumo de mandarina con niveles de oligofruktosa y *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063

Los valores obtenidos en los parámetros del modelo confirman que la presencia de oligofruktosa está ejerciendo un efecto inhibitorio, aún más pronunciado con

la mayor concentración del prebiótico. Esto se desprende al comparar los tiempos de la fase lag de 2.36 h en el medio referencial (MRS) y 2.75, 3.01 y 4.94 horas en el zumo de mandarina control a 5 y 20% de concentración del producto comercial respectivamente. Estos resultados implican que el microorganismo necesita mayor tiempo en adaptarse a las condiciones de crecimiento para empezar la etapa de división celular. Por otro lado, el efecto de la incorporación de oligofruktosa al medio ejerce un efecto en el mismo sentido en la velocidad máxima de crecimiento que desciende conforme se añade en mayor concentración.

También es importante comentar que la curva de crecimiento del microorganismo puede proveer información valiosa para predecir la supervivencia del mismo en situaciones posteriores de estrés. Cuando se siembra de modo discontinua, la curva de crecimiento de cultivos bacterianos presenta cuatro fases distintas: log, lag, estacionaria y muerte. Es conocido que la respuesta de los cultivos bacterianos a condiciones de estrés varía dependiendo de la fase de crecimiento. Las bacterias que entran en la fase estacionaria desarrollan una tolerancia al estrés y son más resistentes a varios tipos de estrés (incluyendo posterior procesado y almacenamiento) que aquellas en fase log.

Esta mejora en la resistencia al estrés que es exhibida por las células de la fase estacionaria es considerado un resultado natural de la activación del sistema de respuesta del microorganismo frente al agotamiento de los nutrientes y la acumulación de metabolitos tóxicos durante la fase estacionaria (Fu y Chen, 2011; Brashears y Gilliland, 1995; Lorca y de Valdez, 1999; Morgan et al., 2006; van de Guchte et al., 2002). Se ha reportado que células en la fase estacionaria de *L. rhamnosus* dan altos índices de recuperación después del secado (31-50% de supervivencia) mientras que en la fase logarítmica temprana las células presentan únicamente 14% de supervivencia y en la fase lag las células muestran la más alta susceptibilidad con únicamente un 2% de supervivencia bajo similares condiciones de secado (Corcoran et al., 2004). Con la misma

especie Ananta et al. (2004) confirmaron estos resultados. Estudiaron el efecto de la fase de crecimiento de cepas de LGG (*Lactobacillus rhamnosus* GG) sobre la supervivencia durante el secado por atomización y el almacenamiento. Sus resultados revelaron que cultivos en fase lag presentan muy baja supervivencia (1,7% de supervivencia), mientras que en los cultivos en los primeros estadios de la fase logarítmica la supervivencia fue intermedia (14% de supervivencia) y en cultivos en fase estacionaria la supervivencia fue la más alta (50%) después del secado por atomización. Añaden que los microorganismos en la fase de latencia presentaron el mayor daño de la membrana después del secado.

Según las curvas obtenidas en la presente investigación un tiempo superior a 12 horas puede ser suficiente para detener el crecimiento. En las pruebas sucesivas, la incubación se llevó a cabo en un tiempo total de 24 horas por razones de operatividad en los ensayos.

El pH final del medio de crecimiento del cultivo probiótico también tiene influencia durante el secado. Fue reportado que la más alta viabilidad (aprox 80% supervivencia) fue obtenida en liofilización, cuando células de *L reuteri* crecieron a pH 5 fueron recogidas después de 2.5 horas en la fase estacionaria (Palmfeldt y Hahn-Hagerdal, 2000). Por otra parte las células obtenidas sin control de pH (4.5) fueron más resistentes al estrés térmico, atomización y almacenaje en estado seco que aquellas de cultivos bajo condiciones controladas (6.5) (Silva et al., 2005). Esta respuesta puede estar relacionada con la adaptación al shock ácido, lo cual puede alterar el estado fisiológico de las células bacterianas, lo que conduce al aumento de la síntesis de proteínas de choque térmico y por lo tanto a una mejora de la resistencia al secado, como se describe anteriormente.

Tras el análisis de los resultados, se eligió como formulación básica para la incubación del líquido de impregnación una fortificación con levadura de cerveza al un nivel de 0.5%, y de producto comercial fuente de oligofruktosa de 5% con el control del pH inicial de 6.

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

En la tabla 5.8 se presentan las propiedades físico-químicas y algunas funcionales del líquido de impregnación tras 12 y 24 horas de incubación a 37°C. En cuanto a las propiedades físicas las variaciones son estadísticamente significativas para sólidos solubles, azúcares reductores, pH y viscosidad.

Tabla 5. 8 Efecto del tiempo de incubación de zumo de mandarina formulado con *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 a 37° C sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas .

Tiempo de incubación (h)	0	12	24
Sólidos solubles (°Brix)	16.27±0.03c	16.03±0.05b	15.90±0.12a
Azúcares reductores (g/100 mL)	7.6±0.3c	7.35±0.08b	6.98±0.07a
FOS (g/100 mL)	3.9±0.2a	3.8±0.2a	3.76±0.07a
pH	6.02±0.06c	4.88±0.02b	4.41±0.02a
a_w	0.986±0.003b	0.985±0.003ab	0.984±0.003a
Densidad (g/cm³)	1.0719±0.0009a	1.073±0.002a	1.0706±0.0004a
Viscosidad aparente (cpoises)	3.45±0.04a	3.63±0.13c	3.55±0.04ab
log UFC/mL	6.869±0.008a	8.93±0.09b	8.91±0.03b

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05).

Como era de esperar, el pH del medio descendió con el crecimiento microbiano como consecuencia de la degradación de los azúcares y la formación de compuestos ácidos, tales como el ácido láctico. En las condiciones ensayadas, el máximo crecimiento microbiano fue de $7.8 \cdot 10^8$ UFC/mL (8.9 log UFC/mL)

después de 12 horas de incubación, coincidiendo con un descenso del pH desde 6.02 hasta 4.88. Estando este valor por debajo de lo que se considera óptimo para el crecimiento de *L. salivarius* spp. *salivarius* (5.5 – 6), por lo que siendo estas condiciones poco favorables suponen la detención del crecimiento del microorganismo a partir de 12 horas de incubación, por lo que a partir de este instante, tanto la concentración microbiana como el pH permanecieron prácticamente invariables. El máximo contenido de crecimiento microbiano obtenido es un valor superior al obtenido por Betoret et al. (2012) de 2.75×10^8 UFC/mL (8.4 log UFC/mL), esto se debe probablemente a la incorporación del componente proteico (levadura de cerveza).

El probiótico *L. salivarius* spp. *salivarius* al ser una bacteria ácido-láctica, durante su crecimiento fermenta los azúcares simples y produce ácido láctico. El análisis de los azúcares reductores a lo largo del proceso muestran un mayor descenso de sus valores (3 y 8% después de 12 y 24 horas de incubación respectivamente) con respecto al contenido de oligofructosa (2 y 3% después de 12 y 24 horas de incubación respectivamente) lo que parece indicar que son los azúcares reductores (glucosa y fructosa) la principal fuente de carbono y energía para el probiótico. Esta respuesta puede ser atribuida a que los carbohidratos de cadenas más largas son fermentados más lentamente (Cummings et al., 2001; Hernández-Hernandez et al., 2012). Vernazza et al. (2006) estudiaron la preferencia de cepas de *Bifidobacterium* por oligosacáridos comerciales incluyendo Orafti P95. Las velocidades de crecimiento con este oligosacárido estuvieron en el rango 0-0.085 1/h frente a glucosa con valores 0.112-0.193 1/h y un nulo desarrollo de la mayoría de cepas con inulina. Atribuyen este comportamiento a que el metabolismo de moléculas grandes requiere la presencia de glicosidasas y mecanismos de transporte específicos para los productos de hidrólisis. Similar comportamiento ha sido publicado por Zanoni et al. (2008) que estudiaron la utilización de oligosacáridos (incluyendo Orafti P95) y polisacáridos por *Lactobacillus plantarum*. Sus resultados reportan un mayor rendimiento en biomasa después de 10 horas de fermentación en medio conteniendo glucosa, muy bajo con oligofructosa (Orafti P95) y nulo crecimiento

con inulina. Es evidente que factores como composición monomérica, grado de polimerización y tipo de enlace glicosídico determinan la utilización de los diferentes tipos de prebióticos por parte de las cepas probióticas (Rastall et al., 2005).

Con el objetivo de incrementar la cantidad de biomasa producida por *L. plantarum*, Su et al. (2007) estudiaron una combinación de glucosa/prebiótico en el medio de cultivo, sus resultados sugieren que la glucosa puede ser usada en la primera etapa del crecimiento microbiano, antes que otras fuentes de carbono no convencionales, esto es respaldado por Goh et al. (2007) quienes publicaron que genes involucrados en la síntesis de β -fructosidasa fueron reprimidos en presencia de glucosa.

Existe la evidencia que el consumo de oligofructosa en la actualidad no alcanza los niveles recomendados y está limitado al aporte de alimentos de consumo como parte de una dieta normal como lo son por ejemplo: el ajo, la cebolla, las alcachofas entre otros. La finalidad de incorporar oligofructosa en la formulación del líquido de impregnación sería contribuir a completar la dosis saludable de prebiótico.

En el caso particular de España, el consumo se encuentra en un 1.1 g/día (Espinosa-Martos et al., 2006), que está por debajo de la media europea entre 3 y 11 g/día (Roberfroid, 2000) y de las dosis recomendadas por muchas referencias para garantizar su efecto beneficioso para la salud: 3 a 8 g por porción (Coussement, 1999), entre 2 y 10 g por persona y día (Tomomatsu, 1994; Roberfroid, 1998), hasta 15 g/día (Gibson, 1999; Rao (1999) o entre 4 y 12 g/día (Conway, 2001). Además de considerar la limitante por el efecto inhibitorio de las altas concentraciones en el crecimiento del microorganismo que se ha discutido anteriormente, la incorporación en el zumo formulado bajo el nivel de 5 % significa un aporte importante a la dosis saludable.

Por otro lado, la presencia de oligofructosa podría contribuir a enmascarar el cambio de sabor que algunas investigaciones mencionan como aspecto negativo al empleo de zumos de fruta como medios de fermentación. Colombo et al. (2015) atribuyen a la oligofructosa (P95 Orafiti), añadida en una concentración de 4g/100 mL, el aumento de la aceptación de zumo de manzana conteniendo probióticos *L. paracasei* ssp *paracasei*.

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

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

En el caso de jugos de cítricos, el color es una de los factores de calidad muy considerado por los consumidores. Los procesos tecnológicos modifican este parámetro en base a la estabilidad de los componentes responsables de esta percepción, por lo que el estudio de su evolución es de importancia. Respecto al color en zumos cítricos, la variación del tono desde el amarillo hasta el anaranjado en los zumos de naranja, depende del contenido en carotenoides (Meléndez-Martínez et al., 2011). Se ha reportado la estabilidad de estos compuestos a los tratamientos térmicos usados habitualmente en el procesado

de los alimentos, tales como el escaldado o la cocción (Borenstein y Bunnell, 1966). Otros autores señalan que su estabilidad puede variar mucho dependiendo del tipo de alimento (Purcell et al., 1969). Kidmose et al. (2001) añaden que durante el procesado y almacenaje, el color del jugo de naranja puede cambiar dependiendo de las condiciones que favorezcan diferentes tipos de reacciones de degradación. Dado que la degradación del color es un proceso complejo podría haber más de un mecanismo responsable de los cambios de color, por un lado la pérdida del deseable color de pigmentos carotenoides naturales y por otro el desarrollo de sustancias pigmentadas debido a reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Roig et al., 1999).

La estructura de los carotenoides, la longitud del cromóforo, el arreglo de los dobles enlaces conjugados en el anillo final y los isómeros geométricos (cis/trans), influyen en la percepción del color (Meléndez-Martínez et al., 2010). La mayoría de los carotenoides absorben entre 400 y 500 nm, que corresponde a la región azul-verde del espectro visible, por lo que los carotenoides exhiben coloraciones de amarillo a rojizas. Debido a la estructura altamente insaturada los carotenoides son propensos a varias reacciones de degradación, los cuales afectan no solamente su color sino también su actividad biológica. La presencia de oxígeno en combinación con la luz y el calor pueden conducir a degradación oxidativa formando un epóxido y radicales libres. Posteriores reacciones originan componentes de bajo peso molecular y en algunos casos componentes volátiles (Rodríguez-Amaya, 2001). Ambas reacciones de isomerización y oxidación conducen a un decrecimiento de la tonalidad amarilla y reacciones adicionales resultan en una decoloración de los carotenoides y una pérdida del color (Sant'Anna et al., 2013).

Meléndez-Martínez et al. (2011) afirman que el análisis espectrofotométrico (espectro UV/Vis) puede proporcionar suficiente información para concluir si estos componentes sufren algún cambio en su estructura durante el procesado. En la figura 5.3 se muestra el espectro de reflectancia del líquido de

impregnación en función del tiempo de incubación y en la tabla 5.9 se reportan los cambios en las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y las magnitudes tono y croma.

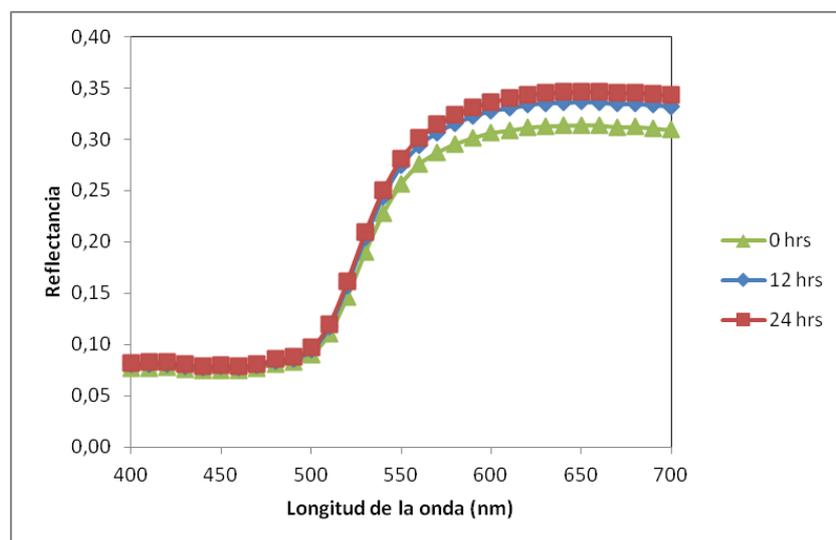


Figura 5. 3 Espectro de reflectancia de zumo de mandarina formulado e incubado con *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 a 37 °C durante 0, 12 y 24 horas.

En la figura 5.3 se observa que la forma de los tres espectros de reflectancia es muy parecida y que los mayores valores de reflectancia, así como las mayores diferencias con el tiempo de incubación, se alcanzaron entre 525 y 700 nm. El aumento de la reflectancia en este rango también fue observado después del tratamiento térmico de jugo de naranja (Melendez-Martínez et al., 2011). Este rango corresponde a la detección de las coloraciones de los compuestos carotenoides (580–595 nm: amarillo, 595–605nm: naranja, 605– 750nm: rojo), lo que indica cierto efecto de la incubación sobre estos compuestos. Los principales carotenoides responsables del color de zumos de naranja y mandarina son: α -caroteno y β -caroteno, zeta antheraxantina (amarillo), violaxantina (amarillo), β critraurine (rojo anaranjado) y β - criptoxantina (anaranjado). La mandarina en particular tiene un contenido alto de β -criptoxantina (7.25 mg/L) que es responsable del color naranja profundo de su zumo, con una menor contribución de β -caroteno (0.55 mg/L) (Farin et al., 1983; Pérez-López et al., 2006). En un estudio conducido por Kun et al. (2008) se reportaron descensos del orden de 10-25% y de 5-25% en el contenido en α y β caroteno, respectivamente, durante

la fermentación de zanahorias por cepas seleccionadas de bifidobacterias señalando que la degradación podría deberse, en parte al propio metabolismo de las bacterias, además de las condiciones de fermentación (temperatura, pH). Sin embargo, en otro estudio con el mismo jugo pero con *Lactobacillus* spp. no se observó modificación significativa en el contenido de β -caroteno indicando que estos componentes nutricionales no son metabolizados por estos microorganismos (Nazzaro et al., 2008).

Melendez-Martinez et al. (2004) señalan que algunos carotenoides no resisten valores de pH extremos (ácidos y básicos) pudiendo sufrir isomerización cis o trans de sus dobles enlaces durante el procesamiento y almacenaje contribuyendo al cambio de color. Los componentes con sus enlaces en forma trans presentan un color más oscuro, y en consecuencia más enlaces cis resultan en un gradual debilitamiento del color (Dhuique Mayer et al., 2007).

El efecto de la fermentación sobre compuestos carotenoides y por ende la repercusión sobre las variaciones del color, es dependiente del tipo de microorganismo y el tipo de carotenoides, unido al efecto combinado de otros factores como: luz, oxígeno y temperatura.

Por otro lado, en productos pasteurizados en los cuales las enzimas responsables de la degradación han sido inactivadas, reacciones de oscurecimiento no enzimático más que oscurecimiento enzimático son las responsables de cambios de composición y color. Se han sugerido diferentes mecanismos para oscurecimiento no enzimático en jugos de cítricos pasteurizados: i) degradación del ácido ascórbico, ii) degradación de azúcares catalizado por ácidos y reacciones de Maillard debido a azúcares reductores y aminoácidos. Sin embargo, debido a la complejidad de la degradación de color, lo más habitual es que haya más de un mecanismo involucrado (Wibowo et al., 2015).

La evaluación de las coordenadas L^* , a^* , b^* y de las magnitudes tono (h^*ab) y croma (C^*ab) del líquido de impregnación (tabla 5.9) muestra un aumento en las mismas con el tiempo de incubación. Estas tendencias concuerdan con lo reportado por Koh et al. (2010), quienes observaron un incremento significativo en L^* , a^* y b^* durante la fermentación de jugo de tomate con *Bifidobacterium* (*B. breve* y *B. longum*). Según Spotti et al. (2013) un incremento en los valores a^* y b^* indicaría el desarrollo de un color rojo-marrón, típico de reacciones de Maillard, que podrían haberse favorecido por la presencia de azúcares reductores y de grupos aminos aportados por la fuente de proteína. Por otro lado, con el tiempo de incubación, las muestras ganan en luminosidad y pureza de color. Al final del proceso de fermentación se obtuvo el mayor valor de la variación de color (ΔE) siendo este de 3.2. Empleando una clasificación de la variación de color reportada por Cserhalmi et al. (2006) en la que 0-0.5 (no notable), 0.5-1.5 (ligeramente notable), 1.5-3 (notable), 3-6 (bien visible) y >6.0 (grande) la variación de color estaría clasificada como bien visible. Un valor de $\Delta E=2.8$ ha sido propuesto como el umbral de detección de diferencias de color por parte de los consumidores de jugo de naranja (Fernández-Vásquez et al., 2013).

Tabla 5. 9 Efecto del tiempo de incubación de zumo de mandarina formulado con *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 a 37°C sobre las propiedades ópticas

Tiempo de incubación (h)	L^*	a^*	b^*	h^*ab	C^*ab	ΔE
0	54.3±0.2 ¹ a	10.31±0.04a	36.2±0.3a	74.1±0.5a	37.6±0.3a	-
12	56.09±0.08b	10.54±0.05b	37.9±0.2b	74.45±0.04b	39.3±0.2b	2.5±0.2a
24	56.6±0.2c	10.70±0.02c	38.4±0.2c	74.4±0.6b	39.8±0.2c	3.2±0.2b

¹Desviación estándar.

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

Desde que la calidad nutricional de los jugos de cítricos esta principalmente relacionado con su contenido de ácido ascórbico es importante estudiar su evolución. Por otro lado esta vitamina (L-ácido ascórbico) es un micronutriente sensible al calor y su degradación juega un rol importante en las reacciones de oscurecimiento no enzimático (Roig et al., 1999).

El ácido L-ascórbico es uno de los ácidos más importantes de las frutas y vegetales que participa en la prevención de enfermedades del corazón, inhibe la formación de nitrosaminas y protege contra el cáncer, pero al mismo tiempo es uno de los ácidos más lábiles por su fácil oxidación (Rock et al., 1996). Gardner et al. (2000) reportan que la vitamina C contribuye con el 65-100% de la actividad antioxidante de jugos de cítricos, mientras que Yoo et al. (2004) reportan una contribución de 90.4%. En jugos de mandarina de las especies *C. unshie* y *C. reticulata* Abeysinghe et al. (2007) reportan contribuciones entre el 40 y el 60%. Tal y como se muestra en la tabla 5.10, el contenido en ácido L-ascórbico en el líquido de impregnación recién formulado resultó similar al reportado por Meléndez-Martínez et al. (2007) en zumos procedentes de España, y aunque disminuyó ligeramente en un 4.5% tras 24 horas de incubación a 37 °C, se mantuvo en un nivel aceptable. El efecto de la incubación sobre el contenido en ácido L-ascórbico ha sido evaluado por otros investigadores en batidos de frutas (Di Cagno et al., 2011) y jugo de fresa (Klopotek et al., 2005), obteniéndose resultados similares.

En la tabla 5.10 se muestran los cambios en las propiedades antioxidantes del líquido de impregnación con el tiempo de incubación.

Tabla 5. 10 Efecto del tiempo de incubación de zumo de mandarina formulado con *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 a 37°C sobre las propiedades funcionales.

Tiempo de incubación (h)	0	12	24
Acido L-ascórbico(mg/L)	333±6 ¹ c	324±1ab	318±5a
FRAP (mM Fe 2⁺)	8.8±0.2a	8.7±0.6a	9.2±0.6a
DPPH (mg AA/L)	388±38a	484±11b	492±33b
ABTS (mM trolox)	11.9±0.2c	10.4±0.2b	9.2±0.2a
Fenoles (mg GAE/L)	548±18a	529±11a	530±11a
Hesperidina (mg/L)	542±7a	547±3a	548±5a
Narirutina (mg/L)	51.1±0.3a	51.4±0.2a	51.1±0.9a
Didimina (mg/L)	21.1±0.2a	21.4±0.7a	21.9±0.5a

¹ Desviación estándar.

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

Respecto a la actividad antioxidante y antiradical de las frutas cítricas, ésta se debe principalmente a la fracción hidrosoluble, que contiene fundamentalmente polifenoles y vitamina C. Pero también hay una contribución de la fracción apolar, rica en carotenoides (Byers y Perry, 1992; Gorinstein et al., 2001; Tripoli et al., 2007). La vitamina C es considerada uno de los más importantes nutrientes y el que más contribuye a la elevada capacidad antioxidante de estas frutas, como se mencionó anteriormente. Además, los zumos de mandarinas presentan cantidades importantes de flavanonas glicosiladas (principalmente hesperidina), consideradas responsables del 10% de su actividad antioxidante (Abeyasinghe et al., 2007).

Debido a la diferente naturaleza de los compuestos antioxidantes presentes en el zumo de mandarina y a sus diferentes capacidades de reacción con las

especies radicales empleadas, es recomendable evaluar la actividad antioxidante con más de un método (Sdiri et al., 2012). Como se observa en la tabla 5.10, la capacidad antioxidante analizada por el método FRAP y DPPH aumenta ligeramente con el tiempo de incubación, pero disminuye cuando se analiza por el método ABTS, lo que puede estar relacionado con la pérdida de los antioxidantes hidrófilos durante la incubación. Como reportan varios investigadores, entre ellos Polydera et al. (2005), la reacción entre el ácido L-ascórbico y el catión de ABTS es prácticamente instantánea, mientras que para los flavonoides es dependiente del tiempo de reacción. Se ha señalado que el método DPPH es sensible a flavanonas hidrofóbicas, mientras que el método ABTS lo es ante antiradicales hidrofílicos, tales como la vitamina C (Del Caro et al., 2004). Gil et al. (2000) indican que el si bien el método de DPPH es recomendado como un método fácil y exacto para medir la actividad antioxidante de zumos de frutas y vegetales, es menos sensible a los antioxidantes hidrófilos.

El aumento de la actividad antioxidante evidenciado por los métodos de FRAP y DPPH podría ser explicado desde dos puntos de vista: respondiendo a la interconversión de ciertos componentes como parte del metabolismo del probiótico a productos de mayor poder antioxidante (que será explicado con más detalle al discutirse el efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos) o a procesos químicos degradativos propiciados por la permanencia a temperatura de 37 °C. Del Caro et al. (2004) proponen una posible explicación para un marcado incremento en la actividad antioxidante observado en algunos jugos (jugo de pomelo): a) el más alto potencial antioxidante de polifenoles en estados de oxidación intermedia (Cheigh, Um y Lee, 1995) o b) la neoformación de ácidos hidroxicinámicos debido a la actividad de las enzimas PAL (fenilalanina-amino-liasa) C4H (cinamato-4-hidroxilasa). Sin embargo estos autores señalan que esto es temporal, a más avanzados estado de oxidación las moléculas pierden gradualmente esta propiedad, y hay una drástica reducción en la actividad antioxidante.

Durante la fermentación bacteriana de muchos alimentos, la acción de las bacterias en la matriz del alimento puede producir una amplia variedad de compuestos a partir de los constituyentes iniciales del alimento. En algunos casos, es la generación de estos compuestos bioactivos o probioactivos que dan al alimento fermentado sus beneficios para la salud. La mayoría de los microorganismos utilizan el medio que les rodea para producir una amplia variedad de metabolitos a medida que crecen y se reproducen. Estos metabolitos pueden tener diferentes finalidades como su contribución a la estructura de la pared de la célula, la protección frente a otras bacterias, y la supervivencia en ambientes desfavorables. Algunos de estos metabolitos se encuentran en el exterior de la pared celular, algunos son excretados en el medio circundante, mientras que otros sólo son liberados después de que la pared de la célula bacteriana se dañe. Algunos metabolitos bacterianos podrían ser bioactivos y tienen efectos beneficiosos sobre el huésped. Es evidente que los beneficios para la salud de los alimentos fermentados se puede atribuir a metabolitos derivados de la matriz del alimento inicial o que puede ser el resultado del metabolismo bacteriano durante la fermentación (Farnworth y Champagne, 2008).

En cuanto a la evolución del contenido de los compuestos fenólicos durante la incubación se observa cierta tendencia a un descenso ($\approx 3\%$) aunque no es estadísticamente significativo. Jaiswal y Abu-Ghannam (2013) reportan descensos de 15% y 24% después de 24 horas en la fermentación de jugo diluido de repollo por *L. plantarum*-*L. brevis* y *L. rhamnosus* respectivamente. Señalan que los *Lactobacillus* poseen enzimas como β -glucosidasas y p-acido coumárico decarboxilasas, los cuales pueden estar contribuyendo a la degradación de ciertos compuestos fenólicos. Es un hecho que la microflora intestinal, que incluye *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, puede metabolizar algunos compuestos polifenoles produciendo, entre otras transformaciones, hidrólisis de flavonoides glucosilados o ruptura del anillo C de las moléculas (Winter et al., 1989). Otros polifenoles pueden ser metabolizados produciendo catecol y otros fenoles más simples. La conversión de los antioxidantes por microorganismos puede afectar

la actividad biológica de éstos, dando lugar a la desactivación de compuestos bioactivos o la activación de compuestos inactivos con mayor capacidad antiradical. Bisakowski et al. (2007) evaluaron el perfil flavonoide en cebolla roja fermentada por *L.plantarum* y encontraron modificaciones en el perfil de glicósidos de quercetina. Después de la fermentación, la cantidad de quercetina diglicósida y monoglicósida se incrementó significativamente, lo cual fue señalado como una ventaja teniendo en cuenta que estos glicósidos tienen una reconocida actividad antioxidante.

La cierta diferencia entre las tendencias de polifenoles y capacidad antioxidante podría entenderse por el hecho de que la capacidad antioxidante de los alimentos depende de interacciones sinergistas y redox dentro de los diferentes componentes presentes en los vegetales. La reducción de un grupo de componentes puede conducir a la pérdida de funcionalidad contra cierto tipo de radicales libres sin cambiar su funcionalidad hacia otros radicales (Jaiswal y Abu-Ghannam, 2013).

Los resultados obtenidos tampoco muestran diferencias significativas en las concentraciones de hesperidina, narirutina y didimina con el tiempo de incubación. Los flavonoides más importante en zumo de mandarina de mayor a menor concentración son la hesperidina (0.81-45.8mg/100mL), narirutina (0.12-9.0 mg/100mL) y didimina (0.05-3.1 mg/100mL) (Gatusso et al., 2007). Numerosos estudios confirman una bioactividad potencial de la hesperidina, entre otros: su efecto en el sistema vascular (reduce la permeabilidad capilar), efecto antiinflamatorio, efecto antioxidante, acción sobre enzimas, actividad antimicrobiana, actividad anticarcinogénica, inhibición de agregación celular, efectos antialérgicos, actividad protectora frente a UV y radio protección (Kuntic et al., 2014; Nandakumar y Balasubramanian, 2012; Hou et al., 2012; Morand et al., 2011).

El potencial antioxidante de la hesperidina, la flavanona de más alta concentración en zumos de mandarina ha sido estudiado por Hussein y Othman

(2011) y comparado con antioxidantes naturales y sintéticos tales como α -tocoferol, ácido ascórbico, butil hidroxitolueno (BHT) y butil hidroxianisole (BHA) y trolox. La hesperidina exhibe un poder de reducción fuerte, actividad quelante de Fe^{2+} y captura de radicales libres, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. La actividad antioxidante total de hesperidina comparado con estos antioxidantes siguió este orden: hesperidina > α -tocoferol > trolox > BHA > BHT. La hesperidina en combinación con otro flavonoide llamado diosmina es empleada para el tratamiento de insuficiencia venosa crónica en Europa (Yang et al., 1997; Kuntic et al., 2014).

Parkar, Stevenson y Skinner (2008) reportan que otros flavonoides de la misma naturaleza; naringenin, rutin, floridzina y quercitina pueden tener efectos en la microbiota intestinal, pudiendo producir: a) un incremento del conteo de bacterias benéficas tales como *L. rhamnosus*, b) mejora de la adherencia de estas bacterias en la pared intestinal y c) inhibición de la proliferación de enteropatógeno como *S.aureus* o *Salmonella typhimurium*.

En un reciente estudio se evaluó el efecto de la hesperidina y su aglicón hesperitina en la estructura y actividad de la microbiota intestinal en ratas. Los resultados revelan que la hesperetina modifica la composición de la microbiota fecal y aumenta los niveles cecales de ácidos grasos de cadena corta indicando cierto efecto prebiótico de estas flavanonas (Unno et al., 2015)

Dhuique-Meyer et al. (2007) señalan el carácter estable de la hesperidina, reportando pérdida menor del 2% frente a tratamiento térmico a 90°C por 240 minutos, lo que es corroborado por otro estudio dirigido por Moura y Silos (2008) que mostraron que la pasteurización no modificó el contenido de flavanonas (hesperidina y narirutina). En otra investigación se han reportado pérdidas bajo condiciones muy drásticas de acidez (1N HCl/ 5 mL/60 min/80°C/neutralizado) alcalinidad (1N NaOH/5mL/60min/30 min/80°C/neutralizado), oxidación (0.5 mL/30% H₂O₂) y tratamiento térmico (105°C 25.3 horas) a niveles de 10, 15, 1 y 1% respectivamente (Mishra et al., 2013).

Las flavanonas tienen una actividad biológica más alta incluso en concentraciones más bajas y los glucósidos de flavanona más relevantes son hesperidina, narirutin, naringina y eriocitrina (Mouly et al., 1994).

5.2. Estudio de la reutilización del líquido de impregnación: efecto de los ciclos de impregnación sobre las propiedades funcionales

Una cuestión importante en la aplicación industrial a gran escala de los procesos que implican inmersión de alimentos en medios líquidos como es el caso de la deshidratación osmótica y particularmente de la impregnación a vacío es la gestión de la solución final del proceso (Zhao y Xie, 2004). Betoret et al. (2012) realizaron una caracterización del zumo de mandarina residual tras el proceso de impregnación de manzanas. En sus resultados la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO5), exceden los límites establecidos por la ley por lo que se considera necesario llevar a cabo una depuración del mismo antes de ser vertido al cauce público. Sugieren que antes de proceder a la depuración y eliminación del zumo resultante de la impregnación convendría plantearse la posibilidad de reutilización del mismo. La obtención de aceites esenciales, flavonoides u otros componentes fisiológicamente activos e incluso la reutilización como ingrediente en la fabricación de otros productos como: zumos, néctares o concentrados podrían ser algunas posibilidades. Algunas alternativas planteadas en soluciones azucaradas concentradas incluyen la reutilización como jarabe de mesa, rellenos de frutas, bases para bebidas, jarabes o en conservas. Algunos autores mencionan que desde el punto de vista de ingeniería, es posible la reutilización de la disolución en procesos de deshidratación osmótica al menos 20 ciclos (Rosa y Giroux, 2001; Valdez-Fragoso, Mujica Paz, Giroux, y Welti Chanes, 2002). Desafortunadamente, el reciclaje de las disoluciones residuales de estos procesos es todavía una de las principales deficiencias y desafíos (Zhao y Xie, 2004). Una razón es que algunas de las características de las disoluciones cambian al final del proceso debido a la lixiviación simultánea de analitos

responsables del color, los ácidos y los fragmentos del producto y solutos en las disoluciones que penetran en el producto.

En esta parte se evaluó el cambio de las propiedades físicas y funcionales del líquido de impregnación como consecuencia de su reutilización en 5 ciclos antes de su consideración como un residuo líquido del proceso o su destino a otras alternativas. En la tabla 5.11 se muestra la caracterización del líquido de impregnación en los 5 ciclos. Aunque estadísticamente existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en las propiedades físicas de: sólidos solubles, pH, densidad y viscosidad aparente, estas diferencias no merecen ninguna

Tabla 5. 11 Efecto de la reutilización del líquido de impregnación en las propiedades físico-químicas y microbiológicas.

Nº ciclos de impregnación	0	1	2	3	4	5
Sólidos solubles (°Brix)	17.95 ±0.07 ^{1c}	17.6 ±0.1b	17.6 ±0.1b	17.6 ±0.1b	17.4 ±0.1a	17.45 ±0.07a
pH	4.59 ±0.01b	4.57 ±0.01b	4.54 ±0.01a	4.56 ±0.02ab	4.55 ±0.01ab	4.51 ±0.01a
a_w	0,984 ±0.003a	0.984 ±0.003a	0.984 ±0.003a	0.984 ±0.003a	0.984 ±0.003a	0.985 ±0.003a
Densidad (g/cm³)	1.078 ±0.001b	1.081 ±0.002b	1.079 ±0.001b	1.074 ±0.002ab	1.073 ±0.001a	1.076 ±0.002ab
Viscosidad aparente (cpoises)	4.76 ±0.07b	4.15 ±0.06a	4.195 ±0.007a	4.22 ±0.04a	4.170 ±0.014a	4.24 ±0.03a
log (UFC/mL)	8.9 ±0.2a	8.84 ±0.02a	8.90 ±0.02a	8.92 ±0.07a	8.789 ±0.005a	8.94 ±0.05a

¹ Desviación estándar.

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

consideración en términos prácticos. En cuanto a los sólidos solubles hay un descenso de 17.95 a 17.45 °Brix, en pH de 4.59 a 4.51, la densidad de 1.08 a 1.075 y la viscosidad aparente de 4.76 a 4.24 entre el primer y quinto ciclo de

impregnación. La actividad de agua no se ve afectada por los ciclos de impregnación. También es importante señalar que al trabajar con una solución isotónica es de esperar que los cambios sean mínimos, al estar involucrado exclusivamente un proceso de transferencia de masa por mecanismo hidrodinámico, sin o con despreciable transferencia por difusión. En cuanto al contenido del probiótico, este se mantiene a un nivel sin diferencias significativas durante los 5 ciclos de impregnación

Tabla 5. 12 Efecto de la reutilización sobre las propiedades funcionales del líquido de impregnación.

Nº ciclos de impregnación	0	1	2	3	4	5
FRAP (mM Fe ²⁺)	9.92 ±0.01 ¹ c	9.5 ±0,4abc	9.67 ±0.03bc	9.9 ±0.5c	9.05 ±0.08ab	8.9 ±0.4a
DPPH (mg/L eq AA)	482 ±7a	497 ±3a	438 ±45a	458 ±22a	446 ±1a	469 ±46a
ABTS (mM trolox)	7.71 ±0.09b	7.31 ±0,07a	7.77 ±0.02b	7.28 ±0.12a	7.35 ±0.07a	7,2 ±0,2a
Acido Ascórbico (mg/L)	322 ±5)d	311 ±7cd	297 ±7bcd	287 ±10abc	279 ±10ab	266 ±12a
Fenoles (mg GAE/L)	502 ±2b	567 ±35c	464 ±2a	513 ±2b	488 ±3ab	478 ±3ab
Hesperidina (mg/L)	543 ±22b	NA	NA	NA	NA	523 ±3a
Narirutina (mg/L)	38 ±2a	NA	NA	NA	NA	40 ±6b
Didimina (mg/L)	11,8 ±0.5b	NA	NA	NA	NA	10.6 ±0.8a
FOS (g/100 mL)	3.7 ±0.2a	NA	NA	NA	NA	3.72 ±0.18a

¹ Desviación estándar. NA: no analizado.

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05).

La variación en otras propiedades funcionales se presenta en la tabla 5.12. En el caso concreto del ácido L-ascórbico, la pérdida resultó del orden del 17%, lo que se traduce en un descenso de la capacidad antioxidante medida por los métodos FRAP y ABTS. Nagy (1980) reporta que la degradación de la vitamina C puede producirse por una vía enzimática y no enzimática. Las enzimas presentes en los cítricos capaces de oxidar la vitamina C son la citocromo oxidasa, la ascórbico oxidasa y la peroxidasa, pero como en esta investigación se ha empleado zumo comercial pasteurizado, es de esperar que estas enzimas no se encuentren en el líquido de impregnación. La otra degradación sería la no enzimática, debida a las reacciones aeróbicas y anaeróbicas que podrían producirse durante las etapas previas y posteriores a la impregnación a vacío.

La disminución del contenido en ácido ascórbico puede ser explicado por la vía de la degradación aeróbica como señalan varios investigadores. En presencia de oxígeno, el ácido ascórbico es oxidado reversiblemente a ácido dihidroascórbico (DHA). El DHA es altamente inestable y puede posteriormente ser hidrolizado irreversiblemente a ácido 2,3 diketogulónico y otros productos de degradación, tales como 2 ácido fórico, 3-hidroxi-2-pyrone, degradación que se ve favorecida por condiciones de bajos pH (Shinoda et al., 2005; Yuan y Chen, 1998).

Por otro lado, durante el proceso de impregnación, concretamente en la primera etapa a presión de vacío, hay una eliminación del aire contenido en los espacios porosos de la matriz de manzana. La agitación que se genera en esta etapa permitiría un mayor contacto con el oxígeno contenido en el aire saliente favoreciendo los procesos oxidativos. No obstante los valores de estas propiedades funcionales siguen siendo adecuados para continuar utilizando el zumo de mandarina como líquido de impregnación hasta el ciclo 5 estudiado.

Por lo que respecta a la capacidad antioxidante medida por el método DPPH, al ser los compuestos bioactivos lipófilos más resistentes a las condiciones de

proceso (luz, O₂ y temperatura), permaneció invariable desde el principio hasta al final del experimento.

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

Tabla 5. 13 Efecto de la reutilización sobre las propiedades ópticas del líquido de impregnación inicial y tras los cinco ciclos de impregnación ensayados

	L*	a*	b*	h*ab	C*ab	ΔE
0	57.018 ±0.003a	13.416 ±0.006a	41.142 ±0.011a	71.939 ±0.011a	43.274 ±0.009a	-
1	57.22 ±0.01a	13.775 ±0.005a	41.49 ±0.013a	71.634 ±0.009a	43.71 ±0.012a	0.540 ±0.012a
2	57.405 ±0.002a	13.791 ±0.002a	41.68 ±0.01a	71.692 ±0.006a	43.903 ±0.009a	0.762 ±0.016b
3	57.391 ±0.008a	13.701 ±0.016a	41.733 ±0.011a	71.82 ±0.02a	43.924 ±0.013a	0.755 ±0.014b
4	57.29 ±0.03a	13.431 ±0.007a	41.61 ±0.02a	72.109 ±0.015a	43.721 ±0.019a	0.54 ±0.03a
5	57.452 ±0.005a	13.479 ±0.016a	41.87 ±0.02a	72.153 ±0.015a	43.98 ±0.03a	0.85 ±0.02c

Valor entre paréntesis: desviación estándar.

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

En cuanto al color, se puede observar en la tabla 5.13 que las impregnaciones sucesivas no lo afectan. Tanto la luminosidad como el tono y croma permanecen constantes y las diferencias de color (ΔE) toman valores inferiores a 1 y, por tanto, no apreciables por el ojo humano.

Al parecer el ácido ascórbico preserva los componentes carotenoides de la oxidación (Sánchez-Moreno et al., 2003) que son los componentes responsables del color.

5.3 Estudio de la estabilidad de las propiedades físico-químicas y contenido de probiótico del líquido de impregnación almacenado en refrigeración

Los resultados de la caracterización físico-química y el contenido de probiótico en el líquido de impregnación almacenado a 4°C durante 21 días se presentan en la tabla 5.14. En general no hay una variación significativa de los parámetros físicos de: pH y sólidos solubles. Los recuentos de células viables al final del almacenamiento fueron de 7.37 y 7.7 log UFC/mL, con descensos de 1.48 y 1.1 log UFC/mL para el tratamiento con y sin oligofructosa respectivamente.

Los niveles que reportan la bibliografía para conservar el carácter probiótico, difieren según las referencias. Algunos investigadores sugieren concentraciones superiores al 10^6 UFC/mL (Kurman y Rasic, 1991; Dave y Shah, 1997), otros recomiendan una concentración de al menos 10^7 y 10^8 UFC/ mL (Kailasapathy y Rybka, 1997; Lourens-Hattingh y Viljeon, 2001). Mientras otras referencias establecen concentraciones más altas de 10^9 UFC/mL (Prado et al., 2008). Siendo conservadores el recuento al final del periodo de almacenamiento garantiza el carácter probiótico del líquido de impregnación.

No obstante conservar su carácter probiótico, los descensos observados son mayores a los reportados por otras investigaciones en otros zumos de frutas. Nuakaekul et al. (2011) estudiaron la viabilidad de *Bifidobacterium longum* en zumos de fruta como: naranja, pomelo, piña y grosella roja con valores de pH iniciales entre 3.20-3.81, y bajo almacenamiento durante 6 semanas a 4°C, sus resultados indican descensos de 0.35, 0.49, 0.30 y 0.73 log UFC/mL respectivamente. En otro estudio se evaluaron los mismos zumos para *Lactobacillus plantarum* mostrando una mejor viabilidad de este género con

descensos de 0.07, 0.02, 0.31 y 0.28 log UFC/mL para zumos de naranja, pomelo, grosella negra y piña respectivamente (Nuakaekul y Charalampopoulos, 2011). Ambos estudios atribuyeron esta buena viabilidad al contenido de proteína y fibra dietética. En cuanto a la fibra dietética, se ha sugerido que puede proteger a las células probióticas durante el procesado y almacenamiento por un mecanismo que implica la inmovilización física de las células sobre la fibra (Saarela et al., 2006).

En otros estudios la pérdida de viabilidad de los probióticos es más pronunciado. Colombo et al. (2015) evaluaron la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* en jugo de manzana clarificado con pH 3.82 y suplementado con 2% oligofruktosa durante almacenamiento bajo refrigeración (4°C/28 días) en botellas PET y encontraron un descenso de 2.1 log UFC a los 21 días. En otro estudio después de 4 semanas de almacenamiento a 4 °C *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* supervivieron a las condiciones ácidas de jugo de noni fermentado a diferencia de *L.casei* que no exhibió viabilidad celular en ese tiempo (Wang et al., 2009).

Las diferentes investigaciones coinciden en atribuir como principales razones para la reducción del conteo probiótico: las condiciones ácidas, la continua exposición a oxígeno y el bajo nivel de compuestos nitrogenados del medio durante el almacenamiento (Pimentel et al., 2015; Sheehan et al., 2007; Talwalkar y Kailasapathy, 2004). Cuando las células están presentes en un entorno de pH bajo, el consumo de energía que se requiere para el mantenimiento del pH intracelular, se incrementa. Como resultado, otras funciones celulares cruciales están carentes de ATP, y las células no pueden sobrevivir (Corcoran et al., 2005; Shabala et al., 2006; Nualkaekul et al., 2011). Sheehan et al. (2007) señalan que valores de pH inferiores a 4.5 son perjudiciales para la estabilidad de las bacterias probióticas en almacenamiento. El pH del líquido de impregnación fue de 4.40, estando en el límite para la viabilidad del microorganismo.

Por otro lado, los probióticos están desprovistos de la cadena de transporte electrónico y/o la enzima catalasa por lo que la presencia de oxígeno puede causar la formación y acumulación de metabolitos tóxicos en la célula, lo cual puede conducir a muerte celular por daño oxidativo (Boza-Mendéz et al., 2012; Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

Asimismo, una conclusión de los resultados es que la presencia de oligofructosa no ejerce un efecto de protección durante el almacenamiento, que sí ha sido publicado por otras investigaciones. En un estudio conducido por Pimentel et al. (2015) demostraron que la suplementación de zumo de manzana clarificada con oligofructosa ayuda a la supervivencia del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, atribuyéndose este efecto al hecho de ser un sustrato disponible para el metabolismo, sirviendo como fuente de carbono para el mantenimiento de la célula y la prevención de daños causados por la acidez y además sugieren que pudiera cumplir la función de protección física de células bacterianas de daños causados por el ambiente (Nualkaekul, Deepika, & Charalampopoulos, 2012). La diferencia con los resultados de la presente investigación podría atribuirse al nivel de fortificación que es de 5%.

Por otro lado, cuando las bacterias encuentran condiciones desfavorables pueden activar los mecanismos de respuesta al estrés, que les permitan sobrevivir bajo estas condiciones. Esta respuesta puede ser detectada como un aumento de la producción de proteínas relacionadas con el estrés, que estarían implicadas en la reparación o la degradación de las proteínas dañadas (Ananta, 2004).

Tabla 5.14 Propiedades fisico-químicas y contenido del microorganismo probiótico del líquido de impregnación durante almacenamiento bajo refrigeración.

Tiempo de almacenamiento (días)	Contenido m.o (log UFC/mL)		pH		Sólidos solubles (°Brix)		Variación del color (ΔE)	
	c/f ¹	s/f	c/f	s/f	c/f	s/f	c/f	s/f
0	8.85 ±0.04	8.80 ±0.06	4.395 ±0.007	4.41708 ±0.0006	15.82 ±0.03	11.50 ±0.07	-	-
7	8.627 ±0.014	8.7280 ±0.0002	4.394 ±0.006	4.4345 ±0.0007	15.658 ±0.012	11.38 ±0.05	0.554	0.399
14	8.10 ±0.01	8.19 ±0.13	4.41 ±0.02	4.424 ±0.008	15.81 ±0.06	11.470 ±0.006	0.509	0.452
21	7.37 ±0.03	7.7 ±0.2	4.393 ±0.013	4.406 ±0.008	16 ±0.07	11.65 ±0.01	0.777	0.784

¹ C/F Zumo de mandarina con contenido de 5% de producto comercial fuente de oligofruktosa

Se ha mencionado que la presencia de diferentes nutrientes tales como las vitaminas en el jugo de frutas, puede también tener una influencia sobre la viabilidad. El ácido ascórbico también se ha asociado con la buena supervivencia de *L. acidophilus* en yogur. El efecto de eliminación de oxígeno por parte del ácido ascórbico es una de las posibles razones que pueden ayudar a mejorar la viabilidad del probiótico (Shah, 2000 y Zarate et al., 2005; Ranadheera et al., 2010)

Una importante pérdida de calidad de jugo de naranja durante la vida en anaquel es el color. Es el primer signo visible que puede influir negativamente en la aceptación del consumidor, y por lo tanto disminuir su valor comercial (Manso et

al., 2001). El cambio de color es un indicador de reacciones químicas y bioquímicas (van Boekel, 2008). Dependiendo de la extensión de las reacciones, pueden ocurrir cambios en el color como resultado de la formación de pigmentos marrones así como por la decoloración de los carotenoides que se encuentran de manera natural en este tipo de frutas.

La variación de color durante el almacenamiento es menor de 2 lo que significa que no es detectable por el ojo humano y dentro de la clasificación sugerida por Cserhalmi et al. (2006) ligeramente notable sin ser perceptible por el consumidor (<2.8). Como se señaló anteriormente, si bien es cierto que están involucrados varios mecanismos en el cambio de color, el más representativo es el atribuido al contenido y conformación de carotenoides. Estos componentes pueden sufrir procesos de isomerización geométrica (promovida por calor, luz y ácidos) y oxidación (estimulada por luz, calor, metal, enzimas y peróxidos, e inhibida por antioxidantes) que son las causas principales de degradación de carotenoides (Rodríguez-Amaya, 1997).

Wibowo et al. (2015) reportaron limitado descenso y casi ningún cambio en carotenoides en jugo de naranja almacenado a 20 y 28 °C durante 32 semanas. Un ligero decrecimiento del contenido total de carotenoides en jugo de naranja pasteurizado en refrigeración fue reportado por otras investigación (Choi et al., 2002; Cortés et al., 2006; Plaza et al., 2011; Vervoort et al., 2011). Klaui y Bauernfeind (1981) señalan que el limitado grado de degradación por oxidación de los carotenoides puede ser debido a la acción protectora del ácido ascórbico presente de manera natural. La estabilidad de β -caroteno y β -criptoxantina durante almacenamiento fue reportado por Plaza et al. (2011). La β -criptoxantina es el principal carotenoide en jugo de mandarina y sólo mostró un descenso de 5% después de 8 semanas a 20°C (Wibowo et al., 2015).

Con respecto a los sólidos solubles la variación es mínima con una ligera tendencia a aumentar. Nuakaekul et al. (2011) estudiaron la conveniencia de seis zumos de frutas comerciales incluida la naranja como medios de suspensión de

Bifidobacterium longum (10^8 UFC/mL), y su almacenamiento por 6 semanas a 4°C, en donde en casi en todos los casos, los niveles de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) aumentaron significativamente y atribuyendo el resultado a la hidrólisis de los polisacáridos presentes en los jugos por la acción de pectinasas (Mohammad, Andrés, y Klaus, 2010). Asimismo, los mismos autores señalan que el pH de los jugos no cambia de manera significativa debido a la alta capacidad de tamponamiento de los jugos. En la presente investigación tampoco se detecta cambio en el pH.

La casi nula variación del pH y los sólidos solubles del zumo después de 21 días de almacenamiento indican una débil actividad metabólica del probiótico.

5.4 Evaluación del grado de enriquecimiento en las muestras impregnadas. Aplicación del modelo hidrodinámico para la estimación y confirmación con análisis químico.

La actividad de agua del líquido de impregnación (0.984) y de la manzana fresca (0.986) son valores muy próximos, por lo tanto, las condiciones permiten el cálculo teórico de la cantidad de líquido incorporado y posteriormente el grado de enriquecimiento de las muestras de manzana con *L.salivarius* spp. *salivarius* y con los componentes funcionales utilizando la ecuación del mecanismo hidrodinámico propuesta por Fito (1994) y Fito y Pastor (1994) que se presenta a continuación:

$$x_{fi} = \frac{x_{ml} X \frac{\rho_{ml}}{\rho_{ff}} + x_{ff}}{1 + X \frac{\rho_{ml}}{\rho_{ff}}}$$

Donde: x_{fi} : concentración del componente funcional en la fruta impregnada (g/g); x_{ml} : concentración del componente funcional en el medio líquido (g/g); x_{ff} = concentración del componente funcional en fruta fresca (g/g); X = fracción

volumétrica de líquido incorporado (m^3/m^3); ρ_{ml} : densidad del medio líquido (g/cm^3); ρ_{ff} : densidad de la fruta fresca (g/cm^3).

Asumiendo las siguientes supuestos:

Supuesto 1: El sistema se encuentra en estado estacionario por lo que la masa total del sistema no varía con el tiempo. No hay modificación por reacciones químicas ni de deterioro de los componentes funcionales.

Supuesto 2: No existe generación del componente funcional en el sistema.

Supuesto 3: La concentración del componente funcional en el medio líquido y sus características físico químicas no se ven afectadas por la operación de IV.

Para la evaluación y el entendimiento del grado de incorporación de componentes funcionales del líquido de impregnación desarrollado por IV en la matriz de la manzana, primero se debe señalar los factores que lo determinan. Durante la IV, la fracción porosa de los tejidos es penetrada por líquidos externos en condiciones controladas gracias a la creación de gradientes de presión en el sistema. Los factores que son determinantes en este proceso de transferencia de masa están relacionados con: a) parámetros del proceso: nivel y duración del vacío, tiempo de permanencia en la fase a presión atmosférica, b) características de la matriz: forma y tamaño, respuesta mecánica de la muestra, porosidad y tamaño de los poros, así como c) características del líquido de impregnación: actividad de agua, presión osmótica, viscosidad (Zhao y Xie, 2004).

Respecto a la manzana, estudios en la morfología celular de su tejido han mostrado su elevada porosidad (espacios intercelulares) además de su alta heterogenicidad celular (anisotropía) por ejemplo desde el centro a la periferia del tejido parenquimático, la porosidad y los espacios intercelulares aumentan, del mismo modo que aumentan a través del crecimiento de la planta (Mendoza et al., 2010). Los largos espacios intercelulares varían de tamaño con niveles

hasta 2000 μm de longitud y 100-200 μm de diámetro (Reeve, 1953; Golding y Jobling, 2012).

Los factores mencionados influyen sobre el nivel de impregnación y explican los resultados obtenidos.

En la tabla 5.15 se pone de manifiesto que los componentes bioactivos del líquido de impregnación han sido incorporados con éxito en la matriz estructural de la manzana. Los datos obtenidos experimentalmente para el contenido en oligosacáridos, microorganismo probiótico y compuestos fenólicos coinciden con los calculados por balance hidrodinámico. Sin embargo, en el caso de las flavanonas y el ácido L-ascórbico se observan algunas diferencias, siendo los valores experimentales ligeramente inferiores a los calculados teóricamente.

La correspondencia entre los valores estimados por HDM y los obtenidos por análisis químicos está condicionada por el cumplimiento de la hipótesis 1 en la que se considera la estabilidad de los componentes funcionales bajo la IV. Algunos componentes pueden presentar reacciones de oxidación como es el caso de ácido L-ascórbico. El ácido ascórbico es particularmente sensible a las reacciones de oxidación, destruyéndose con gran facilidad durante el procesado de los alimentos en presencia de oxígeno.

En el caso de la hesperidina, las diferencias podrían explicarse a la naturaleza cristalina en que se presenta una fracción de esta flavanona. Gil-Izquierdo et al. (2001) señalan que las flavanonas de los cítricos, y particularmente la hesperidina, son bastantes insolubles en soluciones acuosas ácidas y forman cristales que precipitan, pudiendo además establecer interacciones que la retengan en la nube del zumo. En estas condiciones podrían quedar en el líquido de impregnación y no ser incorporadas a la manzana en el proceso de impregnación.

Tabla 5. 15 Valores teóricos y experimentales del contenido microbiano y de compuestos funcionales del líquido de impregnación y de las manzanas fresca e impregnada.

	Líquido de impregnación	Manzana fresca	Manzana impregnada	
			Valor experimental	Valor teórico
Log (UFC/g)	9.05±0.01 ¹	N.A	8.11±0.06	8.27
Acido L-ascórbico (mg/100 g)	25.24±1.01	2.37±0.03	5.54±0.24	6.16
Fenoles (mg GAE/100 g)	504±11	87.3±1.2	82.0±0.8	82.62
Hesperidina (mg/100 g)	51.16±1.4	N.A	6.56±0.09	9.13
Narirutina (mg/100 g)	4.8±0.2	N.A	0.92±0.01	0.85
Didimina (mg/100g)	2.01±0.09	N.A	0.290±0.003	0.36
FOS (g/100 g)	3.76±0.04	N.A	0.684±0.004	0.671

¹ Desviación estándar.

En la figura 5.4 se muestran los cromatogramas de la manzana fresca e impregnada. Se observan en la manzana impregnada los picos correspondientes a la hesperidina, la narirutina y la didimina, ausentes en la manzana fresca, lo que evidencia el enriquecimiento de la matriz en estas flavanonas.

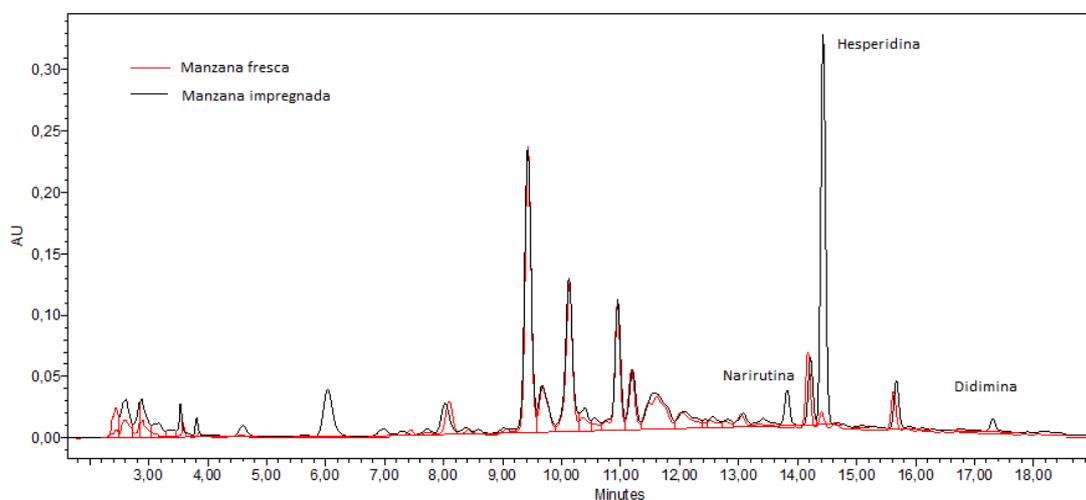


Figura 5. 4 Cromatograma HPLC a 280 nm de manzana fresca y manzana impregnada.

5.5 Estabilización del producto impregnado por secado por aire caliente. Efecto sobre el contenido de microorganismos probióticos. Selección de la temperatura

Si bien es cierto que la IV ha planteado la posibilidad de incorporar probióticos a la manzana en presentaciones finales del tipo cuarta gama ó mínimamente procesados, (Roble et al., 2010; Alegre et al., 2011), el alto contenido de agua, alta aw y componentes nutricionales del producto final, limitan su vida útil por reacciones de tipo oxidativas, microbianas y químicas que alteran su calidad. Por otro lado, aunque las frutas son usualmente consumidas como productos frescos, tienen carácter estacional, lo que unido a su perecibilidad hace necesario aplicar operaciones de estabilización como la deshidratación (Vega-Gálvez et al., 2012). El secado de alimentos, incluyendo frutas y vegetales, ha sido ampliamente empleado para eliminar agua y disminuir la actividad de agua reduciendo el riesgo de desarrollo microbiológico y la limitación de reacciones enzimáticas y químicas de degradación.

Los productos deshidratados están ganando considerable atención y su presencia en el mercado se ha incrementado considerablemente, no solo para satisfacer una demanda directa de productos de tipo aperitivo, sino para su incorporación en procesos de fabricación de productos de desayuno con cereales, panadería, postres y productos de confitería (Megías-Pérez et al., 2014).

Como consecuencia de la concentración, las frutas secas tienen más alta energía total, densidad de nutrientes, contenido de fibra y frecuentemente una mayor actividad antioxidante comparada con la fruta fresca. La elevada actividad antioxidante es principalmente debida a la concentración de polifenoles durante el secado y potencialmente a la generación de productos de la reacción de Maillard los cuales mejoran la actividad antioxidante (Yilmaz y Toledo, 2005). Sin embargo, también se ha encontrado que el secado puede conducir a pérdidas en los componentes polifenólicos. Como tal, la actividad antioxidante neta refleja efectos acumulativos de pérdidas y generación de productos de la reacción de Maillard (Vinson et al., 2005).

Aunque diferentes procesos de deshidratación son aplicados por industrias de procesamiento de alimentos, el secado convectivo es el más común debido a la simplicidad de operación y por ser una tecnología accesible. La liofilización ha sido considerada el mejor método de deshidratación para obtener productos finales de la más alta calidad teniendo en cuenta la mayor conservación de sus componentes nutricionales y funcionales (Asami et al., 2003; Marques et al., 2009). Sin embargo, la liofilización es un proceso discontinuo con un tiempo de secado considerablemente largo y también tiene un alto costo energético (Santivarangkna et al., 2007), lo que lo hace únicamente rentable para la deshidratación de productos de alto valor añadido (Ratti, 2001).

Para determinar la temperatura de secado se eligió como parámetro indicador el contenido de probiótico, al ser el componente funcional limitante y de mayor sensibilidad. En la figura 5.5 se presentan los resultados obtenidos. El análisis

estadístico mostró diferencias significativas entre los niveles de temperatura y tiempos de secado. Los descensos del contenido del microorganismo son del orden de 0.6, 0.8 y 2.7 ciclos logarítmicos para las temperaturas de 30, 40 y 45 °C, respectivamente, después de 24 horas de secado. La temperatura de 45 °C provocó un descenso considerable del recuento del probiótico por lo que se descartó.

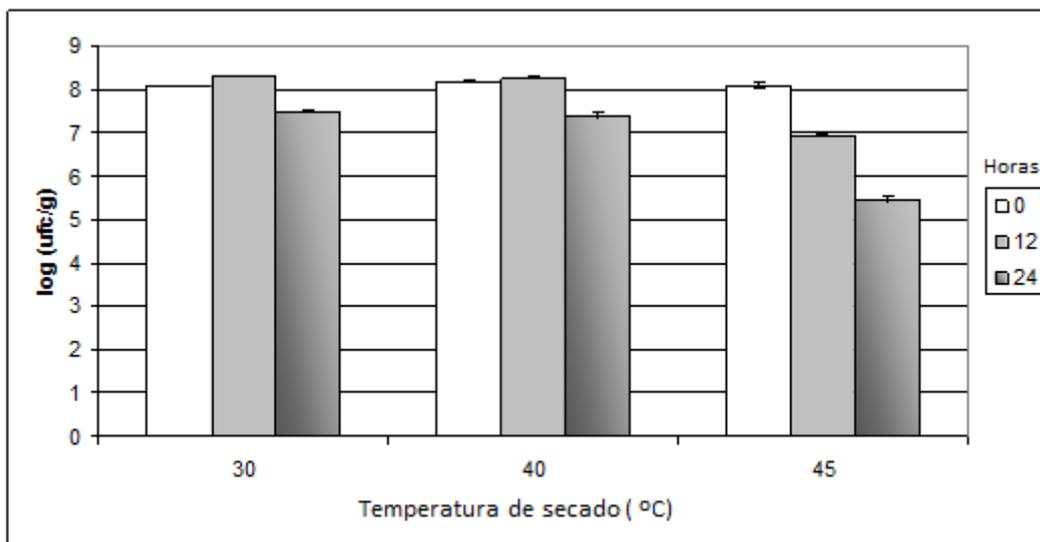


Figura 5. 5 Efecto del la temperatura y tiempo de secado sobre el contenido de probiótico *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063

A partir de los resultados obtenidos y para asegurar la mayor eliminación del agua para una conservación del producto en almacenamiento, sin que se produzca un descenso considerable del contenido microbiano se eligió la temperatura de 40°C. En las figuras 5.6 y 5.7 se presenta la evolución del contenido de materia seca, aw, contenido del microorganismo, porcentaje de supervivencia durante el proceso de secado a la temperatura seleccionada.

Noorbakhsh et al. (2013) estudiaron el efecto del tipo de secado en la producción de un aperitivo a partir de manzana impregnada con probióticos (*L. rhamnosus*) bajo IV y reportan niveles de reducción de la carga probiótica de 1.1, 1.7 y 2.1

log UFC/g para liofilización, secado por aire (40°C, 1.8 m/min/28 horas) y secado por aire combinado energía radiante bajo vacío, respectivamente.

Las condiciones de la deshidratación que son perjudiciales para la viabilidad del microorganismo incluyen: estrés por calor y aumento de temperatura, estrés osmótico y fuerzas de capilaridad debido a la salida de agua, estrés oxidativo por contacto con el oxígeno del aire y el incremento del pH intracelular y concentración de sales debido a la pérdida de agua (Santivarangkna et al., 2008; Selmer-Olsen et al., 1999).

El proceso de deshidratación consiste en eliminar una gran cantidad de agua intracelular, lo que altera la estructura celular microbiana y puede inducir la muerte celular. Las tensiones a las que se ven sometidos los microorganismos por procesos de secado pueden dividirse en dos categorías principales. Por un lado, la pérdida de agua causa estrés mecánico, principalmente localizado en la membrana celular que es el principal objetivo de lesión celular (Crowe et al., 1998; Simonin et al., 2007; Ragoonanan et al., 2008). Así mismo, un aumento en la relación superficie/volumen de la célula durante el secado puede conducir a la deformación de la membrana. Estudios con varios microorganismos han demostrado que la deshidratación–rehidratación rápida causa la permeabilización de la membrana que conduce a la muerte celular (Schwab et al., 2007; Dupont et al., 2010; Lemetais et al., 2012). Por otra parte, una actividad de agua reducida induce transición de fase de los constituyentes de la membrana de una fase cristalina líquida a una fase de gel (Milhaud, 2004), que puede conducir a la muerte celular (Potts, 2001; Laroche et al., 2001).

Asimismo, debido a que la desecación aumenta el contacto de las superficies de la célula con el aire y por lo tanto con moléculas de oxígeno, el secado también induce la formación y acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (França et al., 2007), causando daños como peroxidación y desesterificación de lípidos, desnaturalización de proteínas y daño a los ácidos nucleicos (García, 2011; Hansen, Go y Jones, 2006; Ferrando et al., 2015; Imlay, 2003; Dupont et

al., 2012). En un estado de la célula metabólicamente activo estas especies reactivas son atrapadas por los sistemas de defensa antioxidante, pero durante un almacenamiento prolongado en condiciones de sequedad la membrana celular es más susceptible a este ataque (França et al., 2007; Nag y Das, 2013).

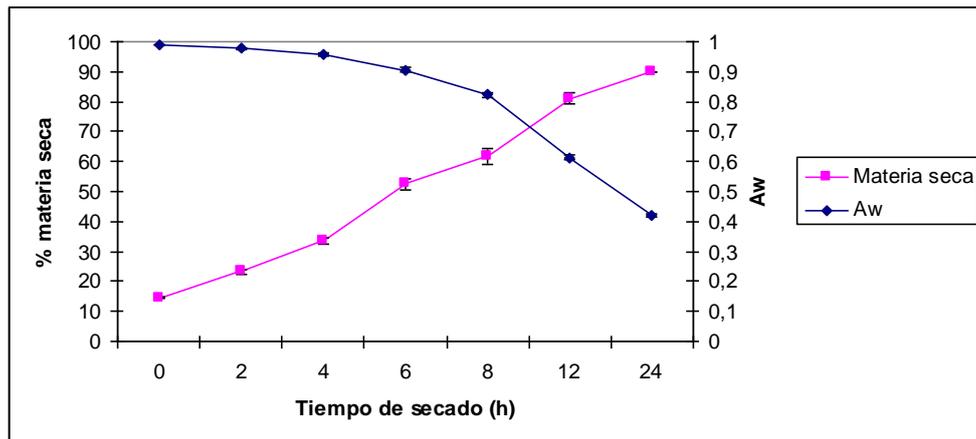


Figura 5. 6 Evolución del contenido de materia seca y aw durante el secado de rodajas de manzana impregnada con probiótico *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 a 40°C

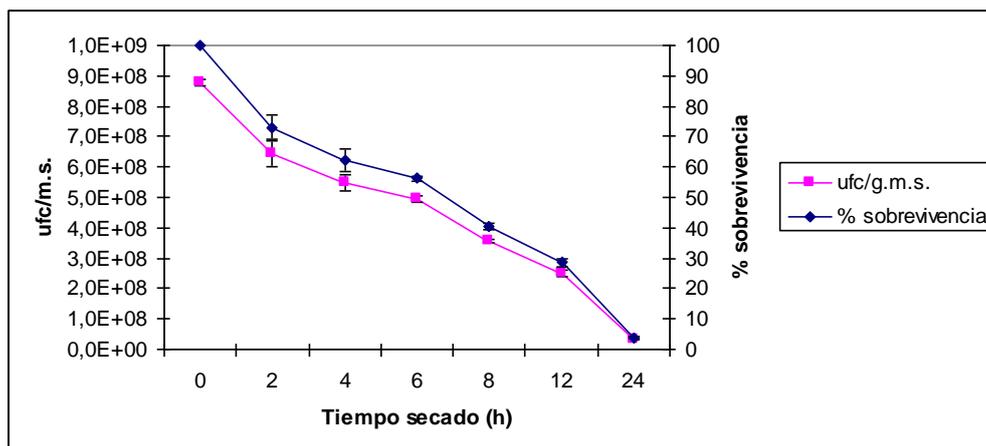


Figura 5. 7 Evolución del contenido y porcentaje de supervivencia durante el secado de rodajas de manzana impregnadas con probiótico *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 a 40°C

El agua ligada juega un rol importante en la estabilización estructural e integridad funcional de macromoléculas biológicas a través de diferentes tipos de enlaces débiles, incluyendo aquellos presentes en la pared celular y membrana celular. Consecuentemente, cuando el agua es eliminada durante la deshidratación puede producirse una desestabilización de la integridad estructural de estos componentes resultando en una disminución o pérdida de la función (Brennan et al., 1986). Ha sido propuesto que la fracción lipídica de la membrana celular es el primer objetivo del daño durante secado, donde puede ocurrir peroxidación lipídica (Brennan et al., 1986; Linders et al., 1997). Otro efecto sobre los fosfolípidos de la membrana es la fusión y transformación de los ácidos grasos de líquido cristalino a una fase gel, lo cual incrementa la permeabilidad celular (Crowe et al., 1987). Adicionalmente, las estructuras secundarias de ARN y ADN se desestabilizan resultando en una reducción de la eficacia de la replicación, transcripción y traslación del ADN (Van de Guchte et al., 2002; Meng et al., 2008) y como consecuencia pérdida o deterioro de sus funciones. También se ha postulado que el secado puede causar lesiones en la envoltura celular resultando en salida de algo de material intracelular esencial para la vida del microorganismo (Riveros et al., 2009).

Fu y Chen (2011) agrupan los factores que afectan la actividad celular en un proceso de secado convectivo en dos categorías: factores intrínsecos y factores extrínsecos. Los factores intrínsecos principalmente afectan la tolerancia de las células al estrés y son características implícitas de un organismo dado. La tolerancia al estrés es muy variable entre las especies, y puede ser en extensión mejorada controlando las condiciones del cultivo incluyendo la fase de crecimiento, composición del medio y tratamientos de pre-adaptación. Los factores extrínsecos influyen en la viabilidad celular principalmente e incluyen condiciones de secado y materiales de soporte durante el secado, finalmente señalan que ambos pueden ser optimizados para alcanzar la máxima supervivencia celular.

Aunque también algunos estudios han demostrado que frente a cambios repentinos en la temperatura o presión osmótica una célula microbiana es capaz de adaptarse ella misma regulando o ajustando el flujo metabólico y la expresión genética. No obstante, en algunos casos el tiempo de residencia del microorganismo en el ambiente de estrés es limitado y podría ser insuficiente para que las células implementen su respuestas activas (Fu y Chen, 2011).

Las consecuencias indicadas explicarían el descenso del recuento después de la deshidratación, la magnitud del efecto estaría relacionado al nivel de temperatura y tiempo de exposición.

5.6 Estudio del efecto de la impregnación a vacío y secado por aire caliente sobre las propiedades ópticas, mecánicas y funcionales del aperitivo de manzana

En la tabla 5.16 se presenta la evolución del contenido de humedad, actividad de agua y concentración de probiótico durante las etapas de impregnación y secado en el proceso de obtención del aperitivo de manzana.

Tabla 5. 16 Contenido de humedad, actividad del agua (aw) y contenido de probiótico en el líquido de impregnación y en las muestras de manzana fresca, impregnada (IV) y seca (SAC) var. Granny Smith.

Muestra	Humedad	aw	Contenido microbiano (UFC/g o mL)
L.IMPREGNACIÓN	-	0.985±0.003	1.12±0.03 x10 ⁹ a
FRESCA	0.852±0.002 ¹ a	0.986±0.003a	-
IV	0.844±0.002a	0.989±0.003a	1.30±0.06 x 10 ⁸ b
SAC	0.118±0.001b	0.449±0.003b	1.50±0.03 x 10 ⁷ c

¹Desviación estándar. Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0,05)

Los valores de a_w y humedad obtenidos para las muestras de manzana fresca concuerdan con niveles reportados en algunos estudios previos para la misma variedad de fruta (Monzón, 2006; Castelló, 2007). Asimismo, tal como se comentó en el apartado 5.4, hay una buena incorporación del microorganismo probiótico en la matriz, llegando a niveles para su consideración en esta categoría.

El objetivo principal del secado es la eliminación de agua a un nivel en el cual el crecimiento microbiano y las reacciones químicas y enzimáticas sean mínimas. Es un proceso que involucra calor y transferencia de masa simultáneamente, y en el cual el agua es transformada en vapor y luego removida, haciendo al producto apropiado para un almacenamiento seguro y extendiendo su vida útil. Sin embargo, el proceso de secado puede causar cambios físicos, estructurales, químicos y biológicos que pueden afectar atributos de calidad como: textura, color, sabor y valor nutricional debido a la pérdida de nutrientes y fitoquímicos que son relativamente inestables al calor (Nicoli et al., 1999; Katerine, 2004; Kwok et al., 2004; Chang et al., 2006; Vega-Gálvez et al., 2012; Mejía-Meza et al., 2010). Niveles de humedad inferiores al 5% y una actividad de agua inferior a 0.3 son usados como parámetros de referencia para la comercialización de alimentos secos (Bolin, 1980; Lavelli y Vantaggi, 2009).

Por otro lado, por los valores obtenidos de actividad del agua y humedad de la manzana impregnada y seca (SAC) se puede predecir su estabilidad microbiológica. Rahman (2010) refiere que una actividad del agua de 0.6 es un margen seguro para limitar el crecimiento microbiano, señala que ninguna bacteria patógena puede crecer con una actividad del agua por debajo de 0.85 y en el caso de mohos y levaduras, no se detecta crecimiento por debajo de una actividad del agua de 0.6, por lo que el valor que presenta el aperitivo puede considerarse seguro. No ha sido reportado crecimiento microbiano en frutas y vegetales deshidratados a valores de a_w más bajos que 0.62 (Sagar y Kumar, 2010). Labuza (1980) añade que teniendo una actividad de agua inferior a 0.6 los productos como cereales y aperitivos son estables contra el crecimiento

microbiano, pero las reacciones químicas y enzimáticas pueden seguir presentándose resultando en reacciones de deterioro. Otras reacciones como el oscurecimiento no enzimático se evita a a_w bajo 0.3 (Corzo-Martínez et al., 2012).

Existe evidencia que la incorporación de probióticos a una matriz como la manzana tendría un efecto adicional de protección mejorando la viabilidad del mismo. En un estudio, piezas de manzana y pera han demostrado ser un material apropiado para la inmovilización de *L. casei*. Las bacterias probióticas anidadas en la estructura celulósica de estas frutas fueron más resistentes a las etapas de elaboración de queso y en el proceso de maduración. Kourkoutas et al. (2006) señalan como un posible efecto protector la nula digestibilidad de la celulosa durante el tránsito a través del tracto intestinal, lo cual permitiría que el probiótico *L. casei* alcance el colon. También se ha publicado que la impregnación de *L. rhamnosus* en la matriz de la manzana proporciona una protección bajo condiciones ácida típico del tracto tractogastrointestinal (Noorbakhsh et al., 2013).

En otro estudio, piezas de manzana también demostraron ser adecuadas para inmovilizar levadura *Saccharomyces cerevisiae*, manteniendo su viabilidad por más de 3 meses bajo almacenamiento congelado sin decrecimiento de su actividad (Kourkoutas et al., 2006). Respecto al efecto del secado sobre el contenido de probióticos y la explicación del descenso después de la operación ha sido explicado en el apartado anterior.

En las tabla 5.17 se presentan las propiedades ópticas con los valores medios de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* , las magnitudes tono (h^*ab) y croma (C^*ab) para las muestras frescas, impregnadas (IV) y secas (SAC), así como las diferencias de color (ΔE).

Las coordenadas de color L^* , a^* , b^* para las muestras de manzana fresca son muy similares a los reportados en el estudio de Vega-Gálvez et al. (2012). La

impregnación a vacío afecta directamente los valores de luminosidad (L^*), que descienden debido al intercambio parcial de gas por la solución de impregnación, lo cual induce valores de índice de refracción más homogéneos en el tejido, asociados con una mayor translucidez (Contreras et al., 2008). Por otra parte, no se estableció una diferencia significativa para la coordenada a^* entre las

Tabla 5. 17 Valores medios de las coordenadas de color L^* , a^* , b^* y de las magnitudes tono (h^*ab) y croma (C^*ab), de manzana fresca, manzana impregnada (IV) y manzana seca (SAC) var. Granny Smith. Diferencias de color (ΔE) respecto a la muestra obtenida en la etapa anterior.

Muestra	L^*	a^*	b^*	h^*ab	C^*ab	ΔE
FRESCA	75 \pm 2 ¹ a	0.7 \pm 0.8a	22 \pm 2a	88 \pm 2a	22 \pm 2a	-
IV	58 \pm 7b	-0.1 \pm 0.3a	26 \pm 2b	142 \pm 87b	26 \pm 2b	18 \pm 6a
SAC	60 \pm 3b	7.5 \pm 0.4b	37.9 \pm 1.4c	78.9 \pm 0.7a	38.8 \pm 1.3c	17 \pm 4a

¹Desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$)

muestras frescas e IV, lo cual indica que se mantiene el color verdoso característico de la pulpa de manzana de esta variedad. No obstante, la coordenada cromática b^* presenta un ligero aumento que indica una evolución hacia el color amarillo, debido a la incorporación del zumo de mandarina como líquido de impregnación, por su alto contenido en carotenoides, componentes que proveen el característico color a la fruta (Navarro et al., 2010).

Las muestras de manzana SAC no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la manzana impregnada en el valor de luminosidad (L^*). Por el contrario, la coordenada cromática a^* aumentó considerablemente, evidenciando coloraciones rojizas, que pueden estar relacionados con procesos de pardeamiento no enzimático favorecido por la temperatura de secado. Del mismo modo se observa un aumento del valor de b^* tendencia reportada por Vega-Gálvez et al. (2012) quienes estudiaron el secado de rodajas de manzanas

con aire caliente a 40, 60 y 80 °C, lo que indica una transición hacia una coloración más amarilla. Probablemente estos cambios se deben al efecto combinado de la concentración de los compuestos carotenoides presentes y/o incorporados en la impregnación y/o cambios causados por la isomerización de sus moléculas sometidas a temperaturas de 40 °C (Dhuique-Mayer et al., 2007; Pereira et al., 2011).

Krokida et al. (2001) evaluaron el efecto del tipo de secado (secado convencional, al vacío, microonda, liofilización y deshidratado osmótico-secado convencional) sobre las características de color L^* a^* b^* encontrándose las mayores variaciones en el secado convencional. La tendencia durante el secado del parámetro L no fue muy clara, observándose una ligera tendencia a decrecer. En la muestra osmodeshidratada se observó cierta estabilidad durante todo el tiempo de secado. Al parecer la infusión de azúcar en la fruta causa una relativa estabilidad de L especialmente en comparación con los parámetros a^* y b^* . Estos parámetros a y b presentan valores mayores al transcurrir el secado lo que denota reacciones de oscurecimiento.

Por otra parte, se evidenció una disminución en el valor de tono (h^*ab) con respecto a las muestras frescas e impregnadas, valor que se acerca a tonalidades naranjas, resultado relacionado con los procesos de secado y pardeamiento. Los valores de croma (C^*ab) aumentan debido a una ganancia en la saturación del color por los tratamientos aplicados, ya que el color inicial de la muestra es poco saturado (pálido).

Finalmente, se evaluó la diferencia de color (ΔE) entre las muestras frescas e IV, estableciéndose un elevado valor que se justifica por el efecto de la impregnación a vacío sobre la luminosidad y sobre el tono. Con respecto a las muestras de manzana secas (SAC) la diferencia de color no es significativa, aunque continua siendo perceptible visualmente producto de la incorporación de componentes de color por el líquido de impregnación, la eliminación de agua y reacciones químicas (Lee et al., 2003).

Los cambios de color que acontecen en productos procesados dependen del cambios de los componentes que contienen, y en particular de los polifenoles. Durante el secado de frutas y vegetales, los polifenoles están sujetos a oxidación bajo la acción de la polifenoloxidasas. Estos cambios resultan en el oscurecimiento del tejido. Asimismo, con un incremento de la temperatura y bajo un contenido de agua se producen reacciones entre azúcares reductores y grupos aminos resultando en reacciones de oscurecimiento no enzimático contribuyendo con la variación de color (Nowacka et al., 2012; Vega-Gávez et al., 2012; Wiktor et al., 2013; Zhang y Lu, 2011; Zielińska y Markowski, 2012). La decoloración y el oscurecimiento no enzimático debido al tratamiento térmico pueden ser el resultado de varias reacciones, incluyendo Maillard, caramelización y destrucción de pigmentos (Ibarz et al., 2000). Al no haberse considerado una inactivación enzimática en la manzana empleada para la impregnación es probable que se pueda haber presentado alguna reacción de tipo oscurecimiento enzimático. No obstante, estas reacciones habrían estado limitadas por el efecto protector del ácido ascórbico presente en el zumo de mandarina e incorporado a la manzana por IV.

La manzana es muy propensa al oscurecimiento enzimático debido a su alto contenido de polifenoles y polifenoloxidasas (PPO) (McEvily e Iyengar, 1992; Nicolas et al., 1991; Rocha y De Moraes, 2002; Song et al., 2007; Yoruk y Marshall, 2006). Dentro de los compuestos fenólicos localizados en la pulpa únicamente un pequeño grupo sirve como sustrato directo para la PPO de la manzana: ácido clorogénico y catequina.

Aunque algunos autores han reportado una inactivación directa de la PPO por ácido ascórbico y sus derivados (Golan-Goldhirsh y Whitaker, 1984; Hsu et al., 1998). El principal rol de este componente reductor en el control del oscurecimiento es reducir radicales fenoxilos y formas quinonas de fenólicos para retornar a los fenólicos precursores, en una reacción acoplada de oxidación-reducción (Nicolas et al., 1994; Rojas-Graü et al., 2006). El ácido ascórbico es

el producto químico más frecuentemente utilizado para el control del oscurecimiento de productos de frutas pero su eficiencia es altamente dependiente de su concentración (El-Shimi, 1993; Rocha y De Morais, 2005; Sapers et al., 1989; Sapers y Miller, 1995). El efecto es únicamente temporal, debido a que éste se oxida irreversiblemente a ácido dihidroascórbico (Mills et al., 2007).

En la figura 5.8 se muestran las curvas típicas obtenidas para cada una de las muestras en los ensayos de determinación de las propiedades mecánicas.

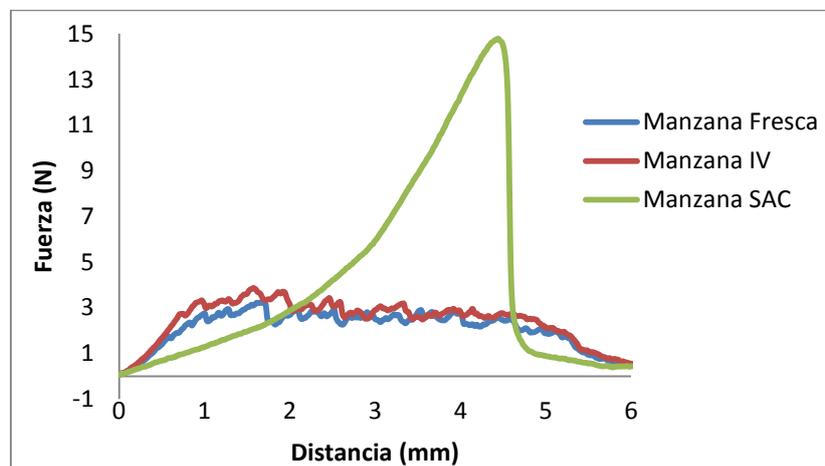


Figura 5. 8 Curvas fuerza-deformación obtenidas en el ensayo de punción de muestras de manzana fresca, impregnada (IV) y seca (SAC).

Como se puede observar las curvas correspondientes a las muestras de manzana fresca e impregnada (IV) presentan una serie de picos que indican múltiples fracturas tras alcanzar la fuerza máxima, comportamiento típico de tejidos vegetales frescos y porosos constituidos por células turgentes y fuertemente unidas, con grandes espacios intercelulares (Contreras et al., 2008). Por el contrario, la curva correspondiente a la muestra de manzana seca (SAC) presenta una mayor deformabilidad antes de la fractura y un único pico de fuerza seguido por una abrupta caída de la fuerza típico de un comportamiento viscoelástico (Contreras et al., 2011). El pico de fuerza máxima se relaciona con

la resistencia del producto a la fractura (Prothon et al., 2001) y la posterior deformación pronunciada está asociada a que la muestra alcanza un estado gomoso tras el secado.

Han sido reportado valores de aw para manzana deshidratada que aseguran características de textura comparables a otros productos aperitivos crujientes. Konopacka et al. (2002) reportó aw de 0.18 para hojuelas de manzana no fritas que corresponde a un contenido de agua de 3.5 g agua/100g de sólidos. Los valores alcanzados en el aperitivo desarrollado sobrepasan estos valores lo que indicaría que el aperitivo no es comparable con productos crujientes.

En la tabla 5.18 se presenta el contenido en componentes funcionales incorporados en el proceso de impregnación a vacío y obtenidos tras el proceso de secado por aire caliente.

Tabla 5. 18 Contenido de los compuestos funcionales: ácido L-ascórbico, oligofruktosa, hesperidina, fenoles y actividad antioxidante en manzana fresca, manzana impregnada (IV) y manzana seca (SAC) var. Granny Smith.

Muestra	Ácido L-ascórbico (mg /100g)	Oligofruktosa (g/100 g)	Hesperidina (mg /100 g)	Compuestos Fenólicos mg GAE1/100g ²	Actividad Antioxidante DPPH ³
L.IMPREG	25.24±1.01 ¹	3.76±0.04	50.6±1.4	504.26±10.9	481.63±6.82
M. FRESCA	2.45±0.03a	-	-	87.3±1.2 a	114.2±1.6 a
M. IV	5.54±0.24b	0.684±0.004 a	6.22±0.091a	82.03±0.79 a	114.7±0.6 a
M. SAC	13.84±1.21c	4.16 ±0.25 b	36.31±0.11 b	509±64 b	755.3±100.7 b

¹ Desviación estándar. Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0,05), ²Acido gálico equivalente (GAE), ³ Método del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), expresados como mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de producto seco.

Con respecto al contenido de ácido ascórbico, la manzana no es reconocida como una fruta que aporte un alto contenido de esta vitamina. Planchon et al. (2004) señalan que la variabilidad de los niveles de ácido ascórbico entre manzanas de una misma variedad puede ser muy alta, en un intervalo de 2 a 30 mg de ácido ascórbico por 100 g, rango dentro del cual se encontró el contenido de ácido ascórbico en la muestra de manzana fresca. Vrhousek et al. (2004) reportaron para la variedad Granny Smith un contenido de 2.7 mg/100 g cercano al valor obtenido. El proceso de impregnación a vacío ha incrementado el contenido de este compuesto en la manzana fresca en 2.5 (± 0.16) veces. A partir del contenido de ácido L.-ascórbico de las muestras de manzana impregnadas (IV) es posible calcular el contenido esperado en las muestras secas (asumiendo ninguna degradación), y estimar sobre la base del contenido determinado analíticamente en las muestras secas la pérdida debido al secado que en este caso se encuentra en 55.81%. Sokhansanj y Jayas (1995) indican que las pérdidas de ácido ascórbico durante el secado se encuentran en el rango de 10%- 50%, y que la constante de la tasa de deterioro aumenta con el aumento de temperatura. El efecto del secado sobre la vitamina C en otros alimentos ha sido reportado. En estudios de secado de papaya y kiwi a 40°C el contenido decreció un 30% después de 2.5 horas, mientras que a 50°C se registraron pérdidas hasta del 90% (Vial et al., 1991). Wojdylo et al. (2009) en un estudio de secado de fresa a 70°C por 550 minutos reportaron pérdida de vitamina C del 72% y resultados similares fueron obtenidos por Frías et al. (2010) en frambruesas osmóticamente pretratadas y secadas por microondas reportando pérdidas del 80%.

La concentración de vitamina C al final del secado también depende del tipo de secado. Joshi et al. (2011) estudiaron el efecto de diferentes métodos de secado sobre el contenido de vitamina C en manzana seca por aire (47°C/0.7 m/s 7 h), en estufa (70°C/10h), secado al vacío (20°C/24 horas) y secado al vacío (50°C/24 h) encontrando niveles de pérdida de 50.6, 30.5, 1.4 y 52.7 % respectivamente. La oxidación del ácido ascórbico bajo condiciones de alta temperatura y el descenso del ácido ascórbico debido a su utilización para la

protección de la oxidación de los polifenoles son las principales causas de la disminución de la concentración de vitamina C (Nicolas et al.,1994; Toor y Savage, 2006).

Por otra parte, no se observan diferencias entre la actividad antioxidante de la manzana fresca y la manzana impregnada (IV) debido a que la concentración de compuestos fenólicos y antioxidantes es similar, tanto en el líquido de impregnación, como en la manzana fresca. Es lógico pensar que aunque en valor absoluto no significa un enriquecimiento significativo, sí que habrá una modificación del perfil de los compuestos que aportan estas propiedades funcionales, compuestos como carotenoides, flavanonas y flavanoides que provienen del líquido de impregnación y que no se encuentra de manera natural en la manzana, además del oligosacárido que se han incorporado a la misma.

El efecto del secado sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante se manifiesta en un aumento al compararse sus valores en base seca. Esta tendencia ha sido reportada por algunas investigaciones. Sacchetti et al. (2008) encontraron un aumento de la actividad antioxidante en siete cultivares de manzana secados por aire caliente en un proceso en dos etapas: a 100°C/1 hora seguido a 85°C a velocidad 1.75 m/s hasta una de humedad de 7%. En un estudio de secado de orujo de uva roja a 60°C por 9 horas no se encontró efecto en el contenido de fenólicos y capacidad antioxidante comparado con un secado a 100 y 140°C por 5 y 4 horas respectivamente (Larrauri et al., 1997). Los cambios que ocurren en los compuestos fenólicos durante el proceso de secado podría incrementar el contenido de compuestos fenólicos libres, los cuales podrían actuar a su vez como antioxidantes (Fu, 2004; Manzocco et al., 2000). Aun después de la exposición a alta temperatura o condiciones atmosféricas, durante el secado las rodajas de manzana secas pueden tener similar contenido de fenólicos totales y capacidad antioxidante comparada con la manzana fresca (Rupasinghe y Joshi, 2013).

Joshi et al. (2010) estudiaron el impacto de diferentes métodos de secado (secado al vacío, secado por aire caliente, secado en estufa) en los componentes fenólicos de la manzana, concluyendo que los componentes responden de manera diferente. Sus resultados reportan la retención de phloridzina y quercitina 3-o-ramnosido bajo todos los métodos de secado estudiados, mientras que las concentraciones de catequina y equicatequina son reducidas bajo secado en estufa. El ácido clorogénico también se reduce en el tratamiento. El efecto variado de los diferentes métodos de secado sobre estos compuestos puede ser debido a sus propiedades de termoestabilidad y susceptibilidad a las condiciones de secado. La floretina es más estable bajo condiciones de altas temperaturas (secado en aire y en estufa) que el ácido clorogénico, la catequina, y la epicatequina. También se han reportado fenómenos de termohidrólisis de glucósidos de compuestos fenólicos como la floretina libre proveniente glicósidos de floretina (Rupasinghe et al., 2008).

La susceptibilidad de los compuestos fenólicos a la temperatura así como a otros factores de deterioro, depende del tipo y concentración de los compuestos individuales así como de su naturaleza química. Por ejemplo, la degradación de algunos compuestos fenólicos en cáscara de uva roja durante el secado ocurre a temperaturas más altas que 50°C. En particular el secado por aire a temperaturas más altas de 60°C es considerado como desfavorable debido a la posibilidad de inducir condensación oxidativa o descomposición de compuestos termolábiles tales como (+)-catequina (Asami et al., 2003).

Rózek et al. (2010) estudiaron la osmodeshidratación y posterior secado por aire caliente de manzana, plátano, papa y un alimento modelo (gel de agar-agar) con una solución osmótica enriquecida con extracto de semilla de uva. El efecto del secado a 55°C 4 m/s, y hasta peso constante sobre los compuestos fenólicos en estas matrices fue diferente, se encontró una reducción de 3.7 y 3,7% para manzana y plátano respectivamente, mientras que en el caso del modelo y la papa hubo un incremento del 30% y del 6.8% respectivamente. Respecto a la capacidad antioxidante total, en todos los tratamientos hubo un incremento

después del secado exceptuando en la solución modelo que se redujo en un 14.4%. Investigaciones en secado de orujo y piel de manzana muestra que el proceso de secado incrementa la cantidad de fenoles totales en el producto final (Wolfe y Rui, 2003).

Rózek et al., (2010) sugirieron un efecto protector de la sacarosa en los componentes fenólicos transferidos después de la osmodeshidratación, aunque señala que debiera estudiarse más para dar una explicación científica, añade que esta evidencia también se ha encontrado después de una osmodeshidratación y durante almacenaje en congelación de frutas como el kiwi y la fresa donde se incrementó la retención de clorofila y vitamina C en Kiwi (Torreggiani et al., 1995) y de los pigmentos de fresa (Torreggiani, 1995).

Los cambios en las propiedades antioxidantes de los alimentos durante el procesado pueden ser atribuidos a la suma de diferentes y algunas veces opuestos fenómenos, tales como la pérdida de antioxidantes de origen natural y la formación de nuevos compuestos teniendo actividad antioxidante (por ejemplo los productos de la reacción de Maillard) (Nicoli et al., 1999). Dependiendo de la velocidad relativa de estas reacciones, la actividad antioxidante puede decrecer, incrementarse o permanecer igual durante el procesamiento del alimento (Lavelli y Vantaggi, 2009). En tanto el procesamiento implique cambios en la concentración, estructura química y estado de oxidación de los compuestos fenólicos tendrá efecto directo sobre la capacidad antioxidante (Nicoli et al., 1999).

Dado que se trata de una matriz de manzana modificada, donde se han incorporado nuevos componentes fenólicos provenientes del zumo de mandarina, es lógico pensar que el perfil de estos compuestos en el snack es diferente que sus componentes individuales y que pueden ocurrir reacciones combinadas que explican las variaciones en las propiedades funcionales en contenido y actividad funcional, potenciando o ejerciendo sinergias o antagonismos entre ellos.

Un estudio del efecto de diferentes métodos de secado de rodajas de manzana sobre el contenido de componentes fenólicos, concluyó que éstos que fueron evaluados por el ensayo de Folin -Ciocalteu no se vieron afectados por el secado pasando de un contenido en la manzana fresca de 65.39 mg/100g b.s a valores en el rango de 69.08-71.47 mg/100 g b.s pero sí que encontraron efectos sobre los componentes fenólicos individuales (Joshi et al., 2011).

Diferentes mecanismos de reacción (vías de reacción) han sido sugeridos para explicar estos resultados: i) oxidación de fenólicos que resultan en componentes intermedios con gran actividad antioxidante aunque esto puede ser temporal, ii) degradación térmica de algunas moléculas fenólicas de alto peso molecular que puede generar antioxidantes de bajo peso molecular más activos y iii) liberación de ácidos fenólicos ligados o compuestos fenólicos unidos (Maillard y Berset, 1995).

Como se discutió en el apartado anterior la impregnación de oligofruktosa ha sido un proceso homogéneo. A partir del contenido de oligofruktosa de las muestras de manzana impregnadas (IV), es posible calcular el contenido teórico de las muestras secas (SAC) dando como resultado un valor muy similar al determinado en el ensayo experimental, y que indica que la oligofruktosa no sufrió ningún proceso de hidrólisis durante el secado por aire caliente.

Es destacable el enriquecimiento de la manzana con componentes antioxidantes de tipo flavanonas como la hesperidina aportados por el líquido de impregnación. Este compuesto es reconocido por poseer actividad biológica que incluye propiedades antioxidantes, efectos antiinflamatorios e inhibitorios de la biosíntesis de las prostaglandinas (Devi et al., 2015). Otros estudios conducidos en animales demostraron que la hesperidina, junto con la β -criptoxantina, inhibe la carcinogénesis química (Tanaka et al., 2012).

A partir del contenido de hesperidina de las muestras de manzana impregnadas (IV), se realizó el cálculo del contenido teórico de las muestras secas (SAC) obteniéndose un valor de 35.14 mg/100 g, que es muy similar al valor determinado experimentalmente, dada la alta estabilidad térmica del compuesto, resultado que ha sido confirmado en estudios previos (Sánchez-Moreno et al., 2005; Dhuique-Mayer et al., 2007; Betoret et al., 2012).

5.7 Valoración nutricional y funcional del aperitivo desarrollado

Son numerosos los estudios epidemiológicos que sugieren que el consumo de frutas y verduras como parte de una dieta saludable puede reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y Alzheimer (Knai et al., 2006; Temple, 2000; Joshipura et al., 2001; Van Duyn et al., 2000; Dauchet et al., 2006; Liu, 2003), las cuales son las principales causas de muertes en Europa, Estados Unidos y la mayoría de países industrializados (EFSA, 2008; Liu, 2004). Un alto consumo de frutas ha sido asociado con una reducción entre 10-40% del riesgo de enfermedades cardiovasculares en estudios de cohortes prospectivos (Bazzano et al., 2002; Hung et al., 2004; Johnsen et al., 2003; Joshipura et al., 2001; Singh et al., 1993). Por otro lado, se ha estudiado en intervenciones controladas el efecto del consumo de fruta fresca o procesada en los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares encontrándose tras su consumo descenso significativo de colesterol total y LDL en plasma y la presión sanguínea (Djousse et al., 2004; Dragsted et al., 2006; Jenkins et al., 1997; Obarzanek et al., 2001). Por otro lado, se estima que la tercera parte de las muertes por cáncer en países industrializados podrían ser evitadas a través de una formulación apropiada de la dieta. También se ha encontrado que el consumo de frutas en la niñez puede proteger contra el cáncer en la adultez (Maynard et al., 2003). Otros estudios han publicado evidencias que niños que consumen regularmente frutas y vegetales como parte de su dieta son menos vulnerables a las enfermedades típicas de su edad (Antova et al., 2003).

Todos estos estudios han contribuido a generar una percepción de las frutas como productos saludables especialmente en estado fresco. Los componentes a los cuales se les atribuye estos beneficios son: alcaloides, carotenoides, potasio, folatos, vitaminas, fibra y componentes fenólicos. Estos nutrientes y fitoquímicos actúan de manera sinergista para prevenir factores de riesgo de las enfermedades crónicas y por tener diversas bioactividades, por ejemplo, como antioxidante, antiproliferación, antifúngicas, antibacterial y antiviral (Dillard y German, 2000).

La consistencia del efecto protector del consumo de frutas que da lugar a un menor riesgo de enfermedades sugiere que una mayor participación de frutas, vegetales y granos enteros dentro de las comidas y cambios relacionados con el estilo de vida son estrategias prácticas para una reducción significativa de la incidencia de estos tipos de enfermedades (Terry et al., 2001).

Asimismo, esta fuerte asociación entre la ingesta de frutas y hortalizas y la salud ha llevado a las organizaciones de todo el mundo a recomendar que las poblaciones aumenten el consumo diario de frutas y verduras. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda consumir 400 g o 5 raciones de frutas y hortalizas al día (OMS y FAO, 2003). No obstante, a pesar de las campañas y esfuerzos educativos, sigue habiendo una importante brecha entre la cantidad recomendada de frutas y verduras y la cantidades efectivamente consumidos por las poblaciones de todo el mundo, por ejemplo, en Europa el consumo de frutas se mantiene muy por debajo de los niveles recomendados (Sijtsema et al., 2011). A los consumidores a menudo les resulta difícil comer más frutas y verduras porque creen que son demasiados caros, se descomponen muy rápidamente, o toman demasiado tiempo para su preparación (Da Silva y Moreira, 2008). Una alternativa para mejorar esta situación es ofrecer productos a partir de frutas que tengan una mayor accesibilidad y se incorporen fácilmente a los estilos de vida de niños, jóvenes y adultos. Los aperitivos desarrollados a partir de frutas pueden ser parte de la solución y en esta dirección se están planteando diversas propuestas. Potter et al. (2013) desarrollaron un aperitivo extruido con

incorporación de harinas de frutas como manzana, plátano, fresa, mandarina, el producto resultante tuvo una mejora en el perfil nutricional comparado con otros aperitivos extruidos presentes en el mercado siendo bajos en grasa y azúcar, una buena fuente de fibra, asimismo un alto contenido de actividad antioxidante. En otro estudio, Sun-Waterhuse et al. (2010) desarrollaron unos aperitivos a base de una masa horneada rellena de un preparado de puré de manzana con adición de inulina, el producto final mostró un contenido alto de fibra dietaria (5,3%), y un aumento del contenido de compuestos fenólicos altos en floridizina y ácido clorogénico provenientes de la manzana. Otro esfuerzo europeo fue el proyecto Nutra-Snack (2006-2009) que estableció un marco científico y tecnológico integrado para introducir tecnologías nuevas y convencionales con el propósito de producir nuevos aperitivos listos para el consumo enriquecidos con metabolitos naturales con actividad funcional: anticáncerígenos, antilipidémicos, anticolesterol, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antihipertensivo, antiinflamatorio y antioxidante.

Las frutas secas representan un importante medio para aumentar el consumo total de frutas, para cerrar la brecha entre la ingesta recomendada de las frutas y las cantidades actualmente consumidas (Aksoy et al., 2011). Las frutas secas proporcionan nutrientes esenciales como: la fibra y potasio, y una variedad de compuestos bioactivos. Son libres de grasa, bajas en sodio y no tienen azúcares añadidos, son naturalmente resistentes al deterioro, fácil de almacenar y transportar, disponibles todo el año, de fácil incorporación en otros alimentos, y de coste relativamente bajo. Un estudio realizado en el 2011 demuestra que el consumo de fruta seca está asociado con una mejora en la ingesta de nutrientes, una mejora en la calidad de la dieta y reducción de la obesidad en adultos (Keast et al., 2011).

Las alternativas de industrialización de las frutas y verduras que intentan ampliar el consumo a través de una oferta variada de productos deben seleccionar procesos que aseguren el menor efecto sobre los compuestos funcionales y nutricionales, a fin de seguir ofreciendo los beneficios de los productos frescos.

En el caso particular de deshidratación de alimentos este puede significar pérdida de volátiles y sabores, cambios en el color y la textura, y una disminución en el valor nutricional (Nijhuis, 1998).

La manzana es una buena fuente nutricional de fibra dietaria y vitamina C y muy baja en grasa saturada, colesterol y sodio (Wills et al., 2007). Adicionalmente a estos contenidos nutricionales estándares, las manzanas son preferidas porque ellas son fuente de compuestos fenólicos (Boyer y Liu, 2004). Los fenólicos son antioxidantes ampliamente conocidos que han demostrado beneficios para la salud humana. Ha sido estimado que manzanas contribuyen con el 22% del consumo de fenólicos de frutas en los consumidores americanos (Vinson et al., 2001).

La composición de compuestos polifenólicos de la manzana que se reporta en la bibliografía incluye: flavan 3-ols: procianidina A2, B1 y B2, (+)-catequina y (-)-epicatequina; ácidos hidroxicinámicos: ácidos clorogénico, ácido caféico, ácido ferúlico y derivados de ácido p-coumárico y dihidrochalconas (floridzina y derivados de floretina) (Tsao et al., 2005). De los cuales los flavan 3-ol es el grupo polifenólico más abundante con un aporte de aproximadamente del 50% seguido por los ácidos hidroxicinámicos y en muy bajas concentraciones las dihidrochalconas que se encuentra principalmente en la cáscara (Keenan et al., 2011), se mencionan además: ácidos hidroxibenzoicos: ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido gentísico, flavonoles: quercetina presente en forma glicosilada y en algunas variedades presentan antocianinas: derivados glicosilados de cianidina (Kalinowska et al., 2014).

Estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de manzana con reducido riesgo de algunos cánceres, enfermedades cardiovasculares, asma y diabetes (Boyer y Liu, 2004). Fenólicos de manzana poseen un significativo potencial antioxidante y ha sido demostrado inhibir la proliferación de células cancerígenas, decrecimiento de oxidación lipídica y más bajo colesterol en test de laboratorio (Boyer y Liu 2004).

Las frutas cítricas son reconocidas como importantes componentes de la dieta humana, proporcionando una gama de nutrientes esenciales, así como muchos fitoquímicos no nutrientes los cuales son importantes para la nutrición humana desde que ellos poseen propiedades antioxidantes. Los beneficios saludables de las frutas cítricas han sido principalmente atribuidas a la presencia de componentes bioactivos tales como fenólicos (glicósidos de flavanonas, ácidos hidroxicinámicos), vitamina C y carotenoides (Dhuique-Mayer et al., 2005, Sdiri et al., 2012).

La actividad antioxidante y anti-radical de las frutas cítricas son principalmente debido a la fracción hidrosoluble que incluye polifenoles y vitamina C y también a la fracción apolar que incluye carotenoides, responsables del efecto protector contra enfermedades crónicas y degenerativas (Byers y Perry, 1992; Gorinstein et al., 2001; Tripoli et al., 2007). La vitamina C es considerada ser uno de los más importantes nutrientes encontrados en las frutas cítricas y es un importante antioxidante soluble en agua que juega un rol crucial en la supresión de radicales superóxidos (Kaur y Kapoor, 2001).

Las frutas cítricas también son ricas en compuestos fenólicos incluyendo flavonoides, ácidos benzoicos e hidroxicinámicos con potenciales propiedades promotoras de la salud. Estos componentes han sido propuestos como importantes contribuyentes a la capacidad antioxidante (Burda y Oleszek, 2001; Rapisarda et al., 1999). Los flavonoides, los más abundante fenólicos en frutas cítricas han demostrado tener actividad biológica funcional como antioxidante, anticarcinogénica, cardiovascular y antiinflamatoria (Benavente-Garcia y Castillo, 2008; Hung y Ho, 2010). La más alta concentración corresponde a flavanonas glicosídicas, seguida de flavonas, flavonoles y flavones polimetoxiladas (Kawaii et al., 1999; Nogata et al., 2006; Peterson et al., 2006; Tripoli et al., 2007) Hesperidina, narirutina, naringina, eriocitrina y neohesperidina son los principales flavanonas glicosiladas (Mouly et al., 1994, Peterson et al., 2006).

España es el segundo productor de mandarina y es también el principal abastecedor en el mercado internacional especialmente en países europeos del norte y Estados Unidos de Norteamérica (Navarro et al., 2011; Pérez-López et al., 2006). España concentra la producción de mandarina en las áreas de Valencia y Murcia y presenta un consumo anual percapita de 5 kg (MAPA,2003). Por otro lado, los precios de venta de mandarina algunas veces no cubren los costos elevados de su cultivo. Teniendo en cuenta que los dos principales productos elaborados a partir de esta materia prima son rodajas enlatadas y jugo y que ellos únicamente representan alrededor del 7% del total del comercio de esta fruta (FAO, 2005; Pérez-López et al., 2006) existe entonces una necesidad imperativa de encontrar nuevos usos para esta fruta por parte de la industria alimentaria.

Por las características descritas, estas dos frutas se presentan como una buena alternativa para el desarrollo de productos de tipo aperitivo, que combine los beneficios demostrados de sus composiciones nutricionales y funcionales y que pueda ser considerada una alternativa saludable a los que se ofrecen en el mercado de este tipo de producto.

La estructura tradicional de tres comida al día, en horarios y lugares determinados se ha ido reemplazando por un patrón más individualizado de consumo de alimentos (Bisogni et al., 2007; Jastran et al., 2009). Esta irregularidad en el consumo de alimentos a veces resulta en largos intervalos de tiempo entre las comidas principales. En estos intervalos, el cuerpo humano requiere un suministro constante de energía (Bilman et al., 2010) que se cubre, fundamentalmente mediante la ingesta de aperitivos (snack). Estadísticas indican que la contribución de los aperitivos a la dieta es importante, por ejemplo se ha estimado que el 97% de la población de EEUU consume aperitivos con una participación en el consumo de energía del 27 y 24% de la energía total diaria para niños/adolescentes y adultos respectivamente (Piernas y Popkin, 2010). En Europa el panorama no es distinto, existen muchas investigaciones

orientadas a evaluar la participación de este tipo de alimento en la dieta diaria teniendo resultados similares.

Debido a esta contribución de alimentos aperitivos a la dieta general se ha considerado que los alimentos elegidos en los episodios "snacking" tienen efectos sobre la salud (St-Onge et al., 2007).

Existen numerosos estudios epidemiológicos que demuestran las preocupaciones de los diferentes países para evaluar los factores de riesgo que conlleva el consumo del tipo de aperitivos que el mercado ofrece actualmente. Resultados de estos estudios han demostrado cierta relación en la presencia de síndromes metabólicos y factores de riesgo cardiovascular asociado a diferentes niveles de consumo de aperitivos (Vergetaki et al., 2011).

El síndrome metabólico es un desorden multifactorial muy común que incluye resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipemia, e hipertensión que finalmente conduce al desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (Mirmiran et al., 2014). Asimismo, el incremento de peso ha sido asociado a hábitos dietarios que incluyen como componente principal alimentos de alta densidad energética pero bajos en valor nutricional tales como: alimentos salados procesados, aperitivos, gaseosas, dulces y chocolates. Estos alimentos constituyen una fuente rica en azúcares simples, sodio y ácidos grasos trans y saturados (St-Onge et al., 2007; Vardavas et al., 2007; Lloyd-Williams et al., 2009).

El mercado de productos aperitivos de tipo sólidos, en su mayoría están representados por dos tipos: aquellos que provienen de procesos de extrusión y horneado y aquellos de procesos de fritura.

Los aperitivos extruidos u horneados se fabrican a partir de cereales o tubérculos con alto contenido en almidón, a los que se añade una cantidad elevada de azúcar o sal. Como resultado se obtiene productos de valor nutricional bajo y

contenido calórico alto, que pueden contribuir a aumentar los desequilibrios nutricionales. Por otro lado, como consecuencia de las condiciones de presión y temperatura elevadas que implica la extrusión y el horneado pueden ocurrir un gran número de reacciones, entre ellas reacciones de Maillard, de desnaturalización de proteínas y de degradación de componentes activos como vitaminas o componentes con actividad antioxidantes (Smith y Hardacre, 2011).

Una buena parte de los aperitivos de frutas y vegetales que se encuentran en el mercado son procesados por fritura, proceso que resulta en altos contenido de grasas por ejemplo manzanas fritas a 110°C por 25 minutos a vacío significa una ganancia de 39% de aceite además de acompañarse con reacciones de oscurecimiento no enzimático (Shyu y Hwang, 2001). Algunos aperitivos tal como hojuelas fritas de papa son fuente de acrilamida que induce el estrés oxidativo y promueve inflamación subclínica y consecuentemente resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares (Naruszewicz et al., 2009). Estos tipos de aperitivos son considerados no saludables y se recomienda limitar su consumo principalmente como parte de un esfuerzo por controlar el peso corporal y también para evitar grasas saturadas y grasas trans (de Graaf, 2006), las cuales pueden tener un efecto desfavorable para la salud con el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Ollé y Artiasarán, 2013; Da Silva Lima Dias et al., 2015; Hoenselaar, 2012).

En general, las características dominantes de los aperitivos presentes en el mercado son su alto contenido de grasa saturada, sal, azúcar refinada y alta densidad energética (Lloyd-Williams et al., 2009). Un promedio de sus contenidos de energía es alrededor de 1500- 2000 kJ/100 g (400-500 kcal/100g). Aperitivos salados tales como hojuelas de papa son productos con alta densidad energética con 2200 kJ/100g (550 kcal/100h) (NEVO, 2004; Whybrow, 2005).

Estos hallazgos enfatizan la necesidad de desarrollar intervenciones nutricionales efectivas para promover la selección de aperitivos más saludables

en niños, adolescentes y jóvenes, con el objeto de prevenir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares más adelante en la vida adulta (Mammas et al., 2003; Mukherjee, 2005).

El número de aperitivos que son consumidos durante el día ha incrementado en las últimas décadas. Las personas comen en episodios y no continuamente. Hay una distinción entre comidas y aperitivos, el primero usualmente se refiere a las tres comidas principales del día: desayuno, almuerzo y comida. El término aperitivo se refiere a los otros episodios de comidas e incluyen todos los alimentos y bebidas consumidas fuera del contexto de las tres principales comidas (de Graaf, 2006).

Afortunadamente, la actitud de los consumidores frente a lo que consumen está cambiando y hay una tendencia creciente a demandar aperitivos que no únicamente proveen de comodidad y sabor, sino también beneficios nutricionales y de salud, especialmente los destinados a los niños (Jack et al. 1997; Zandstra et al., 2001; Mintel, 2009). Este cambio en la demanda del mercado está orientando a la industria de alimentos a una nueva generación de aperitivos cuyas características resaltantes sean bajos en grasa, horneados pero no fritos, altos en fibras, bajos en calorías y azúcares (Mazumder et al., 2007).

En este sentido, numerosas investigaciones proponen la modificación de las formulaciones para incorporar componentes más nutritivos y funcionales como frutas y vegetales o fortificar con vitaminas o ácidos grasos omega entre otros, así como modificando procesos que disminuyan la incorporación de grasas como por ejemplo en los procesos de fritura (Potter et al., 2013).

Las frutas han sido consideradas una apropiada plataforma para desarrollar aperitivos para niños, éstas contienen componentes como pigmentos y sabores que contribuyen en las características sensoriales del producto final con mayor aceptación que los otros vegetales (Domel et al., 1996). El usar frutas secas

como portadores de ingredientes funcionales es un concepto relativamente nuevo. Las sinergias beneficiosas entre fruta como un aperitivo saludable y algunos componentes bioactivos como las bacterias probióticas tiene el potencial de conducir a una nueva era de innovaciones en alimentos funcionales (Roβle et al., 2010; Sun-Waterhouse, 2011).

En las siguientes líneas se realiza una valoración nutricional y funcional del aperitivo desarrollado. Los datos reportados provienen de los análisis químicos del aperitivo y de una estimación teórica mediante la aplicación del modelo hidrodinámico propuesto por Fito (1994) y Fito y Pastor (1994), tomando como fuente base para las estimaciones, los valores de USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25 (2012). En la tabla 5.19 se presenta el análisis proximal. En la tabla 5.20 se incluye una evaluación funcional con los principales componentes nutricionales bioactivos incorporados y en la Tabla 5.21 se presenta un comparativo con aperitivos comerciales presentes en el mercado español y algunos desarrollos propuestos por investigaciones. Se comentará en las siguientes líneas los aspectos más resaltantes.

Tabla 5. 19 Estimación de la composición proximal del líquido de impregnación, manzana fresca, manzana impregnada, aperitivo desarrollado

Componente	g/100 g				g/ración (40g)
	Líquido de impregnación	Manzana fresca	Manzana Impregnada	Aperitivo desarrollado	
Agua	84.01	86.67	86.20	11.72	4.68
Proteína	0.72	0.27	0.35	2.25	0.89
Lípidos	0.19	0.13	0.15	0.93	0.37
Ceniza	0.28	0.17	0.19	1.23	0.49
Carbohidratos	10.85	11.46	11.32	72.47	28.98
Fibra	3.95	1.3	1.78	11.41	4.56
Energía (Kcal/100 g)	50.44	45.85	49.68	317.93	127.17

En general los componentes que modifican sus niveles a consecuencia de la IV son el contenido de proteína y el contenido de fibra debido a la incorporación de zumo de mandarina formulado con levadura de cerveza y oligofructosa. Asimismo puede observarse el efecto del secado elevando los niveles de todos los componentes a consecuencia de la concentración. Más que los niveles globales es de destacar el enriquecimiento en microcomponentes que están siendo aportados por el zumo de mandarina y que serán comentados más adelante.

Otro aspecto relevante es el contenido de fibra dietaria. Se ha aumentado el contenido de fibra dietaria en la manzana a través de la incorporación de oligofructosa la cual es considerada como fibra, del tipo soluble. La fibra dietaria es uno de los nutrientes más asociados a la promoción de la salud y prevención de enfermedades, está correlacionada con beneficios para la salud como la reducción del colesterol, prevención de la obesidad, la diabetes, el cáncer de colon (Wakai et al., 2007), y disminución de la incidencia de las enfermedades coronarias y cardiovasculares (Adebawo, 2006; Guimé y Lima, 2012). Aunque la mayoría de prebióticos son comúnmente considerados como fibra dietaria, todos los componentes de la fibra dietaria no poseen las propiedades prebióticas (Forssen et al., 2011). Esta condición de la oligofructosa fortalece el contenido de fibra dietaria de la manzana como parte del aperitivo propuesto, añadiendo aún mayores propiedades funcionales inherentes a su calidad de fibra.

El contenido de fibra dietaria en la manzana es relativamente alto comparado con otras frutas (Jensen et al., 2009; Feliciano et al., 2010). La fibra insoluble representa 50% de la fibra total e incluye celulosa y hemicelulosa. La fibra soluble, principalmente pectina comprende homogalacturonas y ramnogalacturonas, siendo homogalacturonas la fracción principal que consiste de largas cadenas de ácidos galacturónicos unidos con enlaces $\alpha(1-4)$. Los grupos carboxílicos en estas cadenas pueden estar esterificados con metanol. El grado de metilación influye fuertemente en las propiedades funcionales y fisicoquímicas de las pectinas (Dongowski y Lorenz, 1998; Dongowski et al.,

2002; Gulfi et al., 2006; Koutsos y Lovegrove, 2015). La pectina ha sido asociada con mejora de la resistencia a la insulina en ratas (Sánchez et al., 2008) y efectos depresores del colesterol en humanos. El grado de esperificación, peso molecular y estructura tienen una importante influencia en la magnitud del efecto (Dongowski, 1995; Brown et al., 1999; Brouns et al., 2012). Además, la pectina es un agente gelificante que afecta el tiempo de tránsito, vaciado gástrico y absorción de nutrientes (Brouns et al., 2012; Spiller et al., 1980; Schwartz et al., 1982; Tamura et al., 2007; Hishijima et al., 2009). Es resistente a hidrólisis alcanzando el intestino delgado donde es fermentado por la microbiota intestinal (Licht et al., 2010; Titgemeyer et al., 1991; Barry et al., 1995; Bourquin et al., 1996).

Recientemente, las investigaciones han focalizado en el uso de fibras dietarias solubles de fructanos tipo inulina y oligofruktosa. Este tipo de fibra es uno de los nutrientes más asociados con beneficios para la salud, tales como reducción de colesterol, prevención de la obesidad y la diabetes, cáncer de colon y disminución de la incidencia de enfermedades coronarias y cardiovasculares (Abedawo, 2006; Wakai et al., 2007). Asimismo, de manera particular numerosos estudios han identificado varios beneficios atribuidos a las oligofruktosa y a la inulina de la que proviene. Estos incluyen manejo de la constipación (Den Hond et al., 2000), mejora de la composición de la flora intestinal por estimular un metabolismo sacarolítico y supresión del metabolismo proteolítico en bifidobacterias y acidolácticas (Gibson et al., 1995; Kleesen et al., 1997; Buddington et al., 1996), estimulación de la absorción de calcio (Van den Heuvel et al., 1999; Coudray et al., 1997; Abrams et al., 2000), modulación del metabolismo de lípidos (Jackson y Taylor, 1999; Davidson et al., 1998; Brighenti et al., 1999) y prevención del cáncer (Reddy et al., 1997; Rowland et al., 1998; Taper et al., 1998).

En la literatura no existe un claro consenso en el valor de ingesta mínima efectiva de prebióticos requerida para producir un efecto beneficioso. Tomomatsu (1994) y Roberfroid (1998) recomiendan entre 2 a 10 g por persona/día, Coussement

(1999) recomienda de 3 a 8 g por porción. Otros estudios (Gibson, 1999; Rao, 1999) sugieren una ingesta de 15 g/día o niveles de 4-12 g/día (Conway, 2001). Es preciso señalar que estas discrepancias podrían atribuirse a la diferente susceptibilidad de los sujetos de estudio (variabilidad genética), a las funciones específicas en las que se ha estudiado su efecto y a regímenes especiales de consumo etc. Por otro lado, Rao (2001) condujo un estudio para demostrar el efecto de una baja dosificación (5 g/día) de oligofructosa del mismo tipo de la presente investigación (Rafylose P95) y un placebo bajo la misma concentración (sucrosa) y sus resultados confirmaron el efecto prebiótico bifidogénico de este producto comercial bajo esta dosis, con una estimulación selectiva del crecimiento de cierto tipo de bacterias (*Bifidobacterium*), mientras otros grupos permanecieron a niveles constantes (coliformes, aerobios). Otro estudio demostró que la administración de 2 g al día de oligofructosa por 4 semanas a bebés de 6-24 meses incrementó el crecimiento de *Bifidobacterium* y decreció el crecimiento de *Clostridium* (de Vriese y Marteau, 2007).

Conway (2001) publica recomendaciones dependiendo del tipo de probiótico como sigue: inulina: 8-40 g/día (15-64 días), fructo-oligosacáridos (FOS) : 4-12.5 g/día (8-12 días), galacto-oligosacáridos: 7.5-15 g / día, (7-21 días), oligosacáridos de la soya: 10 g/día (21 días) y lactulosa: 3-20 g/ día (14-28 días). En general, los niveles de dosificación para la mayoría de los beneficios de salud variará de 3 g/día para los fructooligosacaridos de cadena corta a 8 g/día para la inulina mixta (con cortas y largas cadenas), aunque podría consumirse en mayor cantidad y de manera segura según la tolerancia individual (Marteau y Flourie, 2001; Douglas y Sanders, 2008).

El consumo promedio diario de prebióticos ha sido estimado entre 1 a 4 g en Estados Unidos y de 3 a 11 g en Europa (Roberfroid, 2000), en el caso particular de España el consumo promedio diario de prebióticos (inulina+oligosacáridos no digeribles) es de 1.1 g/día (Espinosa et al., 2006), por lo que el aperitivo desarrollado puede ser un buen suplemento para completar la ingesta recomendada. No obstante podría incorporarse mayor contenido de prebiótico si

se soluciona el problema de la supervivencia del microorganismo a través de la investigación en técnicas que permitan una mayor tolerancia a altas concentraciones (estrés osmótico).

Para considerar un alimento fuente de fibra debe contener 3g/100 o al menos 3 g en la razonable porción diaria de ingesta del alimento. Para una alegación de alimento alto en fibra debe contener al menos 6 g/100 g o al menos 6 g en la porción de ingesta (British Nutrition Foundation, 2004), teniendo en cuenta esto, el aperitivo se consideraría como fuente de fibra.

Otro aspecto a considerar es el contenido de azúcares que está incluido dentro del componente de carbohidratos en el análisis proximal, si bien es cierto es alto su fuente es natural y proveniente de la manzana y el zumo de mandarina que conforman el aperitivo y sería también la razón del elevado aporte de calorías. En manzana, la matriz base, la fructosa es el contenido predominante y sucrosa y glucosa son también abundantes (Koutsos y Lovegrove, 2015). Estudios en animales modelo siguieron que una dieta con alto contenido de fructosa, principalmente como parte de sucrosa o jarabes de maíz con alto contenido de fructosa y otras bebidas ha sido asociada con resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperlipidemia e hipertensión (Elliott et al., 2002). Sin embargo, curiosamente únicamente el consumo de jugos de frutas azucaradas pero no jugos de 100% frutas han sido asociados con diabetes tipo 2 en estudios prospectivos cohort (Schulze et al., 2004; Palmer et al., 2008; Eshak et al., 2013). Esto sugiere que la presencia natural de fructosa y azúcares en jugos de 100% fruta y fruta fresca entera puede tener un diferente impacto metabólico que jugo de fruta con azúcar añadida aunque para confirmar estos hallazgos son requeridos estudios de intervención (Koutsos y Lovegrove, 2015). Ha sido propuesto que compuestos bioactivos en jugos de fruta que incluye: vitaminas, minerales polifenoles y fibra pueden contrarrestar el efecto adverso de los azúcares (Schulze et al., 2004).

Respecto al análisis funcional presentado en la tabla 5.20, además del contenido de oligofructosa es de destacar el enriquecimiento de la manzana con componentes del tipo flavanonas (hesperidina, narirutina y didimina) que no se encuentran de manera natural en esta fruta. Comparativamente 100 mL de zumo comercial (Marca Don Simón) aporta 54,74 mg de hesperidina y 100 g del aperitivo desarrollado 36.31 mg. Betoret et al. (2012) trabajando con zumo de la variedad Ortanique homogenizado a 15 MPa logró un nivel de hesperidina en 100g de producto deshidratado de 12.43 mg. El menor contenido se explica en razón que esta variedad de mandarina tiene un contenido de 134.1 mg de hesperidina en un 1 litro de zumo homogenizado muy por debajo del contenido del zumo comercial utilizado en esta investigación (547.4 mg/L), la variabilidad varietal explicaría esta diferencia. Abad-Garcia et al. (2012) estudiaron cultivares españoles de frutas cítricas y reportan para el caso de zumo de mandarina de diferentes subclases y variedades un rango de concentración entre 144-984 mg/L, 13-203 mg/L, 1-174 mg/L para hesperidina, narirutina y didimina respectivamente. Guihau et al. (2008) en variedades cultivadas en China (Wase satsuma, Sarsuma, Ponkan, Bendizao, Manju, Zhuhong) publican rangos para hesperidina de: 304.46-501.44 mg/L y en narirutina de 24.42-288.12 mg/L.

Zumo de mandarina de las especies *C.unshiu* y *C. reticulata* presentan contenidos de hesperidina de 400 y 493 mg/1000 g (Abeysinghe et al. 2007).

La hesperidina es conocida por poseer actividad biológica que incluye: propiedad antioxidante, efecto anti-inflamatoria, y la inhibición de la biosíntesis de la prostaglandinas, otros estudios en animales demostraron que la hesperidina junto con la β -criptoxantina presente en zumos de mandarina inhiben carcinogénesis química (Kohno et al., 2001).

Tabla 5. 20 Evaluación funcional del líquido de impregnación, manzana fresca, manzana impregnada y aperitivo desarrollado

Componentes	para 100 g producto				Ración 40g
	Líquido de impregnación	Manzana fresca	Manzana Impregnada	Aperitivo desarrollado	
Prebiótico					
Oligofructosa (g)	3.76	n.d.	0.684	4.16	1.66
Flavanonas					
Hesperidina (mg)	50.60	n.d.	6.22	36.31	14.52
Narirutina (mg)	4.79	n.d.	0.83	5.51	2.20
Didimina (mg)	2.00	n.d.	0.30	1.52	0.6091
Otros					
Vitamina C (mg)	23.58	2.38	5.54	13.84	5.53
β -Caroteno (μ g)	35.91	17	20.78	132.99	53.19
α -Caroteno (μ g)	13.23	0	2.65	16.93	6.77
β -Criptoxantina (μ g)	202.23	13	50.85	325.39	130.153
Lutein+ zeaxantin (μ g)	156.87	18	45.78	292.93	117.17
Potasio (mg)	168.21	90	105.64	676.02	270.40
Actividad antioxidante					
DPPH (mg ácido ascórbico equivalente)	481.63	114.2	114.7	755.3	302.12

En cuanto al contenido de ácido ascórbico si bien es cierto la manzana no es reconocida como una fruta que aporte un alto contenido de esta vitamina, la impregnación con zumo de mandarina ha permitido casi duplicar su valor inicial, sin embargo, la inestabilidad de esta vitamina acompañado con el contacto con oxígeno reduce el contenido en las siguientes etapas del proceso (impregnación y deshidratación).

La dosis recomendada de ácido ascórbico varía dependiente la edad, estando en el rango de 45 mg para un niño de 9 años hasta 90 mg por día para un hombre adulto (Frei y Trabe, 2001; Padayatty y Levine, 2001), esto significa que 100 g del aperitivo estaría contribuyendo aproximadamente con el 30 y 18% de los requerimientos respectivamente.

También es de resaltar el aporte de compuestos carotenoides. Las frutas cítricas pueden tener más de 115 diferentes carotenoides. Los principales carotenoides encontrados en mandarina son: β -criptoxantina, violaxantina, neoxantina, luteína y anteraxantina, α -caroteno y β -caroteno. De estos componentes, β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina son los que tienen mayor alta actividad como pro-vitamina A (Meléndez-Martínez et al., 2007). La β -criptoxantina es la responsable del color naranja oscuro casi rojo, color distintivo de la mandarina (Goodner et al., 2001). La incorporación a la matriz de manzana por IV y su posterior presencia en el aperitivo después del secado se hace evidente por el color entre amarillo y naranja intenso que ha adquirido después de la IV.

No obstante, el valor estimado sólo es referencial dado que la operación de secado a de significar una reducción de este contenido. La degradación de carotenos es generalmente debido a degradación térmica e isomerización. En el secado de zanahoria a 60° / 7 horas/ 0.8 m/s se tuvo una retención de \approx 40% de β -caroteno (Hiranvarachat et al., 2008). Dhuique-Mayer et al., (2007) estudiaron la degradación térmica de diversos carotenoides y encontraron diferencias en la estabilidad clasificando a la β -criptoxantina y β -caroteno, los principales carotenoides presentes en mandarina, dentro del grupo de los

carotenoides termoestables con pérdidas después de un tratamiento de 5 horas a 55°C de 4.6 y 7.8 % respectivamente.

El estrés oxidativo es un proceso resultante de un desbalance entre una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y/o especies nitrogenadas y limitada acción de defensas antioxidantes. Es un factor de riesgo para la salud especialmente perjudicial, que influye en el desarrollo de diversas patologías crónicas (Rea et al., 2011). Entre otros factores que contribuyen a equilibrar este desbalance, el efecto antioxidante de la dieta tiene un alto nivel de interés público. Las frutas son especialmente ricas en antioxidantes naturales y estos compuestos pueden reducir el daño oxidativo en el cuerpo humano que de lo contrario aumenta el riesgo de enfermedades crónicas (Liu, 2003). El producto desarrollado tiene un contenido antioxidante equivalente a 755.3 mg ácido ascórbico/100g producto la combinación de dos frutas de reconocida actividad antioxidante y el efecto de concentración de la deshidratación ha permitido que el aperitivo aporte un buen nivel de contenido antioxidante. La baja temperatura de deshidratación (40°C) junto con reacciones que se han desarrollado durante la operación no ha significado un descenso de la actividad antioxidante tomada como un valor absoluto.

En un estudio conducido por Joshi et al. (2011) se hace un comparativo entre un aperitivo elaborado a partir de manzana por IV en jarabe de arce y secado por aire caliente en dos etapas a 30°C/10h y 40°C/10 horas y aperitivos fritos comerciales de manzana y papa. El aperitivo desarrollado mostró aproximadamente 20 veces más capacidad antioxidante comparado con hojuelas fritas de papa.

Ha sido reportado que la cantidad de antioxidantes y la capacidad antioxidante son más altas en la fracción cáscara que en la pulpa o fruta entera (Wolfe et al., 2003; Lara y Tomala, 2007; Drogoudi et al., 2008; Khanizadeh et al., 2008; Henríquez et al., 2010). Generalmente, la cáscara contiene de 2 a 6 veces más fenólicos que la pulpa (Kalinowska et al., 2012). Además, la cáscara de manzana

es una buena fuente de otros componentes valiosos como fibra dietaria y minerales (Gorinstein et al., 2001; Hernández et al., 2010). Por lo que se considera no eliminar la cáscara para la elaboración del aperitivo podría potenciar su funcionalidad. Schulze et al. (2012) estudiaron la fortificación de rodajas de manzana por IV con glicósidos de quercetina proveniente de los residuos de cáscara subproducto de la industria de jugo de manzana, logrando significativo enriquecimiento y aumentando el contenido de flavonoides.

En el comparativo con otros aperitivos comerciales y propuestos que se presenta en la tabla 5.21 destaca el aperitivo desarrollado por su alto contenido de fibra dietaria, bajo contenido de lípidos y bajo nivel de calorías.

Tabla 5. 21 Composición proximal y calorías del aperitivo desarrollado y comparativo con aperitivos comerciales por 100 g.

Tipo de snack	Proteína (g)	Hidratos de Carbono (g)	Lípidos (g)	Calorías (Kcal)	Fibra dietaria total (g)	sodio (g)
Productos Bollería						
M1	6	42	32	505	1	0.2
M2	7.7	47.4	15.3	365	3.3	0.7
M3	3.9	56.7	20.1	424	0.6	0.1
M4	4.2	62	10	355	0.6	0.2
Productos extruidos						
Producto extruido fortificado con harina de manzana (Potter et al.,2013)	9.39	74.12	0.76	1462	1.98	0.08
M1 (Potter et al., 2013)	5.5	56	33	2290	1.1	1.98
M2 (Potter et al., 2013)	2.7	62.5	33.1	2236	1.1	2.21
Productos fritos						
M1	6	56.2	29.3	518	2.7	0.7
M2	9	55.6	26.1	501	3.7	1.3
M3	6,3	47.6	35	539	4.4	0.6
M4	6,3	66.3	20.9	494	7.6	0.9
Aperitivo desarrollado	2,2	72.5	0.9	317.9	11.4	0.0

Uno de los aspectos negativos de un grupo de aperitivos de consumo difundido es su contenido alto en cloruro de sodio (sal). Un alto consumo de sal afecta adversamente la presión en la sangre. En contraste, altos niveles de potasio están asociados con bajos niveles de presión sanguínea. Las evidencias que respaldan ambas tendencias incluyen resultados de estudios en animales, estudios epidemiológicos y ensayos clínicos (Appel, 2003). En este sentido, el aperitivo desarrollado no contiene sal y si un nivel de contenido de potasio de 665.33 mg/100g y 266.13 mg/ración de 40g que sin ser un valor alto contribuye a la ingesta diaria recomendada (4.7 g/d for adulto, Institute of Medicine, 2009). Comparando con el consumo de una manzana fresca (200 g) una ración de aperitivo desarrollado (40g) estaría aportando 47.9 % más de potasio. Una ración del aperitivo (40g) sería comparable al contenido de potasio en el plátano fresco, una fruta reconocida por su alto contenido en este mineral (358 mg/100g).

Es evidente que el producto desarrollado tiene un perfil nutricional y funcional mejorado comparado con los otros aperitivos los cuales son altos en calorías, grasas, y sal. En cuanto al azúcar si bien es cierto el nivel es alto pero corresponde a los azúcares naturales presentes en las frutas (manzana, mandarina) sin ninguna adición.

La fortificación de manzana con zumo de mandarina proporciona un nuevo tipo de aperitivo con mayor valor agregado, lo cual puede proveer beneficios de salud adicionales a la manzana. Es importante tener en cuenta que se puede lograr un mayor enriquecimiento basado en una selección de variedades ricas en estos componentes y contemplar la posibilidad de utilizar zumos concentrados siempre teniendo en cuenta que la viscosidad no exceda un límite que interfiera con el proceso de IV.

5.8 Estabilidad de las propiedades funcionales del aperitivo de manzana durante almacenamiento.

En la tabla 5.22 se presentan los valores medios de humedad y actividad del agua durante el tiempo de almacenamiento.

El control de los dos parámetros relacionados con el agua: la actividad de agua (aw) y el contenido de humedad, es esencial para preservar la viabilidad de las células de probióticos, las características sensoriales y la composición nutricional y funcional.

Se observa que los valores de humedad y aw durante los 150 días de almacenamiento se mantienen lo suficientemente bajos para evitar el crecimiento de hongos y bacterias no deseables pero al parecer también a un nivel perjudicial para la viabilidad del microorganismo probiótico.

Tabla 5. 22 Evolución de la humedad, actividad del agua (aw) y contenido del microorganismo probiótico de las muestras secas (SAC), en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	Humedad (g/g muestra)	aw	Contenido microbiano (UFC/g o mL)
0	0.118±0.001 ¹ d	0.449±0.007bc	2.25±0.03 x10 ⁷ a
15	0.110±0.001c	0.460±0.011d	9.25±0.06 x10 ³ b
30	0.106±0.002a	0.459±0.008d	-
78	0.106±0.001ab	0.446±0.008b	-
90	0.115±0.006d	0.460±0.011d	-
120	0.105±0.001a	0.433±0.008a	-
150	0.109±0.0012)bc	0.456±0.007cd	-

1 Desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0,05)

Las hojuelas de manzana deshidratadas han sido caracterizadas como un producto muy hidróscopico, resultado de su composición química y su estructura física, especialmente por el contenido de carbohidratos alto (alrededor de 70%) y por sustancias pécticas (Konopacka et al., 2002). En frutas deshidratadas los carbohidratos están constituidos principalmente por azúcares de bajo peso molecular que se encuentran en estado amorfo (enlazados a otras moléculas), lo que explica su más alta higroscopicidad (Mazza, 1984). Los componentes de alto peso molecular presente en la manzana son principalmente celulosa y sustancias pécticas. La capacidad de sorpción de estas últimas depende de su grado de metilación, pectinas de alta metilación a bajas a_w son capaces de adsorber de 2 a 3 veces más agua que pectinas de baja metilación (Tsami et al., 1992) y al parecer son más higroscópicas que otros componentes de alto peso molecular como el almidón y la celulosa. La pectina de la manzana tiene la característica de alta metilación (Doesburg, 1964), lo que hace evidente que éstas juegan un rol significativo en las propiedades de sorpción.

No obstante, esta característica señalada se observa en los resultados una ausencia de ganancia de agua a lo largo del almacenamiento. Este comportamiento estaría relacionado con las características del empaque empleado y su buena propiedad de barrera al vapor de agua (MVTR (Moisture vapor transmission rate)=0.0006 g/100²in/24 hrs). Konopacka et al. (2002) señalan la necesidad de una selección cuidadosa del material de empaque con baja permeabilidad al vapor de agua y recomiendan materiales de tipo laminados de aluminio para evitar la ganancia de agua durante el almacenamiento. El empaque empleado en esta investigación fue un film constituido por tres materiales laminados: 12 μm Pet, 12 μm Pet metalizado, 10 μm PE, sellados herméticamente, al parecer esta conformación estaría asegurando una buena barrera.

Respecto al contenido de agua se ha publicado que contenidos de humedad por debajo de 1% aseguran una vida útil a largo plazo (Nakamura, 1996). En otro estudio, se observó una buena estabilidad durante almacenamiento de

Lactobacillus secados por atomización hasta un contenido de 4% (Gardiner et al., 2000; Corcoran et al., 2004). Algunas matrices que contienen el probiótico con un contenido mayor a 4% presentan problemas que afectan la estabilidad de los mismos, por ejemplo, en probióticos encapsulados con leche descremada reconstituida, dependiendo de la temperatura, la lactosa puede cristalizar durante el almacenamiento, resultando en reacciones de pardeamiento y la formación de especies radicales que son perjudiciales para la viabilidad celular (Jouppila y Roos, 1994; Thomsen et al., 2005; Kurtmann et al., 2009 y Kurtmann et al., 2009). Zayed y Roos (2004) señalan que el contenido de humedad óptimo para el almacenamiento de *L. salivarius* subsp. *salivarius* liofilizado está en el rango de 2.8 a 5.6%.

Las investigaciones explican que la pérdida de viabilidad de las bacterias ácido lácticas bajo niveles altos de humedad se debe al incremento de la velocidad de las reacciones de oxidación e hidrólisis enzimática durante almacenamiento. De acuerdo a Fennema (1996), el proceso de oxidación depende del nivel de humedad y es reducido siempre que se encuentra en el valor de la monocapa de BET. La cantidad de humedad en exceso de la monocapa resulta en incremento de la oxidación de los microorganismos y en consecuencia pérdida de su viabilidad (Fennema, 1996; Kurtman et al., 2009). Aceleración de la oxidación ocurre a través del incremento en la solubilidad del oxígeno e hinchamiento de las macromoléculas, que exponen más sitios catalíticos. De acuerdo a Maness et al. (1999) la membrana de las células bacterianas está constituida por fosfolípidos poliinsaturados que son susceptibles a la oxidación por ataque de especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente a la oxidación, la ganancia en agua favorece la acción hidrolítica enzimática (Fennema, 1996). Teixeira et al. (1996) observaron que después del almacenamiento de células secas de *L. bulgaricus* la proporción entre ácidos grasos insaturados/saturados de los lípidos de la membrana disminuyó considerablemente, siendo evidencia del daño causado por oxidación lipídica. Esta oxidación puede resultar en algún cambio en las funciones y estructura de la membrana. El incremento en la proporción de ácidos grasos saturados ocasiona un incremento en la

temperatura de transición y en consecuencia conduce a una reducción en la fluidez de la membrana hasta una cierta temperatura y un incremento de fugas a través de la membrana durante la rehidratación. Además de esto, es conocido que un número de oxidantes biológicos resulta en la formación de radicales libres y que aquellos pueden reducir la hidrofobicidad de los ácidos grasos debido a la introducción de grupos hidrofílicos y así debilitan la interacción hidrofóbica con las proteínas de la membrana lo cual puede ser esencial para su actividad (Santivarangkna et al., 2008).

Por consiguiente, bajo los niveles reportados por las referencias como convenientes, la humedad de las muestras de manzana seca (SAC) (11.8%) sería uno de los factores que afectarían la viabilidad del probiótico en el producto a lo largo del almacenamiento.

Otros autores señalan que más importante que el contenido de humedad es la actividad de agua la que estaría implicada en la viabilidad del probiótico.

Mattila–Sandholm et al. (2002) mencionan otros factores como: la matriz que contiene el probiótico (composición, humedad, actividad de agua), el tipo de empaque y el medio de almacenamiento (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, contenido de oxígeno, y la exposición a la luz, entre otros) que tienen influencia significativa en la supervivencia de los probióticos. En las siguientes líneas se analizará la influencia que ha tenido algunos de estos parámetros en los resultados de supervivencia del probiótico así como en los cambios de las propiedades funcionales del aperitivo desarrollado.

Las referencias parecen coincidir que cuanto menor es la actividad del agua, mejor es la estabilidad del microorganismo probiótico en un alimento deshidratado (Vesterlund et al., 2012), asimismo, la susceptibilidad parece depender del tipo de microorganismo y el nivel de temperatura de almacenamiento. Algunos autores reportan que la estabilidad de las bacterias ácido lácticas deshidratadas generalmente se considera óptima bajo niveles de

aw que van desde 0.1 a 0.2 (Champagne et al., 1996; Teixeira et al., 1995). Abe et al. (2009) no observaron disminución significativa en la viabilidad de las células liofilizadas de *B. longum* a aw de 0.04, 0.10, 0.16, 0.21, 0.32, 0.40 después de 30 meses de almacenamiento a 5°C, Sin embargo, la aw más baja resultó en una mejor estabilidad cuando se ensayó una temperatura de almacenamiento de 37°C, constantes de velocidad de inactivación fueron de 11.0 y 0.015 log UFC/ g por mes para células deshidratadas con aw de 0.56 y 0.04, respectivamente. Otros recomiendan almacenamiento a temperatura ambiente a muy baja aw como 0.07 y 0.1 (Mugnier y Jung, 1985; Higk et al., 2007; Kurtmann et al., 2009). Kearney et al. (2009) declararon que un contenido de agua residual de 4% (p/p) correspondiente a aw de 0.2 es requerido para extender la vida útil de bacterias probióticas en yogurt deshidratado. La supervivencia de *Lactobacillus paracasei* spp *paracasei* liofilizado en una matriz de lactosa fue más alta bajo almacenamiento a 20°C y a aw de 0.07 por 30 días mientras que la estabilidad bacteriana durante almacenamiento a aw de 0.23 fue muy baja. Otros reportan que la supervivencia celular se ve particularmente afectada cuando el alimento tiene una actividad del agua mayor a 0.25 debido a un aumento del metabolismo bacterial (Fy y Chen, 2011; Albadran et al., 2015; Weinbreck et al., 2010).

Nualkaekul et al. (2011) estudió la supervivencia de células de *Lactobacillus plantarum* en refrescos en polvo de frutas almacenadas, concluyendo que niveles de aw entre 0.1 y 0.3 son valores favorables para la estabilidad del microorganismo. Intervalo similar de actividad del agua (0.1 a 0.214) son reportados por Passot et al. (2012) para *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 liofilizado, dando como explicación que es posible que a estos niveles el agua interaccione con los grupos funcionales y bloquee los sitios de reacción, evitando así las reacciones de oxidación que generan la degradación de lípidos y proteínas del probiótico.

En la presente investigación la actividad de agua obtenida para la manzana SAC supera los valores reportados por estas referencias para los diferentes

probióticos y condiciones de almacenamiento lo que explicaría que después de 15 días de almacenamiento no se detectaron células viables de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063.

Dado el resultado que anula el carácter probiótico del aperitivo, en las siguientes líneas se analizará el efecto de los diversos factores y las probables reacciones que explicarían este resultado.

Un número de intentos se han hecho para mejorar la viabilidad de los probióticos en diferentes productos alimenticios durante su producción hasta el momento del consumo a partir de la identificación y el estudio de los factores que influyen en la viabilidad de los microorganismos probióticos durante su producción, procesamiento y almacenamiento. Los factores identificados incluyen parámetros alimentarios (pH, acidez titulable, oxígeno molecular, actividad de agua, presencia de sal, azúcar y productos químicos como el peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, saborizantes artificiales y colorantes); parámetros de procesamiento (tratamiento de calor, la temperatura de incubación, tasas de enfriamiento del producto, materiales de embalaje y métodos de almacenamiento y la escala de la producción); y los parámetros microbiológicos (cepas de probióticos, cantidad de inóculo).

Ha sido demostrado que los factores principales que inciden en la supervivencia de bacterias deshidratadas durante su almacenamiento son: temperatura (Strasser et al., 2009), aw (Yin et al., 2010) y contenido de oxígeno (Chavez y Ledebor, 2007; Wang et al., 2004). Con respecto al efecto de la temperatura, se ha reportado que temperaturas elevadas de almacenamiento correlacionan con una más alta declinación de la viabilidad celular (Strasser et al., 2009; Teixeira et al., 1995) lo cual puede ser debido a una alta velocidad de oxidación de lípidos y desnaturalización proteica (Fu y Chen 2011; Kurtmann et al., 2009). Por otro lado, niveles de temperaturas tan bajos encarecen el proceso y dificultan su comercialización y distribución por la necesidad del mantenimiento de la cadena de frío.

Numerosas investigaciones coinciden en indicar que el contenido de oxígeno y el potencial redox se encuentran entre los factores que mayor efecto tienen sobre la viabilidad de los probióticos especialmente durante el periodo de almacenamiento (Lee y Salminen, 2009). El oxígeno molecular es perjudicial para la supervivencia y crecimiento de probióticos dado que la mayoría de las especies son estrictamente anaeróbicas (De Vuyst, 2000; Holzapfel et al., 2001). El oxígeno puede afectar al microorganismo de tres maneras: a) es directamente tóxico para algunas células; b) ciertos cultivos producen en presencia de oxígeno peróxidos tóxicos y c) los radicales libres producidos de la oxidación de componentes (por ejemplo grasas) son tóxicos a las células del microorganismo (Korbekandi et al., 2011). El nivel de oxígeno dentro del empaque durante el almacenamiento debe ser tan bajo como sea posible a fin de evitar toxicidad y muerte de los microorganismos y la consecuente pérdida de funcionalidad del producto.

Los procesos de oxidación que se producen durante el almacenamiento pueden causar daño a la pared celular, la membrana y el ADN que conducirían a la muerte celular. Las tasas de la reacción de oxidación están fuertemente influenciados por el contenido de humedad, la actividad del agua, la temperatura y, obviamente, la presencia de oxígeno. La adición de antioxidantes o eliminadores de radicales libres tales como el ácido ascórbico en cierta medida puede prevenir el daño causado por el estrés oxidativo (Teixeira et al., 1995; Kurtmann et al., 2009), del mismo modo que almacenamiento bajo vacío con actividades de agua controlada también parecen ser efectivos (Teixeira et al., 1995).

Teixeira et al. (1996) observaron que después del almacenamiento de células deshidratadas de *L. bulgaricus* la proporción ácidos grasos insaturados/saturados de los lípidos de la membrana disminuyó considerablemente, siendo evidencia del daño causado por oxidación lipídica y

responsable de la muerte celular durante el almacenamiento (Teixeira, Castro, y Kirby, 1996).

Tanto como el concepto de actividad de agua, la transición vítrea es un término también determinante para la supervivencia bacteriana durante almacenamiento (Vesterlund et al., 2012). Mientras la actividad de agua determina la accesibilidad de agua para reacciones químicas o el crecimiento microbiano (Roos, 1995), la transición vítrea indica un cambio físico en un material amorfo promovido además del calor por la presencia de sustancias de bajo peso molecular (Bell y Hageman, 1994). Rahman (2010) sugirió que ambos conceptos a_w y transición vítrea son útiles para determinar el deterioro de alimentos o su estabilidad y también para predecir la vida en anaquel de productos alimenticios durante almacenamiento.

El término amorfo es usado para denotar un sistema desordenado comparado con un sólido cristalino con un alto grado de ordenamiento (Liu et al., 2006). Los productos secos son a menudo materiales amorfos que existen en estado vítreo bajo su temperatura de transición vítrea (T_g) y en estado gomoso a temperaturas más altas a T_g (Corey et al., 2011). Un material vítreo tiene propiedades como el líquido y una viscosidad de aproximadamente 10^{12} Pa.s parecido a un sólido (Hancock, 1997), lo cual ralentiza las reacciones químicas tales como oxidación por radicales libres en comparación con el estado cristalino. Como resultado un estado vitreo es considerado capaz de limitar daño celular en el estado seco y por lo tanto provee protección adicional a las células microbianas (Crowe et al., 1998).

Cuando la temperatura aumenta por encima de T_g , varios cambios se presentan tales como: aumento de volumen libre y el calor específico, así como disminución de la viscosidad. Estos factores controlan varias transformaciones estructurales que dependen del tiempo, como la rigidez, el colapso y la cristalización durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos. El producto puede ser no perecedero cuando se almacena por debajo de la temperatura de transición

vítrea debido a que el deterioro causado por el crecimiento microbiano y las reacciones químicas se reducen considerablemente (Roos y Karel, 1991).

El "atrapamiento" de un sistema vivo en una matriz después de la deshidratación se sugirió ser responsable de su estabilidad a largo plazo (Bruni y Leopold, 1991; Sun & Leopold, 1997). Una estructura vítrea de la matriz externa es una barrera ambiental altamente eficaz, con una movilidad molecular extremadamente baja. Con respecto a la preservación de las bacterias, esta condición conduce a una supresión de eventos de deterioro en la membrana bacteriana, al constituirse la interfaz con el entorno y que protege de abusos ambientales diversos. Desde que la difusión se restringe drásticamente en el estado vítreo, la difusión del oxígeno, que precede al daño oxidativo (Andersen, Niebla-Petersen, Larsen, y Skibsted, 1999), y las reacciones químicas que requieren difusión (Sun & Leopold, 1997), podrían probablemente ser limitadas. Otros eventos de degradación tales como la fusión de membranas y desplegamiento de la proteína también podrían prevenirse (Crowe et al., 1998).

Welti-Chanes et al. (1998) determinaron la temperatura de transición vítrea para manzana Granny Smith a a_w 0.436/ 30°C/humedad 10.8 g/100g m.s igual a T_{go} -39.4°C, señalando que esta propiedad en la manzana es el resultado del azúcar presente después de la remoción de agua y que los sólidos no solubles no presentan efecto sobre el valor de T_g . Sá et al. (1999) determinaron un valor de T_g de -30.3°C en la variedad de manzana Golden delicious liofilizada a a_w 0.44. Corey et al. (2011) reportan para manzana a a_w 0.56 y humedad 14.95 g/100 g un T_{go} -38.76 °C.

Estos valores publicados podrían servir de referencia e indicarían que bajo la temperatura de almacenamiento de 25°C el aperitivo desarrollado no se encuentra en estado vítreo lo cual lo haría susceptible a ciertas reacciones de deterioro, en mayor o menor medida según otros factores interactúen.

Roos (2010) menciona que alimentos que tienen como principales componentes: azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) en altas concentraciones y macromoléculas como las frutas no siempre entran en el estado vítreo en condiciones normales de deshidratación o de almacenamiento exhibiendo una apariencia semisólida o como-sólido, resultado del secado por aire y es típico de numerosas frutas secas (manzana, albaricoques, dátiles pasas).

En general, la estabilidad de las células probióticas secas se ve afectada por muchos factores que están fuertemente acoplados. Sin embargo, la combinación de las siguientes condiciones es necesaria para la estabilidad óptima: $a_w < 0,3$; contenido de humedad $< 4\%$, temperatura $< 4^\circ \text{C}$ y la presencia de antioxidantes. La microencapsulación también puede ayudar a preservar la viabilidad de las células secas durante el almacenamiento según el material que conforma la matriz.

No obstante la pérdida de viabilidad del probiótico en el aperitivo durante las primeras semanas del almacenamiento, existe algunos estudios que están revelando que células bacterianas muertas y sus metabolitos pueden ofrecer efectos beneficiosos a lo que están llamando la *paradoja probiótica*, la que postula que ambas células vivas y muertas en productos probióticos pueden generar respuestas biológicas beneficiosas, por lo que la acción de los probióticos podría ser dual. Células de probióticos vivos influyen en ambos: microflora gastrointestinal y la respuesta inmune mientras los componentes de células muertas ejercen una respuesta antiinflamatoria en el tracto gastrointestinal (Adams, 2010). Otros estudios respaldan esta respuesta por ejemplo *Lactobacillus* muertos han mostrado inhibir la adherencia de patógenos gastrointestinales a células epiteliales (Cononnier et al., 1993). Células muertas pueden estimular el sistema inmune (Kanasugi et al., 1997), la administración oral de preparaciones de pared celular estimula el sistema inmune intestinal (Sakai et al., 2006). *Lactobacillus rhamnosus* vivos y tratados por calor han mostrado ser efectivos en reducir la respuesta inflamatoria en el tejido

gastrointestinal (Li et al., 2009). *Bifidobacterium* muertos por calor fueron efectivos contra colitis ulcerosa (Imaoka et al., 2008).

El uso de microorganismos no viables está atrayendo mucho la atención dentro de los procesadores de alimentos porque ellos tienen ciertas ventajas sobre los probióticos vivos. Por ejemplo, los probióticos tienen una limitada vida en anaquel y frecuentemente y especialmente en productos con alta aw requiere condiciones de almacenaje refrigeradas. Los microorganismos no viables no tienen esta limitación. Comparado con las investigaciones conducidas con probióticos el estudio de microorganismos no viables se encuentra todavía en sus inicios (Makinen et al., 2012).

Tabla 5. 23 Evolución de las coordenadas de color L*, a*, b* y de las magnitudes tono (h*ab) y croma (C*ab), en función del tiempo de almacenamiento. Diferencias de color (ΔE) respecto a la muestra inicial (tiempo 0).

Tiempo (días)	L*	a*	b*	h*ab	C*ab	ΔE
0	60±3 ¹ b	7.5±0.4)a	37.9±1.4b	78.9±0.7b	38.8±1.4b	-
15	67±3c	7.3±1.4)a	41.7±1.4c	80±2b	42.3±1.6c	0.28±0.15a
30	64 ±4c	7.4±1.4)a	39.7±0.6bc	80±2b	40.4±0.8b	0.31±0.17a
78	57±3ab	10.9±1.1b	38.2 ±1.4b	74±2a	39.8±1.4bc	0.51±0.27b
90	55±3a	10.5±1.2b	34.2 ±1.4a	73±2a	35.9±1.4a	0.47±0.26b
120	58±3ab	11.4±0.8b	37.5±3.8b	73±1,07a	39±4b	0.55±0.22b
150	57.6±0,3a b	11.9 ±0.4b	37.5±1.12b	72.3±0.3a	39.4±1.2b	0.61±0.24b

¹ Desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$)

El color y la textura de un producto son los parámetros de calidad más importantes a tener en cuenta en el desarrollo del mismo, por jugar un papel decisivo en la aceptación final por parte del consumidor. En la tabla 5.23 se

muestra la evolución de las propiedades ópticas medidas en la manzana seca (SAC) durante el almacenamiento.

Se observó la disminución de la luminosidad (L^*) y también un ligero incremento de las coloraciones rojizas, pardas y amarillas relacionado con un aumento de las coordenadas cromáticas a^* y b^* . Con respecto al tono (h^*ab) se observó un leve descenso a partir de los 30 días, disminución que indica una evolución hacia coloraciones amarillo-rojizas ($<90^\circ$). Estos cambios pueden atribuirse a reacciones de pardeamiento enzimático, asociado a la presencia de polifenoles, como el ácido clorogénico, uno de los sustratos más importantes de la enzima polifenoloxidasa (PPO), que en presencia de oxígeno se convierte en o-quinona, la cual reacciona con otros compuestos fenólicos, dando como resultado la formación de pigmentos de color amarillo y marrón (Khanizadeh et al., 2008). En el caso del croma (C^*ab), se evidenció una variación en intervalos pequeños, asociado a la variabilidad de las muestras. No obstante, se puede afirmar que al final del tiempo de almacenamiento presentó valores similares al inicial, y por lo tanto no se estableció una evolución de la saturación del color muy marcada.

También puede haber una contribución de un pardeamiento de tipo no enzimático (oxidación de carotenoides y reacciones de Maillard) tal como parecen señalar los resultados encontrados por Acevedo et al. (2008) al estudiar los cambios en la microestructura, físicos químicos y el color durante almacenamiento de hojuelas de manzana deshidratadas bajo vacío 25 pulgHg a 50°C por 4 horas y observar cambios del color aún en muestras que habían recibido un tratamiento químico por inmersión en solución de 1% de ácido ascórbico para inactivación enzimática antes del secado.

Entre las reacciones de oscurecimiento no enzimático se encuentra la reacción de Maillard que se verifica en matrices calentadas, secas y almacenadas (Fay et al., 2005; Kaanane et al., 1989), así como en frutas de humedad intermedia. Estas reacciones puede ser usadas como un indicador de la ocurrencia de otras reacciones químicas controladas por difusión. Es una reacción química de

condensación entre componentes aminos y carbonilos para producir una glicosilamina, la cual luego reacciona para formar una base Schiff o producto Amadori. A $\text{pH} < 5$ pueden ocurrir reacciones de polimerización formando melanoidinas que poseen un color marrón. Desde que la manzana tiene un alto contenido de azúcares reductores este tipo de reacciones puede ocurrir. Además de disponibilidad y concentración de reactantes, la reacción de Maillard es también catalizada por iones metálicos libres. Componentes monoméricos o poliméricos de flavan 3-ol, tales como los encontrados en manzana pueden también quelar e inhibir esta reacción. A bajas condiciones de humedad ($a_w \sim 0.1-0.4$) la velocidad de la reacción de Maillard procede a una velocidad relativamente lenta, pero procede más rápidamente a condiciones de humedad intermedia ($a_w \sim 0.6-0.8$). A bajas humedades la concentración de reactantes es muy alta pero la movilidad del soluto es limitada debido a la limitada hidratación. A altos niveles de humedad la disponibilidad de agua para la hidratación de reactantes es suficiente para incrementar las velocidades de reacción y puede mejorar la solubilidad de los reactantes. A aún más altos niveles de humedad un efecto de dilución en reactantes ocurre (Bell, 2007). El oscurecimiento no enzimático es una reacción controlada por difusión por lo que se piensa que la humedad mejora la habilidad de los reactantes para difundirse e interactuar (Corey et al., 2011).

La cinética de estas reacciones son afectadas por la concentración de reactantes, naturaleza química de los reactantes, pH, HR, temperatura y tiempo de calentamiento (Kaanane et al., 1989). Máximo oscurecimiento ha sido observado en la mayoría de los casos a actividades de agua 0.3-0.7 (Maltini et al., 2003).

Bajo el valor de actividad de agua del alimento desarrollado este encuentra en el límite de alimentos de humedad intermedia. Niveles de actividad intermedia son particularmente críticas para estabilidad de productos, desde que contenido de humedad es suficiente para permitir la ocurrencia de reacciones de Maillard y oxidación (Brennan, 1994). La velocidad de oscurecimiento no enzimático es alto

en alimentos deshidratados , debido a elevada concentración de reactivos con máximo valor en alimentos de humedad intermedia con niveles de actividad de agua entre 0.5 y 0.8. Bajo 0.5 la reacción es limitada por baja movilidad de los reactantes, mientras que arriba de 0.8 la velocidad de oscurecimiento decrece con el incremento de la actividad de agua debido al efecto de dilución (Vaikousi et al., 2008). Asimismo, un incremento de a_w arriba de 0.3 incrementa la velocidad de la degradación antioxidante en manzanas (Lavelli & Vantaggi, 2009)

Para evaluar globalmente el efecto sobre el color durante el almacenamiento se calculó la diferencia de color (ΔE) con respecto a las muestras de manzana secas (SAC). Los resultados mostraron un cambio significativo a los 30 días de almacenamiento y a partir de este tiempo, permaneció con valores constantes. Sin embargo, las diferencias de color establecidas son muy pequeñas (<2) e imperceptibles a simple vista (Lee y Coates, 2003). Nuevamente el empaque parece estar ejerciendo un efecto protector al evitar la exposición a la luz y limitando la migración de oxígeno y agua a niveles que no afectan estas características ópticas de manera significativa.

La evolución de las propiedades mecánicas durante el almacenamiento se muestra en la tabla 5.24.

Durante todo el tiempo de almacenamiento las curvas de fuerza-distancia obtenidas (no mostradas) desarrollaron un comportamiento viscoelástico previo a la fractura con una gran deformación, lo cual podría estar relacionado con un probable estado gomoso alcanzado al final del proceso de secado y mantenido durante el almacenamiento. No obstante, se evidenció una tendencia a la disminución de la fuerza, fluctuaciones que pueden estar asociadas a la redistribución del agua en el interior del producto.

Tabla 5. 24 Evolución de las propiedades mecánicas: Fuerza máxima (N), distancia (mm) y área (N·mm) de las muestras secas (SAC), en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	F _{máx} (N)	Distancia(mm)	Área (N·mm)
0	13.8±0.2 ¹ d	5.2±0.3a	22.9±1.1c
15	14.1±0.6d	7.5±0.3b	25.5±1.6d
30	11.8 ±0.7c	5.6±0.3bc	21.4±1.1c
78	10.7±0.8b	6.1±0.4d	18.1±1.1b
90	11.8±0.2c	5.8±0.2c	18.2±0.6b
120	8.9±0.3a	5.7±0.6c	13.7±1.0a
150	11.2±0.9b	5.3±0.3ab	16.4±1.2b

1 Desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0.05)

Para alimentos secos tipo aperitivo (aw bajo 0.25) la crujencia es una propiedad sensorial deseable, y su pérdida debido a la absorción de agua limita la aceptabilidad del consumidor. Para alimentos de humedad intermedia (aw en el rango entre 0.25 y 0.75) la textura del alimento es firme y flexible (Brennan, 1994).

El contenido de humedad y actividad de agua afectan significativamente propiedades de textura de hojuelas de manzana. Konopacka et al. (2002) demostraron que hojuelas de manzana deshidratadas a niveles de actividades de agua bajo 0.12 presentan excelente crujencia y la mayor aceptabilidad dentro de los productos de este tipo. Los mismos autores reportaron un nivel de actividad de agua crítico de 0.18 y que corresponde a un contenido de humedad de 3.5 g de agua/100 g de sólidos donde la matriz se torna de crujiente y

susceptible a quebrarse a plástica y con mayor energía necesaria para provocar la fractura, este nivel crítico es mucho más bajo que otros tipos de aperitivos crujientes cuya composición está basado principalmente en mezclas de almidón/proteína (a_w 0.35-0.50).

La dureza (fractura) de productos alimenticios secos es un fenómeno complejo que depende en gran medida del material en sí mismo, el efecto plastificante del agua, así como de la presencia y propagación de grietas microscópicas inducidas por el procesamiento (Castro y Aguilera, 2007). La pared de las células deshidratadas es el material que proporciona integridad estructural y resistencia mecánica a las hojuelas de manzana deshidratadas. Debido a la contracción que de normal presentan las muestras deshidratadas por aire caliente éstas son más densas que las muestras frescas por lo que es de esperara una mayor fuerza de fractura. En los resultados de la presente investigación, mientras la fuerza máxima de fractura para manzana fresca fue del nivel de 3.71 N, las muestras secas presentaron un valor de 13.8 N. Se ha reportado que a medida que aumenta el contenido de agua durante almacenamiento el agua plastifica las paredes celulares y el material que era más frágil se vuelve más suave y más flexible, por lo tanto disminuye la dureza. Dado que el contenido de agua es constante durante el almacenamiento y la a_w más o menos sigue esa tendencia es evidente que algunas otras reacciones, probablemente de tipo químicas, han contribuido a la disminución de la dureza. Los resultados coinciden a los reportados por Rizzolo et al. (2011) quienes estudiaron las características de calidad de hojuelas de manzana deshidratados así como la influencia del secado y el estado de madurez sobre la evolución de estas características en el almacenamiento. Ellos reportan un descenso de la fuerza máxima de 10.22 a 4.57 N después de 5 meses de almacenamiento y un descenso de la energía de 17.08 a 7.31 mJ.

La evolución en el contenido de compuestos funcionales y la actividad antiradical durante el almacenamiento se presenta en la tabla 5.25.

Tabla 5. 25 Evolución de los compuestos funcionales: ácido L-ascórbico, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, hesperidina y oligofruktosa en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo (días)	L-ácido ascórbico mg/100g	Compuestos Fenólicos Totales mg GAE ² /100g	Actividad Antioxidante		Hesperidina mg/100g	Oligofruktosa g/100g
			DPPH ³	ABTS ⁴		
0	8.34±0.9 ¹ d	549±19c	675±7d	4263±418c	41.8±2.3b	3.7±0.3a
15	6.89±0.3c	515±10c	626±16cd	4775±124c	-	3.9±0.5a
30	6.85±1.0c	548±31c	579±5bc	4684±201c	40.3±1.6b	3.6±0.3a
78	2.68±0.3b	533±50c	609±23cd	3422±100b	37.4±1.9a	3.6±0.5a
90	3.03±0.2b	545±20c	626±34cd	3105±72b	40.3±0.4b	3.4±0.3a
120	2.01±0.5a	457±24b	544±39b	3448±426b	40.2±1.12b	3.6±0.5a
150	1.53±0.5a	387±24a	417±49a	2437±572a	39.7±1.23ab	3.5±0.3a

¹Desviación estándar.

Promedios con diferentes letras en la misma columna fueron significativamente diferentes (p<0,05)

²Acido gálico equivalente (GAE), ³Método del radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), expresados como mg de ácido ascórbico equivalente por 100 g de producto seco, ⁴Método del radical catión 2,2' ácido azinobis-3-etil- benzotiazolin-6- sulfónico (ABTS+), expresados como µM trolox por 100g producto seco

Nuevamente el nivel de la actividad de agua dentro de otros factores, estaría cumpliendo un papel importante en la evolución del contenido de los compuestos funcionales evaluados, al propiciar reacciones de deterioro durante el almacenamiento. De acuerdo a Moraga et al. (2012) valores más bajos que 0.210 puede reducir la velocidad de las reacciones de deterioro de componentes bioactivos (ácidos orgánicos, vitamina C, principales flavonoides y fenoles totales) durante almacenaje de harina de pomelo.

Respecto al contenido de ácido ascórbico se presenta un descenso drástico al final del almacenamiento con una pérdida del 81.6% de su contenido inicial. Es reconocido que el ácido L-ascórbico es el compuesto más lábil y que se oxida con mayor rapidez, por esta razón su pérdida provee un índice útil de deterioro oxidativo y es por lo tanto usado para definir el tiempo de vida útil de frutas y vegetales mínimamente procesados y en jugos de frutas (Perera, 2007; Polydera et al., 2003).

Kirk et al. (1997) en un estudio de la degradación del ácido ascórbico en sistemas alimenticios deshidratados señalan que la velocidad de destrucción del ácido ascórbico se incrementa dramáticamente con la presencia de oxígeno.

Corey et al. (2011) señalan que la pérdida de ácido ascórbico en manzanas liofilizadas durante almacenamiento a 30°C se incrementa particularmente a a_w por encima de 0.324. Otros factores que contribuyen a la degradación del ácido ascórbico son compuestos oxidantes, iones metálicos libres como catalizadores y los mayores contenidos de humedad (Bell, 2007).

La tasa de degradación de ácido ascórbico depende de condiciones ambientales tales como: temperatura, O_2 , luz, etc. y factores intrínsecos como a_w , iones de metales pesados, que en un efecto combinado modifican su cinética de degradación y disminuyen su actividad biológica (Timoumi et al., 2007; Perera, 2007).

El mecanismo de la reacción de descomposición del ácido ascórbico en los alimentos se ha estudiado ampliamente (Archer y Tannenbaum, 1979; Liao y Seib, 1987). Debe hacerse hincapié en que existen diferentes vías, que dan origen a diferentes productos de degradación. Dado que diferentes factores influyen en la cinética de degradación de la vitamina C es difícil establecer una relación precisa precursor-producto dado que varios mecanismos de deterioro podría funcionar simultáneamente (Uddin et al., 2002).

Se han reportado pérdidas similares en productos a partir de manzana, Keenan et al. (2011) durante almacenamiento de puré de manzana de Granny Smith a 5°C por 21 días tratado térmicamente por un proceso de pasteurización convencional y bajo altas presiones hidrostáticas (400, 600 MPa) encontraron pérdidas significativas alrededor de 79% en el puré tratado por pasteurización y alrededor de 97 y 94.5% para los tratamientos a altas presiones (400-600 MPa respectivamente). Este deterioro fue explicado en un primer paso por la oxidación de ácido ascórbico a ácido dihidroascórbico, el cual es luego irreversiblemente convertido en ácido 2,3 dicetogulónico (Davey et al., 2000; Perera, 2007).

En un estudio conducido por Corey et al. (2011) la tasa de pérdida de ácido L-ascórbico aumentó con una actividad del agua superior a 0.324, estando este valor debajo de la actividad de agua del aperitivo (0.449) y explicaría el descenso significativo de su contenido al final del almacenamiento.

Respecto al contenido de compuestos fenólicos como se observa en la tabla 5.25, hay un descenso significativo a partir de los 120 y 150 días con una pérdida al final del periodo de almacenamiento de 29.5%. Los componentes fenólicos son importantes constituyentes porque son los responsables de características sensoriales en los alimentos como: color, astringencia, amargor. Además, ellos son unos de los antioxidantes más abundantes de la dieta. Estos fitoquímicos son metabolitos secundarios, y su estructura consiste de diversos grupos hidroxilos unidos a grupos aromáticos. La degradación polifenólica depende de

algunos factores como temperatura y actividad oxidativa, contenido de ácidos orgánicos, concentración de azúcar, pH, exposición a la luz y oxidación por presencia de aire entre otros (Sant'Anna et al., 2013). Por ende los productos finales de degradación pueden provenir de diferentes mecanismos y algunos de ellos contribuyen con cambios de color y cambios de las propiedades nutraceuticas. Se ha reportado que el descenso del contenido de polifenoles está también correlacionado con su capacidad de actuar como reactivo en la formación de productos de la reacción de Maillard (del Caro et al., 2004).

En un estudio conducido por Lavelli y Vantaggi (2009) obtienen interesantes conclusiones respecto al efecto de la a_w de agua sobre los componentes antioxidantes de manzana deshidratada, señalan que a niveles bajos de a_w (0.058) el contenido de catequina, epicatequina y ácido ascórbico decrece mientras que los otros componentes permanecen estables durante 76 días a 40°C, siendo el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para el ácido ascórbico y epicatequina de 49 y 83 días respectivamente. En un rango de a_w 0.075-0.316, todos los antioxidantes se degradaron a excepción del ácido clorogénico que permaneció estable, para ácido ascórbico y epicatequina $t_{1/2}$ fue de 40 y 14 días respectivamente mientras que en las procianidinas $t_{1/2}$ decrecieron de 101 a 38 días, las dihidrochalconas y derivados del ácido p-coumárico tuvieron $t_{1/2}$ de 200 días. A a_w por encima de 0.316, la velocidad de degradación de los antioxidantes se incrementó, a a_w 0.532 la degradación de todos los antioxidantes es muy rápida siendo el $t_{1/2}$ fue de únicamente 9 días. La razón podría ser que diferentes componentes tienen diferente reactividad hacia el oxígeno y diferentes roles en las reacciones de Maillard en los sistemas deshidratados (Brennan, 1994).

Totlani y Peterson (2006, 2007) sugieren que epicatequina interactúa con componentes carbonilos reactivos que son precursores transitorios de la reacción de Maillard, asimismo se ha reportado que epicatequina es degradada por PPO (Murata et al., 2001; Son et al., 2001).

Otro estudio de estabilidad de puré de manzana almacenado en frascos cerrados por 6 meses a 30°C procianidina, ácido clorogénico y floretina 2'-O'- glicósido disminuyeron en 49.5, 26 y 18% respectivamente (Oszmianski et al., 2008) por lo que otras reacciones que no involucran oxígeno podrían estar implicados con los descensos.

Igual comportamiento que los compuestos fenólicos se observa en la evolución de la capacidad antioxidante evaluada por tres métodos. Oszmiański et al. (2008) indicaron que las diferencias en las actividades antioxidantes de las frutas podrían estar relacionadas con los diferentes perfiles de los ácidos fenólicos, compuestos flavonoides y derivados que los componen. Del mismo modo, Gorinstein et al. (2010) señalan una alta correlación entre el contenido de polifenoles en tres frutas exóticas y la capacidad antioxidante medida por los métodos de ABTS, DPPH y ensayos de FRAP. Estos resultados en conjunto sugieren que los compuestos fenólicos contribuyen a la capacidad antioxidante de estos alimentos, aunque la contribución no sólo se debe a los flavonoides, sino presumiblemente a la presencia de compuestos fenólicos no flavonoides. La presente investigación ha utilizado estos métodos para evaluar la evolución de esta propiedad funcional durante almacenamiento y cuyos resultados se presentan en la tabla 5.25. La correlación reportada por Gorinstein et al., (2010) explica que la actividad antioxidante sigue el mismo comportamiento descendiente que los compuestos fenólicos. Según el método DPPH, la disminución en la actividad antioxidante es más acusada entre los 120 y 150 días. Por otra parte, se observó un descenso significativo de la capacidad antioxidante por el método ABTS a partir de los 78 días de almacenamiento, presentándose un nuevo descenso a los 150 días. Floegel et al. (2011) reportaron una fuerte correlación positiva entre el método ABTS y ensayos de DPPH, relación que ha sido demostrada en otros estudios especialmente para el grupo de frutas. El ensayo ABTS es aplicable a sistemas antioxidantes hidrófilos como la vitamina C y lipófilos (Del Caro et al., 2004), en tanto que el ensayo de DPPH es aplicable a sistemas lipófilos. Esto explicaría que el método ABTS reporta un mayor descenso de la actividad antioxidante al estar directamente

influenciado por la pérdida de ácido L-ascórbico que desciende drásticamente frente al reportado por el DPPH.

Es importante resaltar que la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en las muestras almacenadas disminuyó a un ritmo lento, lo cual podría deberse al efecto protector del ácido L-ascórbico que ha sido proporcionado por el zumo de mandarina impregnado y el que se ha degradado más rápidamente, como se ha descrito en el estudio de Oszmiański et al., (2008) lo que representa una ventaja en la extensión de la vida útil de las manzanas SAC y de sus propiedades funcionales.

El tipo de empaque también está involucrado en el nivel de pérdida durante almacenamiento en la medida en que puede constituirse en una barrera al oxígeno. Henríquez et al. (2013) estudiaron el efecto protector de dos tipos de empaque (polietileno de alta densidad (HDPE) y film metalizado de alta barrera (MFHB) en la estabilidad durante almacenamiento de cáscara de manzana seca en polvo, observaron una disminución en compuestos fenólicos totales en ambos materiales de empaque estudiados independientemente de las condiciones de almacenaje (Temperatura, HR). En el producto almacenado a 38°C por 120 días la pérdida de fenólicos fue más alta cuando estuvo empacado en HDPE. MFHB fue hábil para mantener la mayoría de las propiedades antioxidantes. Al final del periodo de almacenaje la pérdida total de fenólicos fue de 52 y 64.6% para MFHB y HDPE respectivamente. Bajo condiciones convencionales de almacenaje después de 120 días la pérdida de compuestos fenólicos fue 15.4, 18.9, y 23.4 en las muestras empacadas en HDPE a 4, 10 y 25°C respectivamente, mientras en las muestras empacadas en MFHB las pérdidas fueron 13.8, 16.5 y 21.3 % respectivamente. En la presente investigación a la misma temperatura y el mismo tiempo la pérdida fue de 16.7%. el empaque seleccionado al parecer estaría ejerciendo un efecto protector como se ha señalado sus bajos valores de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno lo recomiendan como adecuado para el empaque de productos de tipo aperitivo.

Estos resultados indican que la pérdida de fenólicos en productos secos durante almacenamiento puede ser menor si el material de empaque y temperatura de almacenamiento son los adecuados. La disponibilidad de oxígeno para las reacciones de oxidación como el resultado de la permeabilidad al gas de los diferentes materiales de empaque puede ser determinante en la pérdida de fenólicos (Sacchetti et al., 2008).

El contenido de hesperidina en las muestras de manzana secas (SAC) permaneció estable durante el todo el periodo de almacenamiento, al igual que el contenido de oligofruktosa.

Algunos autores han reportado que inulina fácilmente se hidroliza bajo moderados condiciones de pH y temperatura (French y Waterhouse, 1993). En un estudio de almacenamiento de purés de manzana enriquecidos con prebióticos de tipo inulina y oligofruktosa (FOS) tratados térmicamente y a altas presiones hidrostáticas (HHP) fue monitoreado el nivel de fructanos durante 30 días a 4°C, los contenidos de fructanos a los 15 y 30 días fueron similares a los valores iniciales para ambos tratamientos: HHP (6.4, 6.2 y 6.1 /100g respectivamente) y tratamiento térmico (5.2, 5.2 y 4.9 g/100g respectivamente), similares resultados fueron observados en las enriquecidas por FOS que demuestra su estabilidad en esta matriz (Keenan et al., 2011) . Estos resultados fueron consistentes con otro estudio en manzana fresca cortada en rodajas conteniendo prebióticos comerciales, donde no fue reportado hidrólisis durante el almacenamiento (RoBle et al., 2010, Rossle et al., 2010). Por otro lado, Keenan et al., (2011) hacen una distinción entre la estabilidad de FOS e inulina frente a los tratamientos de HHP y térmico, los purés enriquecidos con inulina fueron menos estables que los que contienen FOS. Huebner et al. (2008) indican que la estabilidad de este tipo de prebióticos en respuesta a tratamientos de procesamiento es una función de su estructura individual.

Es preciso señalar que aunque no se ha hecho un seguimiento del contenido de componentes carotenoides, estos también estarían contribuyendo en las

modificaciones de las propiedades funcionales (actividad antioxidante) así como en el color. Las características estructurales que son responsables por sus propiedades antioxidantes hacen a este pigmento susceptible a degradación por agentes externos tales como calor, bajo pH oxígeno disuelto y exposición a la luz. La degradación de carotenoides conduce a una pérdida de color como el resultado de un reacomodo de la molécula y formación de isómeros cis, epóxidos, productos de cadena corta y en algunos casos compuestos volátiles (Mercandante, 2008).

Parte V

Conclusiones

Capítulo 6

6. Conclusiones

En la presente tesis doctoral se proponen dos desarrollos de aperitivos saludables, a partir de manzana con la aplicación de la técnica de impregnación a vacío y estabilización por secado con aire caliente. La selección de las materias primas bases: manzana y zumo de mandarina obedece a la reconocida riqueza funcional, al consumo generalizado y frecuente de las mismas, y la asociación de su consumo a la reducción del riesgo de padecer enfermedades crónicas. Asimismo, se ha empleado dos componentes funcionales: un prebiótico oligofructosa y un probiótico *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* componentes relacionados con la mejora del balance y la actividad del medio intestinal que potenciarían el contenido funcional de estas frutas y el enriquecimiento de la dieta a través de una presentación de tipo aperitivo.

En el desarrollo del primer aperitivo se demostró que la manzana puede ser enriquecida con prebióticos empleando soluciones acuosas cuya concentración puede variar para controlar el contenido incorporado y responder a requerimientos recomendados.

La deshidratación de las muestras impregnadas no implica una disminución en el contenido de oligofructosa manteniéndose estable a un pH inicial de 4,03 y

prolongados tratamientos de secado. La actividad de agua, el contenido de humedad, la matriz base así como el empaque empleado parecen ejercer un efecto protector sobre las propiedades funcionales del aperitivo manteniéndose a niveles aceptables después de 4 meses de almacenamiento.

En el segundo desarrollo el zumo de mandarina enriquecido con 0.5% de levadura de cerveza como fuente de proteína, 5% de oligofruktosa y una regulación del pH inicial a 6 se presenta como un medio adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. La incubación de zumo de mandarina con prebióticos permite desarrollar un líquido simbiótico con alto contenido de microorganismos beneficiosos y los efectos del proceso son mínimos en sus principales componentes funcionales.

El líquido puede utilizarse como vehículo para enriquecer frutas con componentes ajenos a su composición natural como la oligofruktosa y las flavanonas, así como aumento del contenido de componentes antioxidantes como el ácido ascórbico, potenciando el valor nutricional de esta fruta.

No obstante las numerosas ventajas de los productos enriquecidos con los compuestos bioactivos procedentes del líquido de impregnación surge el problema de grandes cantidades de materia orgánica que se produce después de la operación de impregnación. Teniendo en cuenta los aspectos medioambientales, esta investigación ha demostrado que es posible la reutilización del líquido de fermentación por 5 ciclos, manteniendo a niveles importantes los componentes funcionales. Los componentes que sufren el mayor cambio son los componentes oxidables.

Los componentes bioactivos del zumo de mandarina y los añadidos como parte de la formulación del líquido de impregnación (probióticos y prebióticos) han sido incorporados con éxito a la matriz estructural de la manzana a través de la impregnación a vacío.

Salvo el ácido L-ascórbico y el probiótico, caracterizados por su inestabilidad frente a altas temperatura y oxígeno, no se observó un efecto significativo en los otros componentes funcionales después de la estabilización por secado con aire caliente. En cualquier caso estos mantuvieron niveles importantes que aumentan la calidad funcional de la manzana fresca.

Los niveles de humedad y actividad del agua obtenida después del secado con aire caliente garantizaron la estabilidad microbiológica del producto, aunque estos factores parecen ser responsables de la pérdida del efecto probiótico en el almacenamiento y de la textura gomosa del producto.

Después de 150 días de almacenamiento a 25 °C, se observó un descenso del 81.6% en el contenido de ácido L-ascórbico, del 29,5% de compuestos fenólicos, del 42,9% y del 38,3% de la actividad antioxidante evaluada por los métodos ABTS y DPPH respectivamente. Por el contrario, la oligofructosa y la hesperidina mostraron una elevada estabilidad, presentando descensos del 6% y del 5%, respectivamente. Por tanto, se pone de manifiesto que el proceso de elaboración del snack permite mantener la mayoría de las características funcionales a niveles importantes, y el enriquecimiento con compuestos, que no se encuentran como fuente natural en el producto, y que contribuyen a mejorar su carácter funcional (hesperidina y oligofructosa).

Por otra parte, los niveles de ácido L-ascórbico se mantuvieron en concentraciones superiores con respecto a la manzana fresca hasta los 30 días de almacenamiento. Aunque las recomendaciones de consumo de vitamina C (60 mg) son mayores a los niveles que proporciona el snack, resulta útil mantenerlos debido a su efecto protector en las reacciones de oxidación que puedan presentarse.

El factor limitante en el desarrollo del producto está asociado a que la viabilidad del probiótico que solo se mantuvo en niveles adecuados hasta los 15 días de almacenamiento, resultados que introducen la necesidad de estudiar con más

profundidad la cinética de secado por aire caliente, con la finalidad de establecer el nivel crítico de actividad del agua. También es posible evaluar la implementación de nuevas herramientas tecnológicas en pro de mejorar las operaciones de procesamiento para el desarrollo de productos simbióticos con la calidad buscada, como por ejemplo el uso de microencapsulación, tratamientos previos de adaptación a condiciones de estrés, así como la evaluación de otros métodos de secado entre otros

Parte VI

Bibliografía

1. Abad-Garcia, B.; Berrueta, L.A.; Garmon-Lobato, S.; Urkaregi, A.; Gallo, B.; Vicente, F. Chemometric characterization of fruit juices from Spanish cultivars according to their phenolic compound contents: I. Citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3635-3644.
2. Abe, H.; Takaoka, Y.; Chiba, Y.; Sato, N.; Ohgiya, S.; Itadani, A.; Hirashima, M.; Shimoda, C.; Jigami, Y.; Nakayama, K. Development of valuable yeast strains using a novel mutagenesis technique for the effective production of therapeutic glycoproteins. *Glycobiology* **2009**, *19*, 428-436.
3. Abeysinghe, D.C.; Li, X.; Sun, C.; Zhang, W.; Zhou, C.; Chen, K. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1338-1344.
4. Abrams, S.A.; Copeland, K.C.; Gunn, S.K.; Gundberg, C.M.; Klein, K.O.; Ellis, K.J. Calcium absorption, bone mass accumulation, and kinetics increase during early pubertal development in girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1805-1809.
5. Acevedo, N.C.; Briones, V.; Buera, P.; Aguilera, J.M. Microstructure affects the rate of chemical, physical and color changes during storage of dried apple discs. *J. Food Eng.* **2008**, *85*, 222-231.
6. Adams, C.A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 37-46.
7. Adebawo, O.; Salau, B.; Ezima, E.; Oyefuga, O.; Ajani, E.; Idowu, G.; Famodu, A.; Osilesi, O. Fruits and vegetables moderate lipid cardiovascular risk factor in hypertensive patients. *Lipids in Health and Disease* **2006**, *5*, 14.
8. Aeschlimann, A.; Stockar, U. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *32*, 398-402.
9. Afman, L.; Müller, M. Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease. *J. Am. Diet. Assoc.* **2006**, *106*, 569-576.
10. Aiba, Y.; Suzuki, N.; Kabir, A.M.; Takagi, A.; Koga, Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol.* **1998**, *93*, 2097-2101.
11. Alegre, I.; Viñas, I.; Usall, J.; Anguera, M.; Abadias, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the

- probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG. *Food Microbiol.* **2011**,28, 59-66.
12. Al-Sheraji, S.H.; Ismail, A.; Manap, M.Y.; Mustafa, S.; Yusof, R.M.; Hassan, F.A. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* **2013**, 5, 1542-1553.
 13. Alzamora, S.M.; Salvatori, D.; Tapia, M.S.; López-Malo, A.; Welti-Chanes, J.; Fito, P. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J. Food Eng.* **2005**, 67,205-214.
 14. Ananta, E., Birkeland, S., Corcoran, B., Fitzgerald, G., Hinz, S., Klijn, A., Mättö, J., Mercernier, A., Nilsson, U., Nyman, M., O`Sullivan, E., Parche, S., Rautonen, N., Ross, R., Saarela, M., Stanton, C., Stahl, U., Suomalainen, T., Vincken, J., Virkajärvi, I., Voragen, F., Wesenfeld, J., Wouters, R., Knorr, D. Processing Effects on the Nutritional Advancement of Probiotics and Prebiotics. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2011**,16,
 15. Ananta, E.; Knorr, D. Evidence on the role of protein biosynthesis in the induction of heat tolerance of Lactobacillus rhamnosus GG by pressure pre-treatment. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 96, 307-313.
 16. Andersen, A.B.; Fog-Petersen, M.S.; Larsen, H.; Skibsted, L.H. Storage Stability of Freeze-dried Starter Cultures (*Streptococcus thermophilus*) as Related to Physical State of Freezing Matrix. *LWT - Food Science and Technology* **1999**, 32, 540-547.
 17. Andersson, H.; Asp, N.; Bruce, Å.; Roos, S.; Wadström, T.; Wold, A.E. Health effects of probiotics and prebiotics A literature review on human studies. *Food & Nutrition Research; Vol 45 (2001) - Scandinavian Journal of Nutrition/NÅringsforskning* **2001**,
 18. Angelov, A.; Gotcheva, V.; Kuncheva, R.; Hristozova, T. Development of a new oat-based probiotic drink. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, 112, 75-80.
 19. Anino, S.V.; Salvatori, D.M.; Alzamora, S.M. Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts. *Food Res. Int.* **2006**, 39, 154-164.
 20. Annunziata, A.; Vecchio, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods* **2011**, 3, 223-228.
 21. Antova, T.; Pattenden, S.; Nikiforov, B.; Leonardi, G.S.; Boeva, B.; Fletcher, T.; Rudnai, P.; Slachtova, H.; Tabak, C.; Zlotkowska, R.; Houthuijs, D.; Brunekreef, B.; Holikova, J. Nutrition and respiratory health in children in six Central and Eastern European countries. *Thorax* **2003**, 58, 231-236.
 22. Appel, L.J. Lifestyle modification as a means to prevent and treat high blood pressure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**, 14, S99-S102.

23. Aprikian, O.; Duclos, V.; Guyot, S.; Besson, C.; Manach, C.; Bernalier, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Demigne, C. Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1860-1865.
24. Aprikian, O.; Levrat-Verny, M.; Besson, C.; Busserolles, J.; Rémésy, C.; Demigné, C. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chem.* **2001**, *75*, 445-452.
25. Araya L, H.; Lutz R, M. Alimentos funcionales y saludables. *Revista chilena de nutrición* **2003**, *30*, 8-14.
26. Ares, G.; Gimenez, A.; Gambaro, A. Influence of nutritional knowledge on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite* **2008**, *51*, 663-668.
27. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; Bertalan, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Manichanh, C.; Nielsen, H.B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poulain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E.G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; de Vos, W.M.; Brunak, S.; Dore, J.; MetaHIT Consortium; Antolin, M.; Artiguenave, F.; Blottiere, H.M.; Almeida, M.; Brechot, C.; Cara, C.; Chervaux, C.; Cultrone, A.; Delorme, C.; Denariáz, G.; Dervyn, R.; Foerstner, K.U.; Friss, C.; van de Guchte, M.; Guedon, E.; Haimet, F.; Huber, W.; van Hylckama-Vlieg, J.; Jamet, A.; Juste, C.; Kaci, G.; Knol, J.; Lakhdari, O.; Layec, S.; Le Roux, K.; Maguin, E.; Merieux, A.; Melo Minardi, R.; M'rini, C.; Muller, J.; Oozeer, R.; Parkhill, J.; Renault, P.; Rescigno, M.; Sanchez, N.; Sunagawa, S.; Torrejon, A.; Turner, K.; Vandemeulebrouck, G.; Varela, E.; Winogradsky, Y.; Zeller, G.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Bork, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174-180.
28. Arup, N.; Shantanu, D. Delivery of probiotic bacteria in long life ambient stable foods using a powdered food ingredient null. *Br. Food J.* **2013**, *115*, 1329-1341.
29. Asami, D.K.; Hong, Y.J.; Barrett, D.M.; Mitchell, A.E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1237-1241.
30. Ashwell, M. Conceptos sobre los alimentos funcionales, ILSI Europe, ILSI Press, 2004 Belgium.

31. Banjongsinsiri, P.; Shields, J.; Wicker, L. Vacuum infusion of plant or fungal pectinmethylesterase and calcium affects the texture and structure of eggplant. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8214-8223.
32. Barrera, C.; Betoret, N.; Fito, P. Ca²⁺ and Fe²⁺ influence on the osmotic dehydration kinetics of apple slices (var. Granny Smith). *J. Food Eng.* **2004**, *65*, 9-14.
33. Barry, K.A.; Wojcicki, B.J.; Middelbos, I.S.; Vester, B.M.; Swanson, K.S.; Fahey, G.C. Dietary cellulose, fructooligosaccharides, and pectin modify fecal protein catabolites and microbial populations in adult cats. **2010**, *88*, 2978-2987.
34. Bazzano, L.A.; He, J.; Ogden, L.G.; Loria, C.M.; Vupputuri, S.; Myers, L.; Whelton, P.K. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 93-99.
35. Beasley, S.; Tuorila, H.; Saris, P.E.J. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *81*, 159-162.
36. Bech-Larsen, T.; Scholderer, J. Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 231-234.
37. Beganovic, J.; Frece, J.; Kos, B.; Lebos Pavunc, A.; Habjanic, K.; Suskovic, J. Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2011**, *100*, 43-53.
38. Bell, L.N.; Hageman, M.J. Differentiating between the Effects of Water Activity and Glass Transition Dependent Mobility on a Solid State Chemical Reaction: Aspartame Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2398-2401.
39. Benavente-Garcia, O.; Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6185-6205.
40. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70-76.
41. Bergen, W.G.; Mersmann, H.J. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2499-2502.
42. Betoret, E.; Betoret, N.; Arilla, A.; Bennár, M.; Barrera, C.; Codoñer, P.; Fito, P. No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. *J. Food Eng.* **2012**, *110*, 289-293.

43. Betoret, E.; Betoret, N.; Vidal, D.; Fito, P. Functional foods development: Trends and technologies. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 498-508.
44. Betoret, E.; Sentandreu, E.; Betoret, N.; Codoñer-Franch, P.; Valls-Bellés, V.; Fito, P. Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2012**, *16*, 298-304.
45. Betoret, E.; Sentandreu, E.; Betoret, N.; Fito, P. Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *J. Food Eng.* **2012**, *111*, 28-33.
46. Betoret, N.; Puente, L.; Díaz, M.J.; Pagán, M.J.; García, M.J.; Gras, M.L.; Martínez-Monzó, J.; Fito, P. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *J. Food Eng.* **2003**, *56*, 273-277.
47. Bielecka, M.; Biedrzycka, E.; Majkowska, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 125-131.
48. Bigliardi, B.; Galati, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *31*, 118-129.
49. Bilman, E.M.; van Trijp, J.C.M.; Renes, R.J. Consumer perceptions of satiety-related snack food decision making. *Appetite* **2010**, *55*, 639-647.
50. Bisakowski, B.; Atwal, A.S.; Gardner, N.; Champagne, C.P. Effect of lactic acid fermentation of onions (*Allium cepa*) on the composition of flavonol glucosides. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2007**, *42*, 783-789.
51. Bisogni, C.A.; Falk, L.W.; Madore, E.; Blake, C.E.; Jastran, M.; Sobal, J.; Devine, C.M. Dimensions of everyday eating and drinking episodes. *Appetite* **2007**, *48*, 218-231.
52. Bolin, H.R. Relation of moisture to water activity in prunes and raisins. *J. Food Sci.* **1980**, *45*, 1190-1192.
53. Bolin, H.R.; Steele, R.J. Nonenzymatic browning in dried apples during Storage. *J. Food Sci.* **1987**, *52*, 1654-1657.
54. Borenstein, B.; Bunnell, R.H. Carotenoids: properties, occurrence, and utilization in foods. *Adv. Food Res.* **1966**, *15*, 195-276.
55. Bouhnik, Y.; Flouri, B.; Riottot, M.; Bisetti, N.; Gailing, M.; Guibert, A.; Bornet, F.; Rambaud, J. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutr. Cancer* **1996**, *26*, 21-29.
56. Bourquin, L.D.; Titgemeyer, E.C.; Fahey Jr, G.C. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr. Res.* **1996**, *16*, 1119-1131.

57. Boyer, J.; Liu, R. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* **2004**, *3*, 5.
58. Boylston, T.D.; Vinderola, C.G.; Ghoddusi, H.B.; Reinheimer, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 375-387.
59. Boza-Méndez, E.; Cortés-Muñoz, M.; López-Calvo, R. *Innovative dairy products development using probiotics: challenges and limitations*. INTECH Open Access Publisher: 2012;
60. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, *28*, 25-30.
61. Brashears, M.M.; Gilliland, S.E. Survival During Frozen and Subsequent Refrigerated Storage of *Lactobacillus acidophilus* Cells as Influenced by the Growth Phase¹. *J. Dairy Sci.* **1995**, *78*, 2326-2335.
62. Brennan, M.; Wanismail, B.; Johnson, M.; Ray, B. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Prot.* **1986**, *49*, 47-53.
63. Brighenti, F.; Casiraghi, M.C.; Canzi, E.; Ferrari, A. Effect of consumption of a ready-to-eat breakfast cereal containing inulin on the intestinal milieu and blood lipids in healthy male volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, *53*, 726-733.
64. Brouns, F.; Theuwissen, E.; Adam, A.; Bell, M.; Berger, A.; Mensink, R.P. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 591-599.
65. Brown, L.; Rosner, B.; Willett, W.W.; Sacks, F.M. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 30-42.
66. Bruni, F.; Leopold, A.C. Glass transitions in soybean seed : relevance to anhydrous biology. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 660-663.
67. Buddington, R.K.; Williams, C.H.; Chen, S.C.; Witherly, S.A. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1996**, *63*, 709-716.
68. Burda, S.; Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2774-2779.
69. Burdock, G.A.; Carabin, I.G.; Griffiths, J.C. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology* **2006**, *221*, 17-27.
70. Burgain, J.; Gaiani, C.; Linder, M.; Scher, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* **2011**, *104*, 467-483.

71. Burton-Freeman, B. Dietary fiber and energy regulation. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 272S-275S.
72. Byers, T.; Perry, G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu. Rev. Nutr.* **1992**, *12*, 139-159.
73. Campbell, J.M.; Fahey, G.C., Jr; Wolf, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 130-136.
74. Cano, A.; Medina, A.; Bermejo, A. Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21*, 377-381.
75. Capela, P.; Hay, T.K.C.; Shah, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 203-211.
76. Carrillo, E.; Prado-Gascó, V.; Fiszman, S.; Varela, P. Why buying functional foods? Understanding spending behaviour through structural equation modelling. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 361-368.
77. Castro, L.; Aguilera, J.M. Fracture Properties and Microstructure of Low-Moisture Starch Probes. *Drying Technol* **2007**, *25*, 147-152.
78. Chávez, B.E.; Ledebor, A.M. Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Drying Technol* **2007**, *25*, 1193-1201.
79. Chae, H.J.; Joo, H.; In, M. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresour. Technol.* **2001**, *76*, 253-258.
80. Champagne, C.P.; Gardner, N.J.; Roy, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 61-84.
81. Champagne, C.P.; Raymond, Y.; Gagnon, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, M221-6.
82. Champagne, C.P.; Gardner, N.J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 539-543.
83. Champagne, C.P.; Gardner, N.J; Roy, D. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 61-84.
84. Champagne, C. Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods, In Charalampopoulos, D. and Rastall, R., Eds.; Springer New York: 2009; pp. 761-804.

85. Chang, C.; Lin, H.; Chang, C.; Liu, Y. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J. Food Eng.* **2006**, *77*, 478-485.
86. Charalampopoulos, D.; Rastall, R.A. Prebiotics in foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 187-191.
87. Chavan, J.K.; Kadam, S.S.; Beuchat, L.R. Nutritional improvement of cereals by fermentation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, *28*, 349-400.
88. Chiba, H.; Uehara, M.; Wu, J.; Wang, X.; Masuyama, R.; Suzuki, K.; Kanazawa, K.; Ishimi, Y. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1892-1897.
89. Chikthimmah, N.; Anantheswaran, R.C.; Roberts, R.F.; Mills, E.W.; Knabel, S.J. Influence of Sodium Chloride on Growth of Lactic Acid Bacteria and Subsequent Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 during Processing of Lebanon Bologna. *J. Food Prot.* **2001**, *64*, 1145-1150.
90. Chiralt, A.; Martínez-Navarrete, N.; Martínez-Monzó, J.; Talens, P.; Moraga, G.; Ayala, A.; Fito, P. Changes in mechanical properties throughout osmotic processes: Cryoprotectant effect. *J. Food Eng.* **2001**, *49*, 129-135.
91. Chirife, J.; Buera, M.P. A simple model for predicting the viscosity of sugar and oligosaccharide solutions. *J. Food Eng.* **1997**, *33*, 221-226.
92. Choi, M.H.; Kim, G.H.; Lee, H.S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 753-759.
93. Chumchuere, S.; Robinson, R.K. Selection of starter cultures for the fermentation of soya milk. *Food Microbiol.* **1999**, *16*, 129-137.
94. Coconnier, M.H.; Bernet, M.F.; Kerneis, S.; Chauviere, G.; Fourniat, J.; Servin, A.L. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* **1993**, *110*, 299-305.
95. Codoner-Franch, P.; Lopez-Jaen, A.B.; Muniz, P.; Sentandreu, E.; Belles, V.V. Mandarin juice improves the antioxidant status of hypercholesterolemic children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2008**, *47*, 349-355.
96. Comandini, P.; Blanda, G.; MÃjica Paz, H.; Valdez Fragoso, A.; Gallina Toschi, T. Impregnation Techniques for Aroma Enrichment of Apple Sticks: A Preliminary Study. *Food and Bioprocess Technology* **2010**, *3*, 861-866.
97. Contreras, C.; Martín-Esparza, M.E.; Chiralt, A.; Martínez-Navarrete, N. Influence of microwave application on convective drying: Effects on

- drying kinetics, and optical and mechanical properties of apple and strawberry. *J. Food Eng.* **2008**, *88*, 55-64.
98. Contreras, C.; Martín-Esparza, M.E; Martínez-Navarrete, N. Influence of drying method on the rehydration properties of apricot and apple. *J. Food Process Eng.* **2012**, *35*, 178-190.
 99. Conway, P. Prebiotics and human health: The state-of-the-art and future perspectives. *Food & Nutrition Research* **2001**, *45*,
 100. Corcoran, B.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 1024-1039.
 101. Corcoran, B.M.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*,3060-3067.
 102. Corcoran, B.M.; Stanton, C.F.; Fitzgerald G FAU - Ross,,R.P.; Ross, R.P. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current pharmaceutical design JID - 960248***70724**,
 103. Corey, M.E.; Kerr, W.L.; Mulligan, J.H.; Lavelli, V. Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties. *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44*,67-74.
 104. Cortés, C.; Torregrosa, F.; Esteve, M.J.; Frígola, A. Carotenoid Profile Modification during Refrigerated Storage in Untreated and Pasteurized Orange Juice and Orange Juice Treated with High-Intensity Pulsed Electric Fields. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6247-6254.
 105. Cortés, C.; Esteve, M.J.; Rodrigo, D.; Torregrosa, F.; Frígola, A. Changes of colour and carotenoids contents during high intensity pulsed electric field treatment in orange juices. *Food and Chemical Toxicology* **2006**, *44*, 1932-1939.
 106. Corzo-Martínez, M.; Carrera Sánchez, C.; Moreno, F.J.; Rodríguez Patino, J.M.; Villamiel, M. Interfacial and foaming properties of bovine β -lactoglobulin: Galactose Maillard conjugates. *Food Hydrocoll.***2012**, *27*, 438-447.
 107. Coudray, C.; Bellanger, J.; Castiglia-Delavaud, C.; Remesy, C.; Vermorel, M.; Rayssiguier, Y. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1997**, *51*, 375-380.
 108. Courtin, C.M.; Swennen, K.; Verjans, P.; Delcour, J.A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. *Food Chem.* **2009**, *112*, 831-837.
 109. Coussement, P.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1412S-7S.

110. Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F.; Aurell Wistrom, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* **1987**, *242*, 1-10.
111. Crowe, J.H.; Carpenter, J.F.; Crowe, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 73-103.
112. Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001-1043.
113. Cruz, R.M.S.; Vieira, M.C.; Silva, C.L.M. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: Effect of an antifreeze protein type I. *J. Food Eng.* **2009**, *95*, 339-345.
114. Cserhalmi, Z.; Sass-Kiss, Á.; Tóth-Markus, M.; Lechner, N. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2006**, *7*, 49-54.
115. Cummings, J.H.; Macfarlane, G.T.; Englyst, H.N. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 415S-420S.
116. Da Silva, P.F.; Moreira, R.G. Vacuum frying of high-quality fruit and vegetable-based snacks. *LWT - Food Science and Technology* **2008**, *41*, 1758-1767.
117. Dalla Rosa, M.; Giroux, F. Osmotic treatments (OT) and problems related to the solution management. *J. Food Eng.* **2001**, *49*, 223-236.
118. Dauchet, L.; Amouyel, P.; Hercberg, S.; Dallongeville, J. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2588-2593.
119. Dave, R.I.; Shah, N.P. Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *J. Dairy Sci.* **1998**, *81*, 2804-2816.
120. Dave, R.I.; Shah, N.P. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *J. Dairy Sci.* **1996**, *79*, 1529-1536.
121. Dave, R.I.; Shah, N.P. Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *J. Dairy Sci.* *81*, 2804-2816.
122. Dave, R.I.; Shah, N.P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 435-443.
123. Dave, R.I.; Shah, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 31-41.
124. Davey, M.W.; Montagu, M.V.; Inzé, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I.J.; Strain, J.J.; Favell, D.; Fletcher, J. Plant L-

- ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 825-860.
125. Davidov-Pardo, G.; McClements, D.J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem.* **2015**, *167*, 205-212.
 126. Davidov-Pardo, G.; McClements, D.J. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*, 88-103.
 127. Davidson, M.H.; Maki, K.C.; Synecki, C.; Torri, S.A.; Drennan, K.B. Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* **1998**, *18*, 503-517.
 128. De Angelis, M.; Gobbetti, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* **2004**, *4*, 106-122.
 129. de Gennaro, S.; Birch, G.G.; Parke, S.A.; Stancher, B. Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. *Food Chem.* **2000**, *68*, 179-183.
 130. de Graaf, C. Effects of snacks on energy intake: An evolutionary perspective. *Appetite* **2006**, *47*, 18-23.
 131. de Vos, P.; Faas, M.M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 292-302.
 132. de Vrese, M.; Marteau, P.R. Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *The Journal of Nutrition* **2007**, *137*, 803S-811S.
 133. De Vuyst, L. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology* **2000**, *38*, 105-112.
 134. Degraeve, P.; Saurel, R.; Coutel, Y. Vacuum Impregnation Pretreatment with Pectinmethylesterase to Improve Firmness of Pasteurized Fruits. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 716-721.
 135. Del Caro, A.; Piga, A.; Vacca, V.; Agabbio, M. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chem.* **2004**, *84*, 99-105.
 136. del Valle, J.M.; Aránguiz, V.; León, H. Effects of blanching and calcium infiltration on PPO activity, texture, microstructure and kinetics of osmotic dehydration of apple tissue. *Food Res. Int.* **1998**, *31*, 557-569.
 137. Delzenne, N.M.; Williams, C.M. Prebiotics and lipid metabolism. *Current opinion in lipidology JID - 9010000* **0614**,
 138. Den Hond, E.; Geypens, B.; Ghoo, Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation. *Nutr. Res.* **2000**, *20*, 731-736.
 139. Dennison, D.B.; Kirk, I.R. Oxygen effect on the degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 609-618.

140. Derossi, A.; De Pilli, T.; Severini, C. Application of Vacuum Impregnation Techniques to Improve the pH Reduction of Vegetables: Study on Carrots and Eggplants. *Food and Bioprocess Technology* **2013**, *6*, 3217-3226.
141. Derossi, A.; De Pilli, T.; Severini, C. Reduction in the pH of vegetables by vacuum impregnation: A study on pepper. *J. Food Eng.* **2010**, *99*, 9-15.
142. Devi, K.P.; Rajavel, T.; Nabavi, S.F.; Setzer, W.N.; Ahmadi, A.; Mansouri, K.; Nabavi, S.M. Hesperidin: A promising anticancer agent from nature. *Industrial Crops and Products* **2015**, *76*, 582-589.
143. Dhuique-Mayer, C.; Caris-Veyrat, C.; Ollitrault, P.; Curk, F.; Amiot, M. Varietal and Interspecific Influence on Micronutrient Contents in Citrus from the Mediterranean Area. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2140-2145.
144. Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M.; Amiot, M.J. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4209-4216.
145. Di Cagno, R.; Coda, R.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* **2013**, *33*, 1-10.
146. Di Cagno, R.; Minervini, G.; Rizzello, C.G.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1062-1071.
147. Di Gioia, D.; Strahsburger, E.; Lopez de Lacey, A.M.; Bregola, V.; Marotti, I.; Aloisio, I.; Biavati, B.; Dinelli, G. Flavonoid bioconversion in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* B7003: A potential probiotic strain for functional food development. *Journal of Functional Foods* **2014**, *7*, 671-679.
148. Dillard, C.J.; German, J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1744-1756.
149. Ding, W.K.; Shah, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal* **2008**, *15*, 219-232.
150. Djousse, L.; Arnett, D.K.; Coon, H.; Province, M.A.; Moore, L.L.; Ellison, R.C. Fruit and vegetable consumption and LDL cholesterol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 213-217.
151. Doleyres, Y.; Lacroix, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int. Dairy J.* **2005**, *15*, 973-988.

152. Domel, S.; Thompson, W.; Davis, H.; Baranowski, T.; Leonard, S.; Baranowski, J. Psychosocial predictors of fruit and vegetable consumption among elementary school children. *Health Educ. Res.* **1996**, *11*, 299-308.
153. Dongowski, G. Influence of pectin structure on the interaction with bile acids under in vitro conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *201*, 390-398.
154. Dongowski, G.; Lorenz, A.; Proll, J. The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1935-1944.
155. Dongowski, G.; Lorenz, A. Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by in vitro treatment of pectin with human faecal flora. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 237-244.
156. Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T.; Shah, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1181-1189.
157. Donkor, O.N.; Henriksson, A.; Vasiljevic, T.; Shah, N.P. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chem.* **2007**, *104*, 10-20.
158. Douglas, L.C.; Sanders, M.E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J. Am. Diet. Assoc.* **2008**, *108*, 510-521.
159. 191. Dragsted, L.O.; Krath, B.; Ravn-Haren, G.; Vogel, U.B.; Vinggaard, A.M.; Bo Jensen, P.; Loft, S.; Rasmussen, S.E.; Sandstrom, T.; Pedersen, A. Biological effects of fruit and vegetables. *Proc. Nutr. Soc.* **2006**, *65*, 61-67.
160. Dragsted, L.O.; Strube, M.; Larsen, J.C. Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.* **1993**, *72 Suppl 1*, 116-135.
161. Drbohlav J.; Roubal P.; Binder M.; Šalaková A.; Plechacová, M. Research and development of functional foods with special regard to dairy foods in the Czech Republic. 2007. In Proceedings of the fourth international FFNet meeting on functional foods
162. Dunne, C.; O'Mahony, L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; O'Sullivan, G.C.; Shanahan, F.; Collins, J.K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 386S-392S.
163. Dupont, S.; Beney, L.; Ritt, J.-.; Lherminier, J.; Gervais, P. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 975-985.

164. Dupont, S.; Lemetais, G.; Ferreira, T.; Cayot, P.; Gervais, P.; Beney, L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* **2012**, *66*, 2961-2968.
165. Durán C, R.; Valenzuela B, A. La experiencia japonesa con los alimentos foshu: ¿los verdaderos alimentos funcionales? *Revista chilena de nutrición* **2010**, *37*, 224-233.
166. Elliott, S.S.; Keim, N.L.; Stern, J.S.; Teff, K.; Havel, P.J. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2002**, *76*, 911-922.
167. el-Shimi, N.M. Control of enzymatic browning in apple slices by using ascorbic acid under different conditions. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1993**, *43*, 71-76.
168. Espinosa-Martos, I.; Rico, E.; Rupèrez, P. Note. Low Molecular Weight Carbohydrates in Foods Usually Consumed in Spain. *Food Science and Technology International* **2006**, *12*, 171-175.
169. Ewe, J.A.; Wan-Abdullah, W.N.; Liong, M.T. Viability and growth characteristics of Lactobacillus in soymilk supplemented with B-vitamins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, *61*, 87-107.
170. Farin, D.; Ikan, R.; Gross, J. The carotenoid pigments in the juice and flavedo of a mandarin hybrid (*Citrus reticulata*) cv michal during ripening. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 403-408.
171. Fay, L.B.; Brevard, H. Contribution of mass spectrometry to the study of the Maillard reaction in food. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 487-507.
172. Fernández, J.L.; Benito, J. Panorama actual de la Nutrigenómica. ¿Esperanza o Realidad? *Nutricion Clínica y Dietetica Hospitalaria* **2008**, *28*, 38-47.
173. Ferrando, V.; Quiberoni, A.; Reinheimer, J.; Suárez, V. Resistance of functional Lactobacillus plantarum strains against food stress conditions. *Food Microbiol.* **2015**, *48*, 63-71.
174. Figueroa-González, I.; Quijano, G.; Ramírez, G.; Cruz-Guerrero, A. Probiotics and prebiotics? perspectives and challenges. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 1341-1348.
175. Fito, P.; Andrés, A.; Chiralt, A.; Pardo, P. Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. *J. Food Eng.* **1996**, *27*, 229-240.
176. Fito, P.; Chiralt, A. Food Matrix Engineering: The Use of the Water-Structure-Functionality Ensemble in Dried Food Product Development. *Food Science and Technology International* **2003**, *9*, 151-156.
177. Fito, P.; Chiralt, A.; Betoret, N.; Gras, M.; Cháfer, M.; Martínez-Monzó, J.; Andrés, A.; Vidal, D. Vacuum impregnation and osmotic dehydration

- in matrix engineering: Application in functional fresh food development. *J. Food Eng.* **2001**, *49*, 175-183.
178. Fito, P.; Pastor, R. Non-diffusional mechanisms occurring during vacuum osmotic dehydration. *J. Food Eng.* **1994**, *21*, 513-519.
179. Fito, P. Modelling of vacuum osmotic dehydration of food. *J. Food Eng.* **1994**, *22*, 313-328.
180. Floegel, A.; Kim, D.; Chung, S.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 1043-1048.
181. Fonteles, T.; Costa, M.; de Jesus, A.; Rodrigues, S. Optimization of the Fermentation of Cantaloupe Juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food and Bioprocess Technology* **2012**, *5*, 2819-2826.
182. França, M.B.; Panek, A.D.; Eleutherio, E.C.A. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2007**, *146*, 621-631.
183. Franck, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* **2002**, *87 Suppl 2*, S287-91.
184. Fu, H.Y. Free Radical Scavenging and Leukemia Cell Growth Inhibitory Properties of Onion Powders Treated by Different Heating Processes. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, SNQ50-SNQ54.
185. Fu, N.; Chen, X.D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1127-1149.
186. Garcia, A.H. Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications. *J. Biosci.* **2011**, *36*, 939-950.
187. Gardiner, G.E.; O'Sullivan, E.; Kelly, J.; Auty, M.A.; Fitzgerald, G.F.; Collins, J.K.; Ross, R.P.; Stanton, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2605-2612.
188. Garro, M.S.; de Valdez, G.F.; Oliver, G.; de Giori, G.S. Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 808-810.
189. Garro, M.S.; de Valdez, G.F.; de Giori, G.S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 511-518.
190. Gattuso, G.; Barreca, D.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U.; Caristi, C. Flavonoid composition of Citrus juices. *Molecules* **2007**, *12*, 1641-1673.
191. Gervais, P.; Marechal, P.A. Yeast resistance to high levels of osmotic pressure: Influence of kinetics. *J. Food Eng.* **1994**, *22*, 399-407.

192. Ghaly, A.E.; Tango, M.S.A.; Adams, M.A. Enhanced Lactic Acid Production from Cheese Whey with Nutrient Supplement Addition. **2003**,
193. Gibson, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1438S-41S.
194. Gibson, G.R.; McCartney, A.L.; Rastall, R.A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br. J. Nutr.* **2005**, *93 Suppl 1*, S31-4.
195. Gibson, G.R.; Probert, H.M.; Loo, J.V.; Rastall, R.A.; Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* **2004**, *17*, 259-275.
196. Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1401-1412.
197. Gibson, G.R.; Beatty, E.R.; Wang, X.; Cummings, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* *108*, 975-982.
198. Gil, M.I.; Tomas-Barberan, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4581-4589.
199. Gil-Izquierdo, A.; Gil, M.I.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F.A. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1035-1041.
200. Goh, Y.J.; Lee, J.H.; Hutkins, R.W. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5716-5724.
201. Golan-Goldhirsh, A.; Whitaker, J.R. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 1003-1009.
202. Golding, J.; Jobling, J. Apples, In *Crop Post-Harvest: Science and Technology*, Anonymous ; Wiley-Blackwell: 2012; pp. 88-107.
203. Gomes, A.M.; Malcata, F.X. Use of small ruminants' milk supplemented with available nitrogen as growth media for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *85*, 839-848.
204. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 139-157.
205. Goodner, K.L.; Rouseff, R.L.; Hofsommer, H.J. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1146-1150.

206. Gorinstein, S.; Haruenkit, R.; Poovarodom, S.; Vearasilp, S.; Ruamsuke, P.; Namiesnik, J.; Leontowicz, M.; Leontowicz, H.; Suhaj, M.; Sheng, G.P. Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 355-362.
207. Gorinstein, S.; Martín-Belloso, O.; Park, Y.; Haruenkit, R.; Lojek, A.; Číž, M.; Caspi, A.; Libman, I.; Trakhtenberg, S. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem.* **2001**, *74*, 309-315.
208. Gorinstein, S.; Poovarodom, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Namiesnik, J.; Vearasilp, S.; Haruenkit, R.; Ruamsuke, P.; Katrich, E.; Tashma, Z. Antioxidant properties and bioactive constituents of some rare exotic Thai fruits and comparison with conventional fruits: In vitro and in vivo studies. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2222-2232.
209. Granato, D.; Branco, G.F.; Nazzaro, F.; Cruz, A.G.; Faria, J.A.F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2010**, *9*, 292-302.
210. Gras, M.; Vidal-Brotóns, N.; Betoret, A.; Chiralt; Fito, P. The response of some vegetables to vacuum impregnation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2002**, *3*, 263-269.
211. Gras, M.L.; Vidal, D.; Betoret, N.; Chiralt, A.; Fito, P. Calcium fortification of vegetables by vacuum impregnation: Interactions with cellular matrix. *J. Food Eng.* **2003**, *56*, 279-284.
212. Gras, M.L.; Vidal-Brotóns, D.; Vásquez-Forttes, F.A. Production of 4th range iceberg lettuce enriched with calcium. Evaluation of some quality parameters. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 1534-1539.
213. Guarner, F.; Malagelada, J. Gut flora in health and disease. *The Lancet* **2003**, *361*, 512-519.
214. Guillemín, A.; Degraeve, P.; Noël, C.; Saurel, R. Influence of impregnation solution viscosity and osmolarity on solute uptake during vacuum impregnation of apple cubes (var. Granny Smith). *J. Food Eng.* **2008**, *86*, 475-483.
215. Gulfi, M.; Arrigoni, E.; Amadó, R. The chemical characteristics of apple pectin influence its fermentability in vitro. *LWT-Food Science and Technology* **2006**, *39*, 1001-1004.
216. Han, B.; Rombouts, F.M.; Nout, M.J.R. A Chinese fermented soybean food. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *65*, 1-10.
217. Hansen, J.M.; Go, Y.M.; Jones, D.P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 215-234.
218. Hardy, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition* **2000**, *16*, 688-689.

219. Heenan, C.N.; Adams, M.C.; Hosken, R.W.; Fleet, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *LWT - Food Science and Technology* **2004**, *37*, 461-466.
220. Helland, M.H.; Wicklund, T.; Narvhus, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 957-965.
221. Henríquez, C.; Córdova, A.; Lutz, M.; Saavedra, J. Storage stability test of apple peel powder using two packaging materials: High-density polyethylene and metalized films of high barrier. *Industrial Crops and Products* **2013**, *45*, 121-127.
222. Hernandez-Hernandez, O.; Muthaiyan, A.; Moreno, F.J.; Montilla, A.; Sanz, M.L.; Ricke, S.C. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiol.* **2012**, *30*, 355-361.
223. Hidalgo, M.; Martin-Santamaria, S.; Recio, I.; Sanchez-Moreno, C.; de Pascual-Teresa, B.; Rimbach, G.; de Pascual-Teresa, S. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes & Nutrition* **2012**, *7*, 295-306.
224. Hilliam, M. The Market for Functional Foods. *Int. Dairy J.* **1998** *8*, 349-353.
225. Hironaka, K.; Kikuchi, M.; Koaze, H.; Sato, T.; Kojima, M.; Yamamoto, K.; Yasuda, K.; Mori, M.; Tsuda, S. Ascorbic acid enrichment of whole potato tuber by vacuum-impregnation. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1114-1118.
226. Hoenselaar, R. Saturated fat and cardiovascular disease: The discrepancy between the scientific literature and dietary advice. *Nutrition* **2012**, *28*, 118-123.
227. Homayouni, A.; Azizi, A.; Ehsani, M.R.; Yarmand, M.S.; Razavi, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chem.* **2008**, *111*, 50-55.
228. Hong-Sik Cheigh; Soo-Hyoun Um; Lee, C.Y. Antioxidant Characteristics of Melanin-Related Products from Enzymatic Browning Reaction of Catechin in a Model System, In Anonymous ; American Chemical Society: 1995; Vol.600 pp. 200-208.
229. Hou, M.; Man, M.; Man, W.; Zhu, W.; Hupe, M.; Park, K.; Crumrine, D.; Elias, P.M.; Man, M.Q. Topical hesperidin improves epidermal permeability barrier function and epidermal differentiation in normal murine skin. *Exp. Dermatol.* **2012**, *21*, 337-340.
230. Hsieh, P.S.; Tsai, Y.C.; Chen, Y.C.; Teh, S.F.; Ou, C.M.; King, V.A. Eradication of *Helicobacter pylori* infection by the probiotic strains

- Lactobacillus johnsonii* MH-68 and *L. salivarius* ssp. *salicinii* AP-32. *Helicobacter* **2012**, *17*, 466-477.
231. Hsu, A.F.; Shieh, J.J.; Bills, D.D.; white, k. Inhibition of Mushroom Polyphenoloxidase by Ascorbic Acid Derivatives. *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 765-767.
232. Huang, Y.; Ho, S. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chem.* **2010**, *119*, 868-873.
233. Huebner, J.; Wehling, R.L.; Parkhurst, A.; Hutkins, R.W. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 287-293.
234. Hung, H.C.; Joshipura, K.J.; Jiang, R.; Hu, F.B.; Hunter, D.; Smith-Warner, S.A.; Colditz, G.A.; Rosner, B.; Spiegelman, D.; Willett, W.C. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1577-1584.
235. Hussein, M.A.; Othman, S.M. Structure activity relationship of antioxidative property of hesperidin. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* **2011**, *3*, 19-29.
236. Laconelli, C.; Lemetais, G.; Kechaou, N.; Chain, F.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; Gervais, P.; Beney, L. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *J. Biotechnol.* **2015**, *214*, 17-26.
237. Ibarz, A.; Pagán, J.; Garza, S. Kinetic models of non-enzymatic browning in apple puree. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1162-1168.
238. Imaoka, A.; Shima, T.; Kato, K.; Mizuno, S.; Uehara, T.; Matsumoto, S.; Setoyama, H.; Hara, T.; Umesaki, Y. Anti-inflammatory activity of probiotic Bifidobacterium: Enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **2008**, *14*, 2511-2516.
239. Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 395-418.
240. Jackson, K.G.; Taylor, G.R.; Clohessy, A.M.; Williams, C.M. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. *Br. J. Nutr.* **1999**, *82*, 23-30.
241. Jaiswal, A.K.; Abu-Ghannam, N. Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products* **2013**, *50*, 212-218.
242. Jastran, M.M.; Bisogni, C.A.; Sobal, J.; Blake, C.; Devine, C.M. Eating routines. Embedded, value based, modifiable, and reflective. *Appetite* **2009**, *52*, 127-136.

243. Javeri, H.; Toledo, R.; Wicker, L. Vacuum Infusion of Citrus Pectinmethylesterase and Calcium Effects on Firmness of Peaches. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 739-742.
244. Jeffery, E. Component interactions for efficacy of functional foods. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1223-1225.
245. Jenkins, D.J.A.; Popovich, D.G.; Kendall, C.W.C.; Vidgen, E.; Tariq, N.; Ransom, T.P.P.; Wolever, T.M.S.; Vuksan, V.; Mehling, C.C.; Boctor, D.L.; Bolognesi, C.; Huang, J.; Patten, R. Effect of a diet high in vegetables, fruit, and nuts on serum lipids. *Metab. Clin. Exp.* **1997**, *46*, 530-537.
246. Jensen, E.N.; Buch-Andersen, T.; Ravn-Haren, G.; Dragsted, L.O. Mini-review: the effects of apples on plasma cholesterol levels and cardiovascular risk—a review of the evidence. *The journal of horticultural science & biotechnology* **2009**, *34*.
247. Jeon, M.; Zhao, Y. Honey in combination with vacuum impregnation to prevent enzymatic browning of fresh-cut apples. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2005**, *56*, 165-176.
248. Johnsen, S.P.; Overvad, K.; Stripp, C.; Tjønneland, A.; Husted, S.E.; Sorensen, H.T. Intake of fruit and vegetables and the risk of ischemic stroke in a cohort of Danish men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 57-64.
249. Jones, P.J.; Jew, S. Functional food development: concept to reality. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 387-390.
250. Joshi, A.P.K.; Rupasinghe, H.P.V.; Khanizadeh, S. Impact of drying processes on bioactive phenolics, vitamin c and antioxidant capacity of red-fleshed apple slices. *J. Food Process. Preserv.* **2011**, *35*, 453-457.
251. Joshi, A.P.K.; Rupasinghe, H.P.V.; Pitts, N.L. sensory and nutritional quality of the apple snacks prepared by vacuum impregnation process. *J. Food Qual.* **2010**, *33*, 758-767.
252. Joshipura, K.J.; Hu, F.B.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Rimm, E.B.; Speizer, F.E.; Colditz, G.; Ascherio, A.; Rosner, B.; Spiegelman, D.; Willett, W.C. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* **2001**, *134*, 1106-1114.
253. Kailasapathy, K.; Harmstorf, I.; Phillips, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT - Food Science and Technology* **2008**, *41*, 1317-1322.
254. Kalinowska, M.; Bielawska, A.; Lewandowska-Siwkiewicz, H.; Priebe, W.; Lewandowski, W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* **2014**, *84*, 169-188.

255. Katina, K.; Liukkonen, K.-.; Kaukovirta-Norja, A.; Adlercreutz, H.; Heinonen, S.-.; Lampi, A.-.; Pihlava, J.-.; Poutanen, K. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J. Cereal Sci.* **2007**, *46*, 348-355.
256. Kaur, C.; Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables ? the millennium?s health. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2001**, *36*, 703-725.
257. Kaur, N.; Gupta, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* **2002**, *27*, 703-714.
258. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 896-899.
259. Keast, D.R.; O'Neil, C.E.; Jones, J.M. Dried fruit consumption is associated with improved diet quality and reduced obesity in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *Nutr. Res.* **2011**, *31*, 460-467.
260. Kedia, G.; Wang, R.; Patel, H.; Pandiella, S.S. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochemistry* **2007**, *42*, 65-70.
261. Keenan, D.F.; Brunton, N.; Butler, F.; Wouters, R.; Gormley, R. Evaluation of thermal and high hydrostatic pressure processed apple purees enriched with prebiotic inclusions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2011**, *12*, 261-268.
262. Khan, R.S.; Grigor, J.; Winger, R.; Win, A. Functional food product development – Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *30*, 27-37.
263. Khanizadeh, S.; Tsao, R.; Rekika, D.; Yang, R.; Charles, M.T.; Vasantha Rupasinghe, H.P. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21*, 396-401.
264. Kidmose, U.; Knuthsen, P.; Edelenbos, M.; Justesen, U.; Hegelund, E. Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L) genotypes after deep frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 918-923.
265. King, V.A.-.; Huang, H.-.; Tsen, J.-. Fermentation of tomato juice by cell immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Mid-Taiwan Journal of Medicine* **2007**, *12*, 1-7.
266. Kirk, J.; Dennison, D.; Kokoczka, P.; Heldman, D. Degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system. *J. Food Sci.* **1977**, *42*, 1274-1279.
267. Kleessen, B.; Sykura, B.; Zunft, H.J.; Blaut, M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly

- constipated persons. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1997**, *65*, 1397-1402.
268. Kliui, H.; Bauernfeind, J. Carotenoids as food colors. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Applications* **2012**, 47.
269. Klopotek, Y.; Otto, K.; Bohm, V. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5640-5646.
270. Knai, C.; Pomerleau, J.; Lock, K.; McKee, M. Getting children to eat more fruit and vegetables: A systematic review. *Prev. Med.* **2006**, *42*, 85-95.
271. Koh, J.H.; Kim, Y.; Oh, J.H. Chemical characterization of tomato juice fermented with bifidobacteria. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, C428-32.
272. Kolida, S.; Gibson, G.R. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2503S-2506S.
273. Konopacka, D.; Plochanski, W.; Beveridge, T. Water Sorption and Crispness of Fat-Free Apple Chips. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 87-92.
274. Korzen-Bohr, S.; Jensen, K.O. Heart disease among post-menopausal women: Acceptability of functional foods as a preventive measure. *Appetite* **2006**, *46*, 152-163.
275. Kothari, D.; Patel, S.; Goyal, A. Therapeutic Spectrum of Nondigestible Oligosaccharides: Overview of Current State and Prospect. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, R1491-R1498.
276. Kourkoutas, Y.; Bosnea, L.; Taboukos, S.; Baras, C.; Lambrou, D.; Kanellaki, M. Probiotic Cheese Production Using *Lactobacillus casei* Cells Immobilized on Fruit Pieces. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1439-1451.
277. Kourkoutas, Y.; Kanellaki, M.; Koutinas, A.A. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT - Food Science and Technology* **2006**, *39*, 980-986.
278. Kourkoutas, Y.; Xolias, V.; Kallis, M.; Bezirtzoglou, E.; Kanellaki, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 411-416.
279. Koutsos, A.; Tuohy, K.M.; Lovegrove, J.A. Apples and Cardiovascular Health Is the Gut Microbiota a Core Consideration? *Nutrients* **2015**, *7*, 3959.
280. Krasaekoopt, W.; Bhandari, B.; Deeth, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* **2003**, *13*, 3-13.

281. Krokida, M.K.; Maroulis, Z.B.; Saravacos, G.D. The effect of the method of drying on the colour of dehydrated products. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2001**, *36*, 53-59.
282. Krystallis, A.; Maglaras, G.; Mamalis, S. Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 525-538.
283. Kun, S.; Rezessy-Szabó, J.M.; Nguyen, Q.D.; Hoschke, Á. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. *Process Biochemistry* **2008**, *43*, 816-821.
284. Kuntic, V.; Brboric, J.; Holclajtner-Antunovic, I.; Uskokovic-Markovic, S. Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin--a new literature data survey. *Vojnosanit. Pregl.* **2014**, *71*, 60-65.
285. Kurtmann, L.; Carlsen, C.U.; Risbo, J.; Skibsted, L.H. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology* **2009**, *58*, 175-180.
286. Kwak, N.; Jukes, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control* **2001**, *12*, 99-107.
287. Kwok, B.H.L.; HU, C.; Durance, T.; Kitts, D.D. Dehydration Techniques Affect Phytochemical Contents and Free Radical Scavenging Activities of Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *J. Food Sci.* **2004**, *69*, SNQ122-SNQ126.
288. L'homme, C.; Puigserver, A.; Biagini, A. Effect of food-processing on the degradation of fructooligosaccharides in fruit. *Food Chem.* **2003**, *82*, 533-537.
289. Labuza, T.P. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology (USA)* **1980**,
290. Laparra, J.M.; Sanz, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61*, 219-225.
291. Laroche, C.; Beney, L.; Marechal, P.; Gervais, P. The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 249-254.
292. Larrauri, J.A.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1390-1393.
293. Larrosa, M.; González-Sarrías, A.; Yáñez-Gascón, M.J.; Selma, M.V.; Azorín-Ortuño, M.; Toti, S.; Tomás-Barberán, F.; Dolara, P.; Espín, J.C. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon

- inflammation on phenolic metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **2010**, *21*, 717-725.
294. Lavelli, V.; Corti, S. Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1578-1583.
295. Lavelli, V.; Vantaggi, C. Rate of antioxidant degradation and color variations in dehydrated apples as related to water activity. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4733-4738.
296. Lavermicocca, P.; Valerio, F.; Lonigro, S.L.; De Angelis, M.; Morelli, L.; Callegari, M.L.; Rizzello, C.G.; Visconti, A. Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4233-4240.
297. Lavermicocca, P. Highlights on new food research. *Digestive and Liver Disease* **2006**, *38*, Supplement 2, S295-S299.
298. Lee, B.; Kim, J.; Kang, Y.M.; Lim, J.; Kim, Y.; Lee, M.; Jeong, M.; Ahn, C.; Je, J. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chem.* **2010**, *122*, 271-276.
299. Lee, H.S.; Coates, G.A. Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled orange juice: a storage study. *Food Chem.* **1999**, *65*, 165-168.
300. Lee, H.S.; Coates, G.A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *LWT - Food Science and Technology* **2003**, *36*, 153-156.
301. Lee, K.W.; Kim, Y.J.; Kim, D.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6516-6520.
302. Lemetais, G.; Dupont, S.; Beney, L.; Gervais, P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 471-480.
303. Lemmens, L.; Colle, I.; Van Buggenhout, S.; Palmero, P.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *38*, 125-135.
304. Leontowicz, M.; Gorinstein, S.; Leontowicz, H.; Krzeminski, R.; Lojek, A.; Katrich, E.; Ciz, M.; Martin-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R.; Haruenkit, R.; Trakhtenberg, S. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5780-5785.

305. Leontowicz, M.; Gorinstein, S.; Bartnikowska, E.; Leontowicz, H.; Kulasek, G.; Trakhtenberg, S. Sugar beet pulp and apple pomace dietary fibers improve lipid metabolism in rats fed cholesterol. *Food Chem.* **2001**, *72*, 73-78.
306. Lesbros-Pantoflickova, D.; Corthesy-Theulaz, I.; Blum, A.L. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 812S-8S.
307. Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; Hamady, M.; Knight, R.; Gordon, J.I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 776-788.
308. Li, N.; Russell, W.M.; DOUGLAS-Escobar, M.; Hauser, N.; Lopez, M.; Neu, J. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: Effects on Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines/Chemokines in Gastrostomy-Fed Infant Rats. *Pediatr. Res.* **2009**, *66*, 203-207.
309. Licht, T.R.; Hansen, M.; Bergstrom, A.; Poulsen, M.; Krath, B.N.; Markowski, J.; Dragsted, L.O.; Wilcks, A. Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: role of apple pectin. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 13-2180-10-13.
310. Lin, D.S.; Leonard, S.W.; Lederer, C.; Traber, M.G.; Zhao, Y. Retention of Fortified Vitamin E and Sensory Quality of Fresh-Cut Pears by Vacuum Impregnation With Honey. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, S553-S559.
311. Linders, L.J.; Wolkers, W.F.; Hoekstra, F.A.; van 't Riet, K. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* **1997**, *35*, 31-40.
312. Liu, D.; Li, L.; Yang, X.; Liang, S.; Wang, J. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. *Food Technology and Biotechnology* **2006**, *44*, 417-422.
313. Liu, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 3479S-3485S.
314. Liu, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 517S-520S.
315. Lloyd-Williams, F.; Mwatsama, M.; Ireland, R.; Capewell, S. Small changes in snacking behaviour: the potential impact on CVD mortality. *Public Health Nutr.* **2009**, *12*, 871-876.
316. Lorca, G.L.; de Valdez, G.F. The Effect of Suboptimal Growth Temperature and Growth Phase on Resistance of *Lactobacillus acidophilus* to Environmental Stress. *Cryobiology* **1999**, *39*, 144-149.
317. Losada, M.A.; Olleros, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. *Nutr. Res.* **2002**, *22*, 71-84.
318. Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 1-17.

319. Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 1-17.
320. Luckow, T.; Delahunty, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Res. Int.* **2004**, *37*, 805-814.
321. Luckow, T.; Delahunty, C. Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 751-759.
322. Luckow, T.; Sheehan, V.; Fitzgerald, G.; Delahunty, C. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite* **2006**, *47*, 315-323.
323. Macfarlane, G.T.; Steed, H.; Macfarlane, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 305-344.
324. Macfarlane, G.T.; Cummings, J.H. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *West. J. Med.* **1999**, *171*, 187-191.
325. Macfarlane, S.; Macfarlane, G.T.; Cummings, J.H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *24*, 701-714.
326. Maillard, M.; Berset, C. Evolution of Antioxidant Activity during Kilning: Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1789-1793.
327. Makinen, K.; Berger, B.; Bel-Rhliid, R.; Ananta, E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 356-365.
328. Maltini, E.; Torreggiani, D.; Venir, E.; Bertolo, G. Water activity and the preservation of plant foods. *Food Chem.* **2003**, *82*, 79-86.
329. Manso, M.C.; Oliveira, F.A.R.; Oliveira, J.C.; Frías, J.M. Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2001**, *36*, 303-312.
330. Manzocco, L.; Calligaris, S.; Mastrocola, D.; Nicoli, M.C.; Lerici, C.R. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 340-346.
331. Marques, L.G.; Prado, M.M.; Freire, J.T. Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits. *LWT-Food Science and Technology* **2009**, *42*, 1232-1237.
332. Mark-Herbert, C. Functional food for added value. Developing and marketing a new product category. 2002. Doctoral dissertation. ISSN 1401-6249, ISBN 91-576-5837-4.

333. Marteau, P.; Flourie, B. Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *Br. J. Nutr.* **2001**, *85 Suppl 1*, S17-21.
334. Mårtensson, O.; Öste, R.; Holst, O. The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 775-784.
335. Martínez-Monzó, J.; Barat, J.M.; González-Martínez, C.; Chiralt, A.; Fito, P. Changes in thermal properties of apple due to vacuum impregnation. *J. Food Eng.* **2000**, *43*, 213-218.
336. Martínez-Monzó, J.; Martínez-Navarrete, N.; Chiralt, A.; fito, P. Mechanical and Structural Changes in Apple (Var. Granny Smith) Due to Vacuum Impregnation with Cryoprotectants. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 499-503.
337. Mattila-Sandholm, T.; Myllärinen, P.; Crittenden, R.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Saarela, M. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 173-182.
338. Mattila-Sandholm, T.; Mättö, J.; Saarela, M. Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* **1999**, *9*, 25-35.
339. Maynard, M.; Gunnell, D.; Emmett, P.; Frankel, S.; Davey Smith, G. Fruit, vegetables, and antioxidants in childhood and risk of adult cancer: the Boyd Orr cohort. *J. Epidemiol. Community Health* **2003**, *57*, 218-225.
340. McClements, D.J.; Zou, L.; Zhang, R.; Salvia-Trujillo, L.; Kumosani, T.; Xiao, H. Enhancing Nutraceutical Performance Using Excipient Foods: Designing Food Structures and Compositions to Increase Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2015**, *14*, 824-847.
341. McEvily, A.J.; Iyengar, R.; Otwell, W.S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 253-273.
342. Megías-Pérez, R.; Gamboa-Santos, J.; Soria, A.C.; Villamiel, M.; Montilla, A. Survey of quality indicators in commercial dehydrated fruits. *Food Chem.* **2014**, *150*, 41-48.
343. Mejia-Meza, E.I.; Yanez, J.A.; Remsberg, C.M.; Takemoto, J.K.; Davies, N.M.; Rasco, B.; Clary, C. Effect of dehydration on raspberries: polyphenol and anthocyanin retention, antioxidant capacity, and antiadipogenic activity. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, H5-12.
344. Meléndez-Martínez, A.; Escudero-Gilete, M.; Vicario, I.; Heredia, F. Effect of increased acidity on the carotenoid pattern and colour of orange juice. *European Food Research and Technology* **2010**, *230*, 527-532.

345. Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Francisco J., H. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **2004**, *54*, 149-155.
346. Meléndez-Martínez, A.J.; Gómez-Robledo, L.; Melgosa, M.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. Color of orange juices in relation to their carotenoid contents as assessed from different spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 837-844.
347. Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chem.* **2007**, *101*, 177-184.
348. Meng, X.C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F.; Daly, C.; Ross, R.P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1406-1416.
349. Menrad, K. Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Eng.* **2003**, *56*, 181-188.
350. Michiels, J.A.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommès, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chem.* **2012**, *130*, 986-993.
351. Milhaud, J. New insights into water-phospholipid model membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2004**, *1663*, 19-51.
352. Moayednia, N.; Ehsani, M.R.; Emamdjomeh, Z.; Mazaheri Asadi, M.; Mizani, M.; Mazaheri, A.F. Effect of Refrigeration on Viability of Immobilized Probiotic Bacteria in Alginate Coat of Strawberry. *IDOS/ publication, World Applied science J* **2010**, *10*, 472-476.
353. Mohammadi, R.; Mortazavian, A.; Khosrokhavar, R.; da Cruz, A. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology* **2011**, *61*, 411-424.
354. Moraga, G.; Igual, M.; García-Martínez, E.; Mosquera, L.H.; Martínez-Navarrete, N. Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. *J. Food Eng.* **2012**, *112*, 191-199.
355. Moraga, G.; Talens, P.; Moraga, M.J.; Martínez-Navarrete, N. Implication of water activity and glass transition on the mechanical and optical properties of freeze-dried apple and banana slices. *J. Food Eng.* **2011**, *106*, 212-219.
356. Moraga, M.J.; Moraga, G.; Fito, P.J.; Martínez-Navarrete, N. Effect of vacuum impregnation with calcium lactate on the osmotic dehydration kinetics and quality of osmodehydrated grapefruit. *J. Food Eng.* **2009**, *90*, 372-379.
357. Morand, C.; Dubray, C.; Milenkovic, D.; Lioger, D.; Martin, J.F.; Scalbert, A.; Mazur, A. Hesperidin contributes to the vascular protective

- effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 73-80.
358. Moreno, J.; Bugueño, G.; Velasco, V.; Petzold, G.; Tabilo-Munizaga, G. Osmotic Dehydration and Vacuum Impregnation on Physicochemical Properties of Chilean Papaya (*Carica candamarcensis*). *J. Food Sci.* **2004**, *69*, FEP102-FEP106.
359. Moreno, J.; Chiralt, A.; Escriche, I.; Serra, J.A. Effect of blanching/osmotic dehydration combined methods on quality and stability of minimally processed strawberries. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 609-616.
360. Morgan, C.A.; Herman, N.; White, P.A.; Vesey, G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *66*, 183-193.
361. Morishita, T.; Deguchi, Y.; Yajima, M.; Sakurai, T.; Yura, T. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **1981**, *148*, 64-71.
362. Mouly, P.P.; Arzouyan, C.R.; Gaydou, E.M.; Estienne, J.M. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 70-79.
363. Mousavi, Z.E.; Mousavi, S.M.; Razavi, S.H.; Emam-Djomeh, Z.; Kiani, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2011**, *27*, 123-128.
364. Mújica-Paz, H.; Valdez-Fragoso, A.; López-Malo, A.; Palou, E.; Welti-Chanes, J. Impregnation properties of some fruits at vacuum pressure. *J. Food Eng.* **2003**, *56*, 307-314.
365. Muller, J.A.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. Manufacture of probiotic bacteria. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* **2009**, 725-759.
366. Murata, M.; Noda, I.; Homma, S. Enzymatic Browning of Apples on the Market: Relationship between Browning, Polyphenol Content, and Polyphenol Oxidase. *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI* **1995**, *42*, 820-826.
367. Mutch, D.M.; Wahli, W.; Williamson, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1602-1616.
368. Nadal, I.; Donat, E.; Ribes-Koninckx, C.; Calabuig, M.; Sanz, Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56*, 1669-1674.
369. Nagasako-Akazome, Y.; Kanda, T.; Ohtake, Y.; Shimasaki, H.; Kobayashi, T. Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in

- healthy subjects with relatively high body mass index. *J. Oleo Sci.* **2007**, *56*, 417-428.
370. Nagy, S. Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 8-18.
371. Nandakumar, N.; Balasubramanian, M.P. Hesperidin a citrus bioflavonoid modulates hepatic biotransformation enzymes and enhances intrinsic antioxidants in experimental breast cancer rats challenged with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2012**, *9*, 321-335.
372. Naruszewicz, M.; Zapolska-Downar, D.; Kosmider, A.; Nowicka, G.; Kozłowska-Wojciechowska, M.; Vikstrom, A.S.; Tornqvist, M. Chronic intake of potato chips in humans increases the production of reactive oxygen radicals by leukocytes and increases plasma C-reactive protein: a pilot study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 773-777.
373. Naughton, P.J.; Mikkelsen, L.L.; Jensen, B.B. Effects of Nondigestible Oligosaccharides on Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Nonpathogenic Escherichia coli in the Pig Small Intestine In Vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3391-3395.
374. Navarro, P.; Perez-Lopez, A.J.; Mercader, M.T.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Gabaldon, J.A. Antioxidant activity, color, carotenoids composition, minerals, vitamin C and sensory quality of organic and conventional mandarin juice, cv. Orogrande. *Food Sci. Technol. Int.* **2011**, *17*, 241-248.
375. Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Sada, A.; Orlando, P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with Lactobacillus spp. and inulin or fructooligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 2271-2276.
376. Nicolas, J.J.; Richard-Forget, F.C.; Goupy, P.M.; Amiot, M.J.; Aubert, S.Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1994**, *34*, 109-157.
377. Nicoli, M.C.; Anese, M.; Parpinel, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 94-100.
378. Nijhuis, H.H.; Torringa, H.M.; Muresan, S.; Yuksel, D.; Leguijt, C.; Kloek, W. Approaches to improving the quality of dried fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 13-20.
379. Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishii, T.; Yano, M.; Ohta, H. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 178-192.
380. Noorbakhsh, R.; Yaghmaee, P.; Durance, T. Radiant energy under vacuum (REV) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks. *Journal of Functional Foods* **2013**, *5*, 1049-1056.

381. Norrish, R.S. An equation for the activity coefficients and equilibrium relative humidities of water in confectionery syrups. *Int. J. Food Sci. Tech.* **1966**, *1*, 25-39.
382. Nualkaekul, S.; Charalampopoulos, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 111-117.
383. Nualkaekul, S.; Salmeron, I.; Charalampopoulos, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1037-1044.
384. Nualkaekul, S.; Deepika, G.; Charalampopoulos, D. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 627-633.
385. Nualkaekul, S.; Salmeron, I.; Charalampopoulos, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1037-1044.
386. Obarzanek, E.; Sacks, F.M.; Vollmer, W.M.; Bray, G.A.; Miller, E.R.; Lin, P.; Karanja, N.M.; Most-Windhauser, M.M.; Moore, T.J.; Swain, J.F.; Bales, C.W.; Proschan, M.A.; on behalf of the DASH Research Group Effects on blood lipids of a blood pressure–lowering diet: the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2001**, *74*, 80-89.
387. O'Brien, J.; Crittenden, R.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S. Safety evaluation of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 418-424.
388. Occhino, E.; Hernando, I.; Llorca, E.; Neri, L.; Pittia, P. Effect of Vacuum Impregnation Treatments to Improve Quality and Texture of Zucchini (*Cucurbita Pepo*, L). *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 829-835.
389. Oszmiański, J.; Wolniak, M.; Wojdyło, A.; Wawer, I. Influence of apple purée preparation and storage on polyphenol contents and antioxidant activity. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1473-1484.
390. Ouwehand, A.C. Antiallergic Effects of Probiotics. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 794S-797S.
391. Pérez-López, A.; Beltran, F.; Serrano-Megías, M.; López, D.; Carbonell-Barrachina, A.A. Changes in orange juice color by addition of mandarin juice. *European Food Research and Technology* **2006**, *222*, 516-520.
392. Palmfeldt, J.; Hahn-Hagerdal, B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *55*, 235-238.
393. Panarese, V.; Dejmek, P.; Rocculi, P.; Gómez Galindo, F. Microscopic studies providing insight into the mechanisms of mass transfer in vacuum impregnation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2013**, *18*, 169-176.

394. Pang, G.; Xie, J.; Chen, Q.; Hu, Z. How functional foods play critical roles in human health. *Food Science and Human Wellness* **2012**, *1*, 26-60.
395. Park, H.J.; Kim, M.; Ha, E.; Chung, J. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 147-151.
396. Park, S.; Kodihalli, I.; Zhao, Y. Nutritional, Sensory, and Physicochemical Properties of Vitamin E- and Mineral-fortified Fresh-cut Apples by Use of Vacuum Impregnation. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, S593-S599.
397. Park, Y.B.; Do, K.M.; Bok, S.H.; Lee, M.K.; Jeong, T.S.; Choi, M.S. Interactive effect of hesperidin and vitamin E supplements on cholesterol metabolism in high cholesterol-fed rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2001**, *71*, 36-44.
398. Parkar, S.G.; Stevenson, D.E.; Skinner, M.A. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *124*, 295-298.
399. Passot, S.; Cenard, S.; Douania, I.; Tréléa, I.C.; Fonseca, F. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1699-1705.
400. Pereira, A.L.F.; Maciel, T.C.; Rodrigues, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1276-1283.
401. Pereira-Caro, G.; Oliver, C.M.; Weerakkody, R.; Singh, T.; Conlon, M.; Borges, G.; Sanguansri, L.; Lockett, T.; Roberts, S.A.; Crozier, A.; Augustin, M.A. Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *84*, 206-214.
402. Perez-Cabrera, L.; Chafer, M.; Chiralt, A.; Gonzalez-Martinez, C. Effectiveness of antibrowning agents applied by vacuum impregnation on minimally processed pear. *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44*, 2273-2280.
403. Peterson, J.J.; Beecher, G.R.; Bhagwat, S.A.; Dwyer, J.T.; Gebhardt, S.E.; Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. Critical Review. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, S74-S80.
404. Phoon, P.Y.; Galindo, F.G.; Vicente, A.; Dejmek, P. Pulsed electric field in combination with vacuum impregnation with trehalose improves the freezing tolerance of spinach leaves. *J. Food Eng.* **2008**, *88*, 144-148.
405. Piernas, C.; Popkin, B.M. Snacking Increased among U.S. Adults between 1977 and 2006. *The Journal of Nutrition* **2010**, *140*, 325-332.
406. Pimentel, T.C.; Madrona, G.S.; Garcia, S.; Prudencio, S.H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during

- refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, *63*, 415-422.
407. Planchon, V.; Lateur, M.; Dupont, P.; Lognay, G. Ascorbic acid level of Belgian apple genetic resources. *Scientia Horticulturae* **2004**, *100*, 51-61.
408. Plaza, L.; Crespo, I.; de Pascual-Teresa, S.; de Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C.; Muñoz, M.; Cano, M.P. Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage. *Food Chem.* **2011**, *124*, 646-651.
409. Poddar, D.; Das, S.; Jones, G.; Palmer, J.; Jameson, G.B.; Haverkamp, R.G.; Singh, H. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *Int. Dairy J.* **2014**, *39*, 1-7.
410. Polydera, A.C.; Stoforos, N.G.; Taoukis, P.S. Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chem.* **2005**, *91*, 495-503.
411. Polydera, A.C.; Stoforos, N.G.; Taoukis, P.S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *J. Food Eng.* **2003**, *60*, 21-29.
412. Ponappa, T.; Scheerens, J.C.; Miller, A.R. Vacuum Infiltration of Polyamines Increases Firmness of Strawberry Slices Under Various Storage Conditions. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 361-364.
413. Poolman, B.; Glaasker, E. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 397-407.
414. Potter, R.; Stojceska, V.; Plunkett, A. The use of fruit powders in extruded snacks suitable for Children's diets. *LWT - Food Science and Technology* **2013**, *51*, 537-544.
415. Potts, M. Desiccation tolerance: a simple process? *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 553-559.
416. Prado, F.C.; Parada, J.L.; Pandey, A.; Socol, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 111-123.
417. Prothon, F.; Ahrné, L.M.; Funebo, T.; Kidman, S.; Langton, M.; Sjöholm, I. Effects of Combined Osmotic and Microwave Dehydration of Apple on Texture, Microstructure and Rehydration Characteristics. *LWT - Food Science and Technology* **2001**, *34*, 95-101.
418. Purcell, A.E.; Walter, W.M.; Thompkins, W.T. Relation of vegetable color to physical state of the carotenes. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 41-42.
419. Puupponen-Pimiä, R.; Aura, A.; Oksman-Caldentey, K.; Myllärinen, P.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Poutanen, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 3-11.

420. Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.-. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*,494-507.
421. Quintero Ruiz, N.A.; Demarchi, S.M.; Massolo, J.F.; Rodoni, L.M.; Giner, S.A. Evaluation of quality during storage of apple leather. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, *47*, 485-492.
422. Ragoonanan, V.; Malsam, J.; Bond, D.R.; Aksan, A. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778*, 2283-2290.
423. Rahman, M.S. Food stability determination by macro–micro region concept in the state diagram and by defining a critical temperature. *J. Food Eng.* **2010**, *99*, 402-416.
424. Rakin, M.; Vukasinovic, M.; Siler-Marinkovic, S.; Maksimovic, M. Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chem.***2007**, *100*, 599-602.
425. Ramesh, V.; Kumar, R.; Singh, R.R.B.; Kaushik, J.K.; Mann, B. Comparative evaluation of selected strains of lactobacilli for the development of antioxidant activity in milk. *Dairy Science & Technology***2012**, *92*, 179-188.
426. Ranadheera, R.D.C.S.; Baines, S.K.; Adams, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1-7.
427. Rao, A.V. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1442S-5S.
428. Rao, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutr. Res.* **2001**, *21*, 843-848.
429. Rapisarda, P.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Bonina, F.; De Pasquale, A.; Saija, A. Antioxidant Effectiveness As Influenced by Phenolic Content of Fresh Orange Juices. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4718-4723.
430. Rastall, R.A. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 305-339.
431. Ratti, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *J. Food Eng.* **2001**, *49*, 311-319.
432. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*,1231-1237.
433. Rea, G.; Antonacci, A.; Lambreva, M.; Pastorelli, S.; Tibuzzi, A.; Ferrari, S.; Fischer, D.; Johanningmeier, U.; Oleszek, W.; Doroszewska, T.; Rizzo, A.M.; Berselli, P.V.R.; Berra, B.; Bertoli, A.; Pistelli, L.; Ruffoni, B.; Calas-Blanchard, C.; Marty, J.L.; Litescu, S.C.; Diaconu, M.;

- Touloupakis, E.; Ghanotakis, D.; Giardi, M.T. Integrated plant biotechnologies applied to safer and healthier food production: The Nutra-Snack manufacturing chain. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 353-366.
434. Reddy, B.S. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1478S-82S.
435. Reeve, R.M. Histological investigations of texture in apples. *J. Food Sci.* **1953**, *18*, 604-617.
436. Regmi, A.; Gehlhar, M.J. New directions in global food market (USDA, Trans). En A. Regmi, M.J. Gehlhar (Eds), Agriculture Information Bulletin 2005 (pp.81) Economic Research Services USDA
437. Rivera-Espinoza, Y.; Gallardo-Navarro, Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 1-11.
438. Rivera-Espinoza, Y.; Gallardo-Navarro, Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 1-11.
439. Riveros, B.; Ferrer, J.; BÃ³rquez, R. Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technol* **2009**, *27*, 123-132.
440. Rizzolo, A.; Vanoli, M.; Cortellino, G.; Spinelli, L.; Torricelli, A. Quality characteristics of air-dried apple rings: Influence of storage time and fruit maturity measured by time-resolved reflectance spectroscopy. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 216-223.
441. Roberfroid, M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1993**, *33*, 103-148.
442. Roberfroid, M.; Gibson, G.R.; Hoyles, L.; McCartney, A.L.; Rastall, R.; Rowland, I.; Wolvers, D.; Watzl, B.; Szajewska, H.; Stahl, B.; Guarner, F.; Respondek, F.; Whelan, K.; Coxam, V.; Davicco, M.J.; Leotoing, L.; Wittrant, Y.; Delzenne, N.M.; Cani, P.D.; Neyrinck, A.M.; Meheust, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104 Suppl 2*, S1-63.
443. Roberfroid, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1660S-4S; discussion 1674S-5S.
444. Roberfroid, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1682S-7S; discussion 1688S-90S.
445. Roberfroid, M.B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br. J. Nutr.* **1998**, *80*, S197-202.
446. Roberfroid, M.B.; Van Loo, J.A.E.; Gibson, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 11-19.

447. Rocha, A.M.C.N.; De Morais, A.M.M.B. Polyphenoloxidase activity of minimally processed Jonagored apples (*Malus domestica*). *J. Food Process. Preserv.* **2005**, *29*, 8-19.
448. Rocha, A.M.; Morais, A.M. Polyphenoloxidase activity and total phenolic content as related to browning of minimally processed Jonagored apple. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 120-126.
449. Rock, C.L.; Jacob, R.A.; Bowen, P.E. Update on the Biological Characteristics of the Antioxidant Micronutrients: Vitamin C, Vitamin E, and the Carotenoids. *J. Am. Diet. Assoc.* **1996**, *96*, 693-702.
450. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. John Snow Incorporated/OMNI Project Arlington, VA: 1997;
451. Rodriguez-Mateos, A.; Vauzour, D.; Krueger, C.; Shanmuganayagam, D.; Reed, J.; Calani, L.; Mena, P.; Del Rio, D.; Crozier, A. Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1803-1853.
452. Roig M.G.; Bello J.F.; Rivera Z.S.; Kennedy J.F. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Res. Int.* **1999**, *32*, 609-619.
453. Rojas-Graü, M.A.; Sobrino-López, A.; Soledad Tapia, M.; Martín-Belloso, O. Browning Inhibition in Fresh-cut Fuji Apple Slices by Natural Antibrowning Agents. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, S59-S65.
454. Roos, Y.H. Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 469-496.
455. Roos, Y.; Karel, M. Water and Molecular Weight Effects on Glass Transitions in Amorphous Carbohydrates and Carbohydrate Solutions. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 1676-1681.
456. Rößle, C.; Brunton, N.; Gormley, R.T.; Ross, P.R.; Butler, F. Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices. *Journal of Functional Foods* **2010**, *2*, 245-254.
457. Rößle, C.; Brunton, N.; Gormley, T.R.; Butler, F. Quality and antioxidant capacity of fresh-cut apple wedges enriched with honey by vacuum impregnation. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2011**, *46*, 626-634.
458. Rowland, I.R.; Rumney, C.J.; Coutts, J.T.; Lievens, L.C. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 281-285.
459. Rózek, A.; Achaerandio, I.; Güell, C.; López, F.; Ferrando, M. Grape phenolic impregnation by osmotic treatment: Influence of osmotic agent on mass transfer and product characteristics. *J. Food Eng.* **2009**, *94*, 59-68.

460. Rózek, A.; García-Pérez, J.V.; López, F.; Güell, C.; Ferrando, M. Infusion of grape phenolics into fruits and vegetables by osmotic treatment: Phenolic stability during air drying. *J. Food Eng.* **2010**, *99*, 142-150.
461. Rumney, C.; Rowland, I. Non-digestible oligosaccharides ? potential anticancer agents? *Nutr. Bull.* **1995**, *20*, 194-203.
462. Rupasinghe, H.P.V.; Joshi, A.P.K. Phytochemicals and Health Benefits of Dried Apple Snacks, In *Dried Fruits*, Anonymous ; Blackwell Publishing Ltd.: 2013; pp. 211-225.
463. Rupasinghe, H.P.V.; Wang, L.; Huber, G.M.; Pitts, N.L. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1217-1224.
464. Ryan, K.A.; O'Hara, A.M.; van Pijkeren, J.P.; Douillard, F.P.; O'Toole, P.W. Lactobacillus salivarius modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in Helicobacter pylori. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 996-1005.
465. Sá, M.M.; Figueiredo, A.M.; Sereno, A.M. Glass transitions and state diagrams for fresh and processed apple. *Thermochimica Acta* **1999**, *329*, 31-38.
466. Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; Elez-Martínez, P.; De Ancos, B.; Martín-Belloso, O.; Cano, M.P. Impact of High Pressure and Pulsed Electric Fields on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Orange Juice in Comparison with Traditional Thermal Processing. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4403-4409.
467. Saarela, M.; Alakomi, H.-.; Mättö, J.; Ahonen, A.-.; Tynkkynen, S. Acid tolerant mutants of Bifidobacterium animalis subsp. lactis with improved stability in fruit juice. *LWT - Food Science and Technology* **2011**, *44*, 1012-1018.
468. Saarela, M.; Rantala, M.; Hallamaa, K.; Nohynek, L.; Virkajärvi, I.; Mättö, J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 1205-1214.
469. Saarela, M.; Virkajärvi, I.; Nohynek, L.; Vaari, A.; Mättö, J. Fibres as carriers for Lactobacillus rhamnosus during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *112*, 171-178.
470. Saarela, M.H.; Alakomi, H.-.; Puhakka, A.; Mättö, J. Effect of the fermentation pH on the storage stability of Lactobacillus rhamnosus preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1204-1212.
471. Saarela, M.; Virkajärvi, I.; Alakomi, H.; Sigvart-Mattila, P.; Mättö, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1477-1482.

472. Saavedra, J.; Tschernia, A.; Moore, N.; Abi-Hanna, A.; Coletta, F.; Emenhiser, C.; Yolken, R. Gastro-intestinal function in infants consuming a weaning food supplemented with oligofructose, a prebiotic. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1999**, *29*,
473. Sablé-Amplis, R.; Sicart, R.; Agid, R. Further studies on the cholesterol-lowering effect of apple in human. Biochemical mechanisms involved. *Nutr. Res.* **1983**, *3*, 325-328.
474. Sacchetti, G.; Cocci, E.; Pinnavaia, G.; Mastrocola, D.; Rosa, M.D. Influence of processing and storage on the antioxidant activity of apple derivatives. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2008**, *43*, 797-804.
475. Sadler, J. Innovation in functional food and drinks. En J. Sedler (Ed), Growth opportunities from new nutraceutical ingredients: Business Insights Ltd. 2005.
476. Sagar, V.R.; Suresh Kumar, P. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology* **2010**, *47*, 15-26.
477. Sakai, A.; Nakanishi, M.; Yoshiyama, K.; Maki, H. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes to Cells* **2006**, *11*, 767-778.
478. Salgado, J.M.; Curte, F.; Mansi, D. Effect of gala apples (*Malus domestica* Borkh) on lipidemia of hyperlipidemic rats. *Food Science and Technology (Campinas)* **2008**, *28*, 477-484.
479. Salminen, S.; von Wright, A.; Morelli, L.; Marteau, P.; Brassart, D.; de Vos, W.M.; Fondén, R.; Saxelin, M.; Collins, K.; Mogensen, G.; Birkeland, S.; Mattila-Sandholm, T. Demonstration of safety of probiotics — a review. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *44*, 93-106.
480. Salvatori, D.; Andrés, a.; Chiralt, A.; Fito, P. the response of some properties of fruits to vacuum impregnation. *J. Food Process Eng.* **1998**, *21*, 59-73.
481. Samona, A.; Robinson, R.K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* **1991**, *44*, 64-66.
482. Sanchez, D.; Muguerza, B.; Moulay, L.; Hernandez, R.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Highly methoxylated pectin improves insulin resistance and other cardiometabolic risk factors in Zucker fatty rats. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3574-3581.
483. Sanchez-Moreno, C.; Plaza, L.; De Ancos, B.; Cano, M.P. Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 647-653.
484. Sánchez-Moreno, C.; Plaza, L.; de Ancos, B.; Cano, M.P. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the

- antioxidant capacity of commercial orange juices. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 430-439.
485. Sanders, M.E. Overview of Functional Foods: Emphasis on Probiotic Bacteria. *Int. Dairy J.* **1998**, *8*, 341-347.
486. Sangeetha, P.T.; Ramesh, M.N.; Prapulla, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 442-457.
487. Santacruz, A.; Marcos, A.; Warnberg, J.; Marti, A.; Martin-Matillas, M.; Campoy, C.; Moreno, L.A.; Veiga, O.; Redondo-Figuero, C.; Garagorri, J.M.; Azcona, C.; Delgado, M.; Garcia-Fuentes, M.; Collado, M.C.; Sanz, Y.; EVASYON Study Group Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* **2009**, *17*, 1906-1915.
488. Santivarangkna, C.; Higl, B.; Foerst, P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 429-441.
489. Santivarangkna, C.; Kulozik, U.; Foerst, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 302-315.
490. Sanzana, S.; Gras, M.L.; Vidal-Brotóns, D. Functional foods enriched in Aloe vera. Effects of vacuum impregnation and temperature on the respiration rate and the respiratory quotient of some vegetables. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 1528-1533.
491. Sapers, G.M.; Hicks, K.B.; Phillips, J.G.; Garzarella, L.; Pondish, D.L.; Matulaitis, R.M.; McCormack, T.J.; Sondey, S.M.; Seib, P.A.; Ei-atawy, Y.S. Control of Enzymatic Browning in Apple with Ascorbic Acid Derivatives, Polyphenol Oxidase Inhibitors, and Complexing Agents. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 997-1002.
492. Sapers, G.M.; Miller, R.L. Heated Ascorbic/Citric Acid Solution as Browning Inhibitor for Pre-Peeled Potatoes. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 762-766.
493. Schieber, A. Functional Foods and Nutraceuticals. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 437.
494. Scholz-Ahrens, K.E.; Schaafsma, G.; van den Heuvel, E.G.; Schrezenmeir, J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 459S-464S.
495. Schulze, B.; Hubbermann, E.M.; Schwarz, K. Stability of quercetin derivatives in vacuum impregnated apple slices after drying (microwave vacuum drying, air drying, freeze drying) and storage. *LWT - Food Science and Technology* **2014**, *57*, 426-433.
496. Schulze, B.; Peth, S.; Hubbermann, E.M.; Schwarz, K. The influence of vacuum impregnation on the fortification of apple parenchyma with

- quercetin derivatives in combination with pore structures X-ray analysis. *J. Food Eng.* **2012**, *109*, 380-387.
497. Schwab, C.; Vogel, R.; Gänzle, M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology* **2007**, *55*, 108-114.
498. Schwab, C.; Walter, J.; Tannock, G.W.; Vogel, R.F.; Gänzle, M.G. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst. Appl. Microbiol.* **2007**, *30*, 433-443.
499. Schwartz, S.E.; Levine, R.A.; Singh, A.; Scheidecker, J.R.; Track, N.S. Sustained pectin ingestion delays gastric emptying. *Gastroenterology* **1982**, *83*, 812-817.
500. Sdiri, S.; Navarro, P.; Monterde, A.; Benabda, J.; Salvador, A. Effect of postharvest degreening followed by a cold-quarantine treatment on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity of early-season citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, *65*, 13-21.
501. Selmer-Olsen, E.; Birkeland, S.; Sorhaug, T. Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *87*, 429-437.
502. Serra, A.T.; Rocha, J.; Sepodes, B.; Matias, A.A.; Feliciano, R.P.; de Carvalho, A.; Bronze, M.R.; Duarte, C.M.M.; Figueira, M.E. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – Correlation of response with composition. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2378-2386.
503. Shabala, L.; McMeekin, T.; Budde, B.B.; Siegumfeldt, H. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *110*, 1-7.
504. Shah, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technol.* **2001**, *55*, 46.
505. Shah, N.P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 894-907.
506. Shah, N.P.; Ding, W.K.; Fallourd, M.J.; Leyer, G. Improving the Stability of Probiotic Bacteria in Model Fruit Juices Using Vitamins and Antioxidants. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, M278-M282.
507. Shah, N.P.; Ravula, R.R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* **2000**, *55*, 127-131.
508. Sheehan, V.M.; Ross, P.; Fitzgerald, G.F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2007**, *8*, 279-284.

509. Shimizu, M.; Hachimura, S. Gut as a target for functional food. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 646-650.
510. Shimizu, T. Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutr. Res. Rev.* **2003**, *16*, 241-252.
511. Shin, H.-.; Lee, J.-.; Pestka, J.J.; Ustunol, Z. Growth and Viability of Commercial Bifidobacterium spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 884-887.
512. Shinoda, Y.; Komura, H.; Homma, S.; Murata, M. Browning of model orange juice solution: factors affecting the formation of decomposition products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 2129-2137.
513. Shyu, S.; Hwang, L.S. Effects of processing conditions on the quality of vacuum fried apple chips. *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 133-142.
514. Siegrist, M.; Stampfli, N.; Kastenholz, H. Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. *Appetite* **2008**, *51*, 526-529.
515. Sijtsema, S.J.; Jesionkowska, K.; Symoneaux, R.; Konopacka, D.; Snoek, H. Perceptions of the health and convenience characteristics of fresh and dried fruits. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, *49*, 275-281.
516. Silva, R.D.; Sotoca, R.; Johansson, B.; Ludovico, P.; Sansonetty, F.; Silva, M.T.; Peinado, J.M.; Corte-Real, M. Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 824-834.
517. Simonin, H.; Beney, L.; Gervais, P. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, *1768*, 1600-1610.
518. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144-158.
519. Siro, I.; Kapolna, E.; Kapolna, B.; Lugasi, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite* **2008**, *51*, 456-467.
520. Sloan, A.E. The Top Ten Functional Food Trends. *Food Technol.* **2000**, *54*, 33-62.
521. Smith, J.; Hardacre, A. Development of an extruded snack product from the legume *Vicia faba minor*. *Procedia Food Science* **2011**, *1*, 1573-1580.
522. So, F.V.; Guthrie, N.; Chambers, A.F.; Moussa, M.; Carroll, K.K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr. Cancer* **1996**, *26*, 167-181.

523. Sohail, A.; Turner, M.S.; Prabawati, E.K.; Coombes, A.G.A.; Bhandari, B. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 162-166.
524. Song, Y.; Yao, Y.; Zhai, H.; Du, Y.; Chen, F.; Shu-wei, W. Polyphenolic Compound and the Degree of Browning in Processing Apple Varieties. *Agricultural Sciences in China* **2007**, *6*, 607-612.
525. Spiller, G.; Chernoff, M.; Gates, J. Effect of increasing levels of four dietary fibers on fecal minerals in pig-tailed monkeys (*Macaca nemestrina*). *Nutr. Rep. Int.* **1980**, *22*, 353-360.
526. Spotti, M.J.; Perduca, M.J.; Piagentini, A.; Santiago, L.G.; Rubiolo, A.C.; Carrara, C.R. Gel mechanical properties of milk whey protein–dextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocoll.* **2013**, *31*, 26-32.
527. Stanton, C.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Van Sinderen, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 198-203.
528. Steinmetz, K.A.; Potter, J.D. Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review. *J. Am. Diet. Assoc.* **1996**, *96*, 1027-1039.
529. Stewart, M.L.; Timm, D.A.; Slavin, J.L. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutr. Res.* **2008**, *28*, 329-334.
530. St-Onge, M.P.; Aban, I.; Bosarge, A.; Gower, B.; Hecker, K.D.; Allison, D.B. Snack chips fried in corn oil alleviate cardiovascular disease risk factors when substituted for low-fat or high-fat snacks. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1503-1510.
531. Su, P.; Henriksson, A.; Mitchell, H. Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 2392-2400.
532. Sun, J.; Chu, Y.-.; Wu, X.; Liu, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7449-7454.
533. Sun-Waterhouse, D.; Teoh, A.; Massarotto, C.; Wibisono, R.; Wadhwa, S. Comparative analysis of fruit-based functional snack bars. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1369-1379.
534. Sun-Waterhouse, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2011**, *46*, 899-920.
535. Talens, P.; Martínez-Navarrete, N.; Fito, P.; Chiralt, A. Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2002**, *3*, 191-199.

536. Talens, P.; Pérez-Masía, R.; Fabra, M.J.; Vargas, M.; Chiralt, A. Application of edible coatings to partially dehydrated pineapple for use in fruit–cereal products. *J. Food Eng.* **2012**, *112*, 86-93.
537. Talwalkar, A.; Kailasapathy, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues Intest Microbiol.* **2004**, *5*, 1-8.
538. Tamer, C.; Önceday, B.; Yıldız, B.; Topur, A. The Use of Vacuum Impregnation for Debittering Green Olives. *Food and Bioprocess Technology* **2013**, *6*, 3604-3612.
539. Tamura, M.; Nakagawa, H.; Tsushida, T.; Hirayama, K.; Itoh, K. Effect of pectin enhancement on plasma quercetin and fecal flora in rutin-supplemented mice. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S648-51.
540. Tanaka, T.; Tanaka, T.; Tanaka, M.; Kuno, T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of beta-cryptoxanthin and hesperidin. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 2012,516981.
541. Tannock, G.W. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3189-3194.
542. Tapia, M.S.; Rojas-Graü, M.A.; Rodríguez, F.J.; Ramírez, J.; Carmona, A.; Martín-Belloso, O. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, E190-E196.
543. Teixeira, P.; Castro, H.; Kirby, R. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* **1996**, *22*, 34-38.
544. Teixeira, P.C.; Castro, M.H.; Malcata, F.X.; Kirby, R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Following Spray-Drying. *J. Dairy Sci.* **1995**, *78*, 1025-1031.
545. Temple, N.J. Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutr. Res.* **2000**, *20*, 449-459.
546. Terry, P.; Terry, J.B.; Wolk, A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. *J. Intern. Med.* **2001**, *250*, 280-290.
547. Timoumi, S.; Mihoubi, D.; Zagrouba, F. Shrinkage, vitamin C degradation and aroma losses during infra-red drying of apple slices. *LWT - Food Science and Technology* **2007**, *40*, 1648-1654.
548. Titgemeyer, E.C.; Bourquin, L.D.; Fahey, G.C., Jr; Garleb, K.A. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 1418-1424.
549. Unno, T.; Hisada, T.; Takahashi, S. Hesperetin Modifies the Composition of Fecal Microbiota and Increases Cecal Levels of Short-Chain Fatty Acids in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7952-7957.
550. Titta L.; Trinei M.; Stendardo M.; Berniakovich I.; Petroni K.; Tonelli C.; Riso P.; Porrini M.; Minucci S.; Pelicci P.G.; Rapisarda P.; Recupero

- G.R.; Giorgio M. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. *Int. J. Obes.* **2010**, *34*, 578-588.
551. Toor, R.K.; Savage, G.P. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chem.* **2006**, *99*, 724-727.
552. Torreggiani, D.; Forni, E.; Erba, M.L.; Longoni, F. Functional properties of pepper osmodehydrated in hydrolyzed cheese whey permeate with or without sorbitol. *Food Res. Int.* **1995**, *28*, 161-166.
553. Totlani, V.M.; Peterson, D.G. Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous maillard systems: Identification and structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7311-7318.
554. Tripoli, E.; Guardia, M.L.; Giammanco, S.; Majo, D.D.; Giammanco, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* **2007**, *104*, 466-479.
555. Tsao, R.; Yang, R.; Xie, S.; Sockovie, E.; Khanizadeh, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4989-4995.
556. Tsen, J.-.; Lin, Y.-.; King, V.A.-. Banana puree fermentation by *Lactobacillus acidophilus* immobilized in Ca-alginate. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2003**, *49*, 357-361.
557. Tsen, J.; Lin, Y.; An-Erl King, V. Fermentation of banana media by using κ -carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *91*, 215-220.
558. Tsen, J.; Lin, Y.; Huang, H.; King, V.A. Studies on the fermentation of tomato juice by using carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Process. Preserv.* **2008**, *32*, 178-189.
559. Tsen, J.; Lin, Y.; King, V.A. Response surface methodology optimisation of immobilised *Lactobacillus acidophilus* banana puree fermentation. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2009**, *44*, 120-127.
560. Tuorila, H.; Cardello, A.V. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference* **2002**, *13*, 561-569.
561. Tzortzis, G.; Goulas, A.K.; Baillon, M.-A.; Gibson, G.R.; Rastall, R.A. In vitro evaluation of the fermentation properties of galactooligosaccharides synthesised by β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 106-111.
562. Uddin, M.S.; Hawlader, M.N.A.; Ding, L.; Mujumdar, A.S. Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage. *J. Food Eng.* **2002**, *51*, 21-26.
563. Vacharaksa, A.; Finlay, B.B. Gut microbiota: metagenomics to study complex ecology. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, R569-71.

564. Vaikousi, H.; Koutsoumanis, K.; Biliaderis, C.G. Kinetic modelling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions. *Food Chem.* **2008**, *107*, 785-796.
565. Valdez-Fragoso, A.; Mujica-Paz, H.; Giroux, F.; Velti-Chanes, J. Pilot plant for osmotic dehydration of fruits: design and evaluation. *J. Food Process Eng.* **2002**, *25*, 189-199.
566. Valerio, F.; De Bellis, P.; Lonigro, S.L.; Morelli, L.; Visconti, A.; Lavermicocca, P. In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 3042-3045.
567. Van Boekel, M.A.J.S. Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2008**, *7*, 144-158.
568. Van Buggenhout, S.; Messagie, I.; Maes, V.; Duvetter, T.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. Minimizing texture loss of frozen strawberries: effect of infusion with pectinmethylesterase and calcium combined with different freezing conditions and effect of subsequent storage/thawing conditions. *European Food Research and Technology* **2006**, *223*, 395-404.
569. van den Heuvel, E.G.; Muys, T.; van Dokkum, W.; Schaafsma, G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1999**, *69*, 544-548.
570. Van Duyn, M.A.S.; Pivonka, E. Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional: Selected Literature. *J. Am. Diet. Assoc.* **2000**, *100*, 1511-1521.
571. van Duynhoven, J.; Vaughan, E.E.; Jacobs, D.M.; Kemperman, R.,A.; van Velzen, Ewoud J. J.; Gross, G.; Roger, L.C.; Possemiers, S.; Smilde, A.K.; Doré, J.; Westerhuis, J.A.; Van, d.W. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 4531-4538.
572. van Kleef, E.; van Trijp, H.C.M.; Luning, P. Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. *Appetite* **2005**, *44*, 299-308.
573. van Kleef, E.; van Trijp, H.C.M.; Luning, P.; Jongen, W.M.F. Consumer-oriented functional food development: how well do functional disciplines reflect the 'voice of the consumer'? *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 93-101.
574. van Kleef, E.; van Trijp, H.C.M.; Luning, P.; Jongen, W.M.F. Consumer-oriented functional food development: how well do functional disciplines reflect the 'voice of the consumer'? *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13*, 93-101.

575. van, d.G.; Serror, P.; Chervaux, C.; Smokvina, T.; Ehrlich, S.; Maguin, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2002**, *82*, 187-216.
576. Vardavas, C.I.; Yiannopoulos, S.; Kiriakakis, M.; Poulli, E.; Kafatos, A. Fatty acid and salt contents of snacks in the Cretan and Cypriot market: A child and adolescent dietary hazard. *Food Chem.* **2007**, *101*, 924-931.
577. Vargas, M.; Chiralt, A.; Albors, A.; González-Martínez, C. Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *51*, 263-271.
578. Vega, R.; Zuniga-Hansen, M.E. The effect of processing conditions on the stability of fructooligosaccharides in acidic food products. *Food Chem.* **2015**, *173*, 784-789.
579. Vega-Gálvez, A.; Ah-Hen, K.; Chacana, M.; Vergara, J.; Martínez-Monzó, J.; García-Segovia, P.; Lemus-Mondaca, R.; Di Scala, K. Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chem.* **2012**, *132*, 51-59.
580. Velickova, E.; Tylewicz, U.; Dalla Rosa, M.; Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S.; Gómez Galindo, F. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. *LWT - Food Science and Technology* **2013**, *52*, 146-150.
581. Vereyken, I.J.; Chupin, V.; Demel, R.A.; Smeekens, S.C.M.; De Kruijff, B. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2001**, *1510*, 307-320.
582. Vereyken, I.J.; Chupin, V.; Hoekstra, F.A.; Smeekens, S.C.M.; de Kruijff, B. The Effect of Fructan on Membrane Lipid Organization and Dynamics in the Dry State. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3759-3766.
583. Vergetaki, A.; Linardakis, M.; Papadaki, A.; Kafatos, A. Presence of metabolic syndrome and cardiovascular risk factors in adolescents and University students in Crete (Greece), according to different levels of snack consumption. *Appetite* **2011**, *57*, 278-285.
584. Vervoort, L.; Van der Plancken, I.; Grauwet, T.; Timmermans, R.A.H.; Mastwijk, H.C.; Matser, A.M.; Hendrickx, M.E.; Van Loey, A. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2011**, *12*, 466-477.
585. Verzelloni, E.; Pellacani, C.; Tagliazucchi, D.; Tagliaferri, S.; Calani, L.; Costa, L.G.; Brighenti, F.; Borges, G.; Crozier, A.; Conte, A.; Del Rio, D. Antiglycative and neuroprotective activity of colon-derived polyphenol

- catabolites. *Molecular Nutrition and Food Research* **2011**, *55*, S35-S43.
586. Vial, C.; Guilbert, S.; Cuq, J. Osmotic dehydration of kiwi fruits: influence of process variables on the color and ascorbic acid content. *Sci. Aliments* **1991**, *11*, 63-84.
587. Vinson, J.A.; Liang, X.; Proch, J.; Hontz, B.A.; Dancel, J.; Sandone, N. Polyphenol antioxidants in citrus juices: in vitro and in vivo studies relevant to heart disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2002**, *505*, 113-122.
588. Vinson, J.A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5315-5321.
589. Vinson, J.A.; Zubik, L.; Bose, P.; Samman, N.; Proch, J. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* **2005**, *24*, 44-50.
590. Voragen, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 328-335.
591. Vrhovsek, U.; Rigo, A.; Tonon, D.; Mattivi, F. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6532-6538.
592. Wakai, K.; Date, C.; Fukui, M.; Tamakoshi, K.; Watanabe, Y.; Hayakawa, N.; Kojima, M.; Kawado, M.; Suzuki, K.; Hashimoto, S.; Tokudome, S.; Ozasa, K.; Suzuki, S.; Toyoshima, H.; Ito, Y.; Tamakoshi, A.; JACC Study Group Dietary fiber and risk of colorectal cancer in the Japan collaborative cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 668-675.
593. Waladkhani, A.R.; Clemens, M.R. Effect of dietary phytochemicals on cancer development (review). *Int. J. Mol. Med.* **1998**, *1*, 747-753.
594. Wang, C.; Ng, C.; Su, H.; Tzeng, W.; Shyu, Y. Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2009**, *60*, 98-106.
595. Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y.; Wang, C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 816-821.
596. Wang, Y.; Yu, R.; Chou, C. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 128-135.
597. Weinbreck, F.; Bodnár, I.; Marco, M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *136*, 364-367.
598. Welti-Chanes, J.; Guerrero, J.A.; Barcenas, M.E.; Aguilera, J.M.; Vergara, F.; Barbosa-Canovas, G.V. glass transition temperature (tg)

- and water activity (aw) of dehydrated apple products. *J. Food Process Eng.* **1999**, *22*, 91-101.
599. Wibowo, S.; Grauwet, T.; Santiago, J.S.; Tomic, J.; Vervoort, L.; Hendrickx, M.; Van Loey, A. Quality changes of pasteurised orange juice during storage: A kinetic study of specific parameters and their relation to colour instability. *Food Chem.* **2015**, *187*, 140-151.
600. Wiktor, A.; Iwaniuk, M.; ÅšledÅ°, M.; Nowacka, M.; Chudoba, T.; Witrowa-Rajchert, D. Drying Kinetics of Apple Tissue Treated by Pulsed Electric Field. *Drying Technol* **2013**, *31*, 112-119.
601. Wilmsen, P.K.; Spada, D.S.; Salvador, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4757-4761.
602. Winter, J.; Moore, L.H.; Dowell, V.R., Jr; Bokkenheuser, V.D. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1203-1208.
603. Wjdylo, A.; Figiel, A.; Oszmianski, J. Effect of Drying Methods with the Application of Vacuum Microwaves on the Bioactive Compounds, Color, and Antioxidant Activity of Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1337-1343.
604. Wolfe, K.; Wu, X.; Liu, R.H. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 609-614.
605. Wongkhalaung, C.; Boonyaratanakornkit, M. Development of a yogurt-type product from saccharified rice. *Kasetsart Journal, Natural Sciences* **2000**, *34*, 107-116.
606. Wu, C.; Miloslavskaya, I.; Demontis, S.; Maestro, R.; Galaktionov, K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* **2004**, *432*, 640-645.
607. Xie, J.; Zhao, Y. Nutritional enrichment of fresh apple (Royal Gala) by vacuum impregnation. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2003**, *54*, 387-398.
608. Xu, Z.R.; Hu, C.H.; Xia, M.S.; Zhan, X.A.; Wang, M.Q. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult. Sci.* **2003**, *82*, 1030-1036.
609. Yamada, K.; Sato-Mito, N.; Nagata, J.; Umegaki, K. Health claim evidence requirements in Japan. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1192S-8S.
610. Yamamoto, M.; Suzuki, A.; Jokura, H.; Yamamoto, N.; Hase, T. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* **2008**, *24*, 470-476.
611. Yang, M.; Tanaka, T.; Hirose, Y.; Deguchi, T.; Mori, H.; Kawada, Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 719-724.

612. Yeo, S.; Liong, M. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 267-275.
613. Yeum, K.; Russell, R.M.; Krinsky, N.I.; Aldini, G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *430*, 97-103.
614. Yilmaz, Y.; Toledo, R. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chem.* **2005**, *93*, 273-278.
615. Yoo, K.M.; Lee, K.W.; Park, J.B.; Lee, H.J.; Hwang, I.K. Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5907-5913.
616. Yoon, K.Y.; Woodams, E.E.; Hang, Y.D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 1427-1430.
617. Yoon, K.Y.; Woodams, E.E.; Hang, Y.D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensm Wiss Technol* **2005**, *38*, 73-75.
618. Yoon, K.Y.; Woodams, E.E.; Hang, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *J. Microbiol.* **2004**, *42*, 315-318.
619. Yoruk, R.; Marshall, M.R. Pñhysicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review1. *J. Food Biochem.* **2003**, *27*, 361-422.
620. Yuan, J.; Chen, F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5078-5082.
621. Yun, J.W. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *19*, 107-117.
622. Zanoni, S.; Pompei, A.; Cordisco, L.; Amaretti, A.; Rossi, M.; Matteuzzi, D. Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1266-1276.
623. Zayed, G.; Roos, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 1081-1086.
624. Zhao, Y.; Xie, J. Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 434-451.
625. Zielinska-Przyjemska, M.; Ignatowicz, E. Citrus fruit flavonoids influence on neutrophil apoptosis and oxidative metabolism. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 1557-1562.
626. Zielinska, M.; Markowski, M. Color Characteristics of Carrots: Effect of Drying and Rehydration. *Int. J. Food Prop.* **2012**, *15*, 450-466.

627. Zwietering, M.H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F.M.; van 't Riet, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 1875-1881.