



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EFECTO DE LA TREHALOSA Y LAS PRESIONES DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA SUPERVIVENCIA AL PROCESO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* DE *Lactobacillus* *Salivarius SPP. Salivarius* CECT 4063 EN DIFERENTES MATRICES ALIMENTARIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A:
GUILLERMO GASPAR CORTIJO

TUTOR/A ACADEMICO:
CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS
JORGE GARCÍA HERNÁNDEZ

DIRECTOR/A EXPERIMENTAL:
CRISTINA GABRIELA BURCA

Curso Académico: 2016/2017
VALENCIA, 14 de septiembre de 2017

EFECTO DE LA TREHALOSA Y LAS PRESIONES DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA SUPERVIVENCIA AL PROCESO DE DIGESTIÓN *IN VITRO* DE *Lactobacillus Salivarius spp. salivarius* CECT 4063 EN DIFERENTES MATRICES ALIMENTARIAS

Guillermo Gaspar Cortijo, Cristina Barrera Puigdollers¹, Jorge García Hernández²

Resumen

Este estudio se propone con el objeto de evaluar el efecto de la adición de un 10% en peso de trehalosa y de la homogeneización a 100 MPa sobre la supervivencia al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 incorporado a diferentes matrices alimentarias: zumo de clementina, manzana impregnada con zumo de clementina, manzana impregnada con zumo de clementina y secada con aire a 40 °C y manzana impregnada con zumo de clementina y liofilizada. Además, en las matrices solidas se evaluó la bioaccesibilidad de los principales compuestos con capacidad antioxidante.

En general, la cepa probiótica resultó más resistente al incorporarse a la estructura porosa de láminas de manzana mediante la técnica de impregnación a vacío; sin embargo, tras la aplicación de una etapa posterior de deshidratación se redujo notablemente la cantidad de microorganismos susceptibles de ser asimilados por el organismo. En consecuencia, la cantidad de snack deshidratado que debería ser ingerido para alcanzar la dosis diaria recomendada resultó excesivamente elevada. Por lo que respecta al tratamiento aplicado al zumo, aquel que no incluía trehalosa ni había sido sometido a una etapa de homogeneización fue el que mostró mejores resultados en la mayoría de las determinaciones microbiológicas realizadas.

La liberación de compuestos antioxidantes durante el proceso digestivo también estuvo principalmente condicionada por el tipo de matriz alimentaria del que estos formaban parte, aumentando su bioaccesibilidad en las muestras impregnadas y reduciéndose en el caso de las deshidratadas.

Palabras Clave: Probiótico, antioxidantes, bioaccesibilidad, matriz alimentaria, trehalosa, homogeneización.

Abstract

This project is proposed with the aim of evaluating the effect of adding trehalose 10% (w/w) and its homogenization at 100 MPa to the *Lactobacillus salivarius* spp CECT 4063 viability upon the gastrointestinal digestion process. It has been tested in several matrixes: clementine juice, apple impregnated with



clementine juice, apple impregnated with clementine juice dried at 40 °C and lyophilized apple impregnated with clementine juice. Furthermore, bioaccessibility of most important antioxidant compounds was evaluated in solid matrices.

Usually, probiotic strain became more resistant when incorporating to the apple porous matrix by vacuum impregnation; however, after a further dehydration its quantity remarkably decreased. In consequence, the amount of dehydrated snack required to reach the recommended daily dose was too big. In juice terms, the one without trehalose and homogenization presented the best microbiological results.

The release of antioxidant compounds during the digestive process was mainly conditioned by the matrix where they were attached, augmenting its bioaccessibility in impregnated samples and reducing in dehydrated ones.

Keywords: probiotic, antioxidants, bioaccessibility, food matrix, trehalose, homogenization.

Resum

Aquest estudi es proposa amb l'objecte d'avaluar l'efecte de l'addició d'un 10% en pes de trehalosa i de l'homogeneïtzació a 100 MPa sobre la supervivència al procés de digestió gastrointestinal in vitro de *Lactobacillus salivarius spp. salivarius* CECT 4063 incorporat a diferents matrius alimentàries: suc de clementina, poma impregnada amb suc de clementina, poma impregnada amb suc de clementina i assecada amb aire a 40 °C i poma impregnada amb suc de clementina i liofilitzada. A més, en les matrius sòlides es va avaluar la bioaccessibilitat dels principals compostos amb capacitat antioxidant.

En general, el cep probiòtic va resultar més resistent en incorporar-se a l'estructura porosa de làmines de poma mitjançant la tècnica d'impregnació a buit; no obstant això, després de l'aplicació d'una etapa posterior de deshidratació es va reduir notablement la quantitat de microorganismes susceptibles de ser assimilats per l'organisme. En conseqüència, la quantitat de snack deshidratat que hauria de ser ingerit per aconseguir la dosi diària recomanada va resultar excessivament elevada. Pel que fa al tractament aplicat al suc, aquell que no incloïa trehalosa ni havia estat sotmès a una etapa d'homogeneïtzació va ser el que va mostrar millors resultats en la majoria de les determinacions microbiològiques realitzades.

L'alliberament de compostos antioxidants durant el procés digestiu també va estar principalment condicionada pel tipus de matriu alimentària del que aquests formaven part, augmentant el seu bioaccessibilitat en les mostres impregnades i reduint-se en el cas de les deshidratades.

Paraules Clau: Probiòtic, antioxidants, bioaccessibilitat, matriu alimentària, trehalosa, homogeneïtzació.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son aquellos que, más allá de su valor nutritivo, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana, mejorándola e incluso reduciendo el riesgo de contraer determinadas enfermedades. En la sociedad actual, cada vez más concienciada de la necesidad de adquirir un estilo de vida encaminado a la promoción de la salud, se ha producido en los últimos años un aumento en la demanda por parte de los consumidores de nuevos productos que reúnan estas características (Küster-Boluda y Vidal-Capilla, 2017). Conocedor de este hecho, el sector agroalimentario ha incrementado la inversión en la investigación, el diseño y la elaboración de alimentos funcionales con propiedades nutricionales mejoradas.

Uno de los puntos clave de estas investigaciones es la valoración del contenido en compuestos con actividad fisiológica presentes en los alimentos, no solo tras el procesado, sino también durante el almacenamiento previo a su consumo y tras su digestión (Meira et al., 2015). De esta forma se obtiene información acerca de la posible degradación de los compuestos activos bajo diferentes condiciones, así como de su mayor o menor liberación durante el proceso digestivo, de lo que depende el que puedan ejercer o no un efecto beneficioso para la salud. De manera que todo nuevo alimento funcional, antes de ser lanzado al mercado, debería someterse a un ensayo de simulación gastrointestinal (SGI) *in vitro* que asegure la adecuada biodisponibilidad de los compuestos de interés (Mäkeläinen et al., 2009; Rodríguez-Roque et al., 2014), la cual se puede ver influenciada por su interacción con otros ingredientes presentes en el alimento, por las operaciones unitarias aplicadas durante el procesado del alimento, por el tipo de estructura que presente y el grado de protección que les confiera la matriz alimentaria, etc. (Madureira et al., 2011).

En relación al efecto de la presencia de otros ingredientes sobre la actividad fisiológica de los compuestos activos, diversos estudios ponen de manifiesto que la trehalosa es un disacárido no reductor con muchas aplicaciones biotecnológicas, ya que confiere protección a proteínas y membranas biológicas ante el estrés abiótico (Ohtake y Wang, 2011). Por una parte, se ha demostrado su efecto crioprotector durante la congelación y posterior liofilización de cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Conrad et al., 2000). Además, se ha comprobado en estudios llevados a cabo con frutas que la incorporación de trehalosa en una concentración del 10-15% disminuye en más de un 50% la degradación de vitamina C debida al calentamiento (Oku et al., 2002).

Respecto al efecto de las operaciones unitarias sobre la mayor o menor degradación experimentada por los compuestos activos durante el procesado, almacenamiento y digestión de los mismos, la aplicación de altas presiones de homogeneización está cobrando una gran importancia en la industria alimentaria como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales para garantizar la seguridad microbiológica de alimentos líquidos. En algunos estudios se ha aplicado esta nueva tecnología para aumentar la supervivencia de cepas con efecto probiótico o mejorar sus propiedades funcionales (Patrignani et al., 2009). En ensayos llevados a cabo con cepas de

Lactobacillus paracasei A13, la aplicación de altas presiones aumentó su hidrofobicidad, directamente relacionada con su capacidad de adhesión a las células intestinales y su resistencia al proceso de digestión (Basson et al., 2007; Tabanelli et al., 2012). Con respecto al efecto del tratamiento con altas presiones de homogeneización sobre componentes bioactivos con efecto antioxidante, diferentes estudios demuestran una ventaja en su estabilidad con respecto a la aplicación de tratamientos térmicos. Concretamente en zumo de mandarina, la homogeneización disminuye el tamaño de las partículas suspendidas, aumentando la estabilidad de la nube y, con ello, la disponibilidad de los componentes activos con propiedades antioxidantes (Betoret et al., 2009). En zumo de arándano inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063, la homogeneización a 100 MPa mejora tanto el aspecto visual como el sabor, además de reducir el tamaño de partícula y liberar al medio compuestos bioactivos que favorecen el crecimiento y la viabilidad del microorganismo (Castagnini et al., 2015).

Por todo lo comentado anteriormente, este estudio se plantea con el objeto de evaluar el efecto que la trehalosa y la presión de homogeneización ejercen sobre la bioaccesibilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) y compuestos con actividad antioxidante (fenoles totales y flavonoides totales) presentes o incorporados a diferentes matrices alimentarias: zumo, manzana impregnada, manzana impregnada y secada por aire caliente y manzana impregnada y liofilizada. De esta forma se podrá discutir si la matriz alimentaria estudiada asegura que las características funcionales del alimento de partida se mantengan de forma óptima durante el proceso digestivo hasta llegar al punto de interés fisiológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo utilizado y Materias primas obtenidas

El microorganismo probiótico utilizado fue *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia), seleccionado por su efecto beneficioso frente a la infección ocasionada por *H. pylori*.

El medio de cultivo empleado con el fin de recuperar la cepa probiótica congelada o liofilizada fue el caldo MRS (medio desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe capaz de promover el crecimiento óptimo de bacterias ácido-lácticas). Las cepas se resuspendieron en MRS estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), incubándose a 37 °C durante 24 h. Una vez incubado, el medio MRS se conservó en refrigeración durante un máximo de 3 días, periodo a partir del cual empieza a producirse un descenso en la población microbiana presente en el medio.

El medio utilizado para el crecimiento del microorganismo probiótico y su posterior empleo como líquido de impregnación fue el zumo de clementina comercial (Hacendado), *citrus x clementina*.

La matriz sólida empleada para la incorporación del zumo de clementina con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* fue manzana var. *Granny Smith*, pelada y cortada en discos de 5 mm de espesor, 20 mm de diámetro interno y 65 mm de diámetro externo. Esta variedad fue seleccionada por su homogeneidad y por la elevada porosidad que presenta su microestructura, capaz de ocupar con el líquido de impregnación hasta un 20% de su volumen fresco inicial (Fito et al., 2001).

Preparación del líquido de impregnación

El zumo de clementina se enriqueció con 5 g/L de extracto de levadura (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) y se elevó su pH hasta 6 con 9,8 g/L de bicarbonato sódico comercial (Hacendado) (Betoret et al., 2012). Algunos líquidos incluían además un 10 % en peso de trehalosa de grado alimentario en su formulación (TREHA™, Cargill, S.L.U, Martorell, Barcelona). Una vez ajustado el zumo a las condiciones deseadas, éste se inoculó con 4 mL/L de caldo MRS que contenía el microorganismo reactivado y desarrollado ($\approx 10^9$ UFC/mL). Una vez inoculado, el zumo se incubó a 37 °C durante 24 h y, pasado este tiempo, se empleó como líquido de impregnación. Puesto que algunos estudios afirman que la aplicación de altas presiones de homogeneización aumenta la supervivencia de cepas con efecto probiótico y mejora sus propiedades funcionales (Patrignani et al., 2009), una parte del zumo que contenía el probiótico desarrollado se homogeneizó a 100 MPa en un homogeneizador de altas presiones a escala de laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia), antes de ser empleado como líquido de impregnación.

Impregnación a vacío (IV)

La impregnación a vacío se llevó a cabo en una cámara de vacío (HERAEUS Vacuun Oven, THERMO SCIENTIFIC, Langensfeld, Alemania), conectada a una bomba de vacío (ILMVAC, Alemania). Esta técnica de ingeniería de matrices permite reemplazar el gas ocluido en la estructura porosa de un alimento por un líquido mediante la aplicación de gradientes de presión. De esta forma, cualquier compuesto fisiológicamente activo presente en el líquido de impregnación (en este caso concreto antioxidantes y probióticos), queda incorporado a la matriz estructural del alimento. Para llevar a cabo el proceso de impregnación en este estudio, los discos de manzana se sumergieron en el líquido de impregnación y se aplicó una presión de vacío de 50 mbar durante 10 min. Pasado este tiempo, se rompió el vacío y se restauró la presión atmosférica que se mantuvo durante otros 10 min más.

Secado por aire caliente (SAC)

Para el secado de las manzanas impregnadas se utilizó un secador de bandejas CLW 750 TOP+ (Pol-Eko-Aparatura SPJ, Polonia) de flujo transversal a una velocidad de 2 m/s. Las muestras Los ensayos se secaron con aire a 40 °C hasta alcanzar una actividad del agua de 0,35.

Liofilización (LIO)

Esta operación de estabilización se llevó a cabo en dos etapas. En primer lugar, las muestras impregnadas se mantuvieron durante 24 h en un ultracongelador (Matek modelo CVN-40/105) a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez congeladas, las muestras se introdujeron en un liofilizador a escala de plata piloto (TELSTAR LIOALFA 6-80) donde permanecieron durante otras 24 h (a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y una presión de vacío de 0,1 mbar).

Determinaciones analíticas

SIMULACIÓN *IN VITRO* DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL (SGI)

Con el objeto de evaluar la bioaccesibilidad del probiótico y de los principales antioxidantes presentes en las diferentes matrices alimentarias, se aplicó el protocolo modificado de simulación gastrointestinal *in vitro* propuesto por Charteris et al. (1998) y descrito por Posso (2013).

En la primera etapa del proceso (fase oral, FO), la muestra se trituró de forma controlada y se mezcló con saliva en una relación 1:1 (w/v), en el caso de las muestras de manzana impregnada, o 1:2 (w/v), para las muestras de manzana impregnada y deshidratada mediante SAC o LIO. Esta etapa se omitió durante la digestión simulada de las muestras líquidas. A continuación, se adicionó 5 mL/g de muestra de una disolución de 3 g/L de pepsina aislada de la mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich) en suero salino estéril al 0,5 % (p/v), a la que se ajustó el pH hasta un valor de 2 con una disolución de HCl 0,5 N. Tras 2 h en agitación a 100 rpm y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un agitador orbital (Ivymen System Optic®) se dio por concluida la fase gástrica (FG) y dio comienzo la fase intestinal (FI). Para ello, a la mezcla procedente de la fase gástrica se le adicionó en una relación 1:1,8 (w/w) una disolución de 1 g/L de pancreatina aislada de páncreas porcino (Sigma-Aldrich) en suero salino estéril al 0,5 % (p/v), a la que se ajustó el pH hasta un valor de 8 con una disolución de NaOH 0,1 N. Esta mezcla permaneció en agitación a 100 rpm y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un agitador orbital (Ivymen System Optic®) durante 6 h más. Al principio del proceso y al final de cada etapa se analizó el contenido microbiano, el contenido en fenoles totales y flavonoides totales y la capacidad antioxidante por el método DPPH.

RECUESTO DE LACTOBACILOS VIABLES

La concentración de *L. salivarius* spp. *salivarius* en las distintas matrices alimentarias antes y después de cada una de las etapas de la simulación gastrointestinal se determinó por el procedimiento de dilución decimal seriada en agua destilada estéril y siembra en placa (ICMSF, 2000). Dado que el crecimiento observado en condiciones de anaerobiosis no mejoraba notablemente, a pesar de tratarse de un microorganismo anaerobio facultativo, la siembra se realizó en la superficie de placas Petri con agar MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), que se incubaron en aerobiosis a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

El impacto de la digestión gastrointestinal sobre las propiedades antioxidantes (contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante) únicamente se evaluó en las muestras sólidas de manzana impregnada y manzana impregnada y secada por aire caliente o liofilizada.

Las determinaciones realizadas sobre las muestras previamente a su digestión se llevaron a cabo sobre extractos obtenidos a partir de la mezcla de una cantidad conocida de manzana (2 g en el caso de manzana impregnada y 0,35 g en el caso de manzana impregnada y secada por aire caliente o liofilizada) con 20 mL de disolvente (80:20, metanol: agua). Las determinaciones se llevaron a cabo sobre el sobrenadante obtenido por agitación en oscuridad durante 1 h y posterior centrifugación 10000 rpm (Medifriger BL. P-Selecta).

Tras las fases gástrica e intestinal, las medidas se realizaron directamente sobre el sobrenadante obtenido por decantación y diluido, en el caso de las muestras impregnadas y deshidratadas, con agua destilada en una relación 1:5 (v/v).

Fenoles Totales

El contenido en fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu modificado (Sakanaka et al., 2005), que se basa en la medida a 760 nm de la intensidad de coloración azul que se genera por reacción del compuesto de Folin-Ciocalteu con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Para tal fin se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 125 μ L de muestra, 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 500 μ L de agua bidestilada. Tras 6 min en reposo, se adicionaron 1,25 mL de bicarbonato de sodio al 7,5% (p/v) y 1 mL de agua bidestilada. Como referencia se sustituyó en una cubeta de espectrofotometría los 125 μ L de muestra por agua bidestilada. Transcurridos 90 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de ácido gálico y se expresaron en miligramos equivalente de ácido gálico por mg de muestra (mg EAG/g).

Flavonoides totales

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

Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH

Este método consiste en medir el cambio de coloración que experimenta una disolución del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) el cual, tras secuestrar los compuestos antioxidantes de la muestra, se reduce y pasa de una coloración morada a una amarillenta (Brand-Williams et al., 1995; Molyneux, 2004). Para ello, se introdujo en una cubeta de espectrofotometría 100 μ L de muestra, 900 μ L de metanol y 2000 μ L de una disolución de DPPH 100 mM en metanol (v/v). Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 30 min, se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de DPPH que relaciona la reducción de este con respecto a un patrón de equivalentes de trolox por mg de muestra (mg ET/g).

Análisis estadístico

El grado de significancia estadística de las diferentes variables consideradas sobre los resultados obtenidos se evaluó con el programa Statgraphics Centurión XVI mediante análisis multifactorial de la varianza (ANOVA multifactorial) con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambios en el recuento de viables durante la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal

Uno de los requisitos principales para que una cepa bacteriana pueda ser considerada como probiótica en un alimento es que debe permanecer viable y en cantidades suficientemente altas desde la inoculación del producto, pasando por el procesado y almacenado, hasta finalizar su paso por el tracto gastrointestinal (Madureira et al., 2011). En la **Figura 1** se muestra el contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* de las diferentes matrices alimentarias objeto de estudio, analizado antes de la simulación *in vitro* de su digestión gastrointestinal. El análisis multifactorial de la varianza (ANOVA multifactorial) llevado a cabo para evaluar el efecto que sobre este parámetro ejercen los factores tipo de matriz (zumo, manzana IV, manzana SAC o manzana LIO) y composición del zumo o líquido de impregnación (0%TREH_0MPa, 10%TREH_0MPa ó 0%TREH_100MPa) reveló, con un nivel de confianza del 95 % (P-valor < 0,05), que ambos factores por separado tenían un efecto significativo sobre la concentración de probiótico, pero no su interacción.

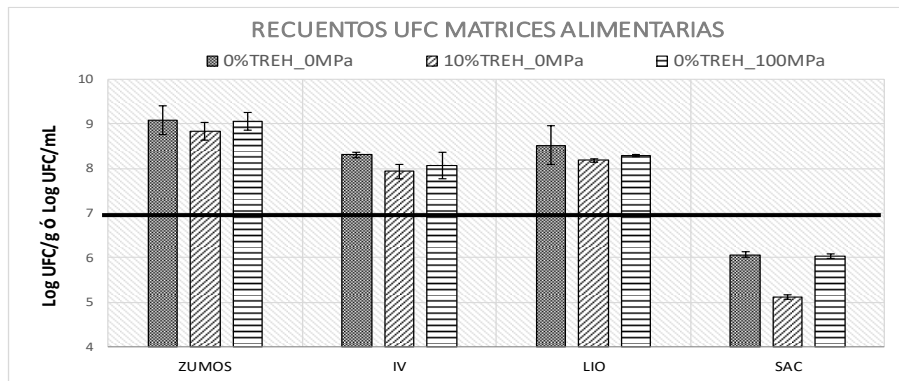


FIGURA 1. Contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en las distintas matrices alimentarias antes de la simulación *in vitro* de su digestión gastrointestinal.

En cuanto al tipo de matriz alimentaria, el recuento de lactobacilos viables tomó valores significativamente más elevados en los zumos de clementina rectificadas e inoculados con el probiótico ($1,1 \pm 0,4 \cdot 10^9$ UFC/mL). Entre las muestras sólidas, lo primero que cabe destacar es que, debido a que apenas un 20% del volumen inicial de los discos de manzana es ocupado por el líquido durante la etapa de impregnación a vacío, el contenido en probiótico de las muestras impregnadas resultó 10 veces inferior al de los zumos. Aún con todo, la manzana impregnada presentó un contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* superior a 10^7 UFC/g ($1,1 \pm 0,8 \cdot 10^8$ UFC/g), que es considerada la concentración mínima necesaria para que el alimento reciba la calificación de probiótico (Ranadheera et al., 2010; FAO/OMS, 2002). Finalmente, el incremento notable que cabía esperar en la concentración microbiana tras la eliminación del agua presente en las muestras impregnadas resultó en un ligero aumento (en el caso de las muestras estabilizadas mediante liofilización) o incluso un notable descenso (en el caso de las muestras secadas con aire a 40 °C). De esta forma se pone de manifiesto el impacto negativo que estas operaciones unitarias de deshidratación ejercen sobre la viabilidad del probiótico (Iaconelli et al., 2015). En el caso concreto de las muestras de manzana SAC, la exposición prolongada a concentraciones de oxígeno y temperaturas superiores a las recomendadas para el óptimo crecimiento del probiótico redujo su concentración hasta valores en torno a $0,8 \pm 0,6 \cdot 10^5$ UFC/g.

Por lo que respecta a la composición del zumo o líquido de impregnación, tanto la homogeneización a 100 MPa del zumo inoculado, pero especialmente la adición de un 10% en peso de trehalosa al zumo previamente a su inoculación, redujeron la cantidad de probiótico presente en las diferentes matrices alimentarias. Este descenso, que no resultó significativo en la mayoría de los productos analizados, sí lo fue para el caso de las muestras de manzana impregnadas y secadas por aire caliente. Como se ha comentado anteriormente, ésta operación de deshidratación resultó ser la más perjudicial para la supervivencia del probiótico, lo que unido al estrés causado por el gradiente de presión impuesto al sistema durante la etapa de homogeneización (en las muestras impregnadas con el zumo 0%TREH_100MPa) o al estrés osmótico causado por la mayor concentración

de solutos presentes en el medio (en las muestras impregnadas con el zumo 10%TREH_OMP_a), resultó en un descenso todavía más pronunciado (Tripathi y Giri, 2014).

Una vez constatado que ni la adición de un 10% en peso de trehalosa al zumo o líquido de impregnación ni la homogeneización del mismo a 100 MPa aumentan de forma significativa la cantidad de probiótico presente en los diferentes productos analizados, se procede a evaluar su efecto sobre la supervivencia de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* a cada una de las etapas que integran el proceso de simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal.

En la **Figura 2** se muestra, para cada uno de los productos analizados, la viabilidad del probiótico tras las fases gástrica (FG) e intestinal (FI) y tras el proceso completo de digestión (TOTAL), calculada a partir del recuento de viables obtenido al inicio y al final de cada etapa o del proceso completo.

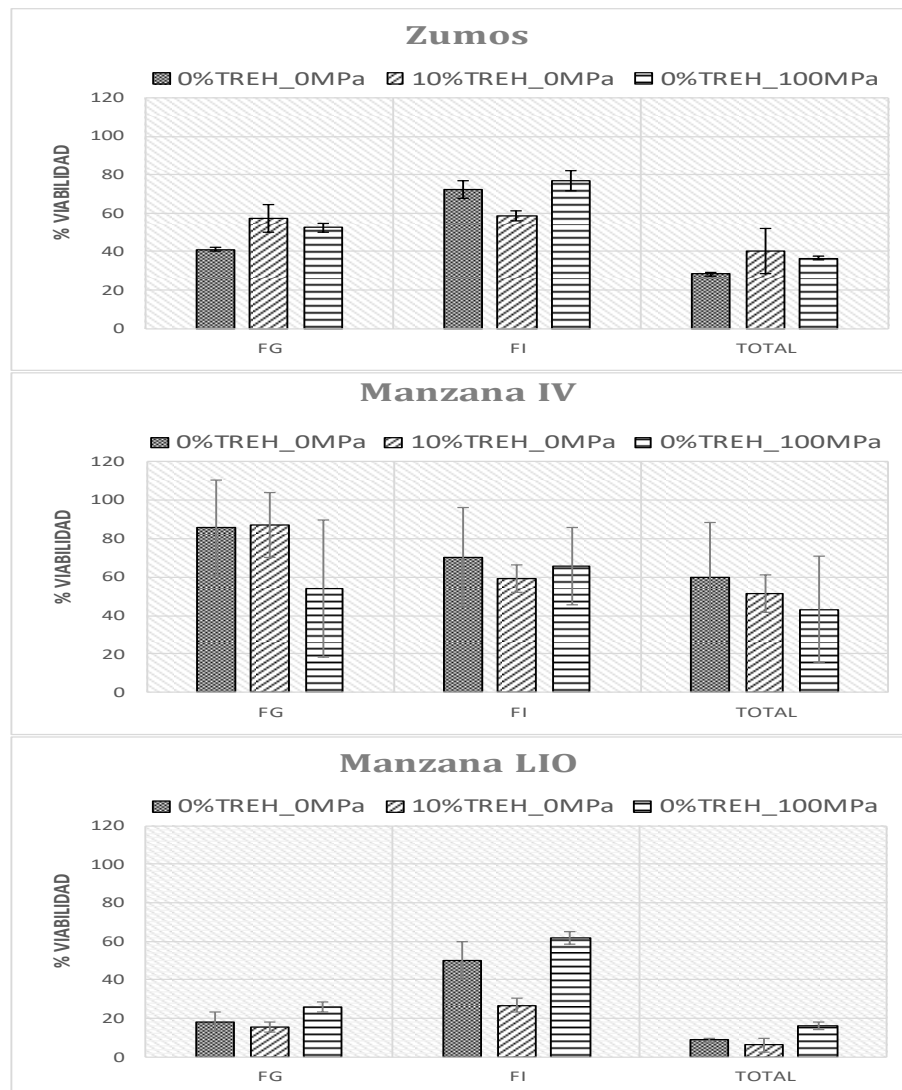


FIGURA 2. Viabilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 tras las etapas gástrica (FG) e intestinal (FG) y tras el proceso completo (TOTAL) de digestión *in vitro* de las diferentes matrices alimentarias.



Como se puede apreciar, faltan los resultados correspondientes a las muestras de manzana SAC debido a que no se obtuvo crecimiento en placa, ni siquiera tras la siembra directa del sobrenadante resultante de la primera etapa del proceso. Una posible explicación a este hecho podría ser que los pocos microorganismos que quedan vivos en las manzanas impregnadas tras su secado con aire a 40 °C sean más sensibles a las condiciones de pH adverso que se dan durante la simulación *in vitro* del proceso gastrointestinal. Otra posible forma de argumentar este comportamiento sería en función de los cambios estructurales experimentados por las muestras durante su secado convectivo. En efecto, la evaporación del agua asociada a esta operación unitaria implica mayores cambios en el volumen de las muestras y favorece el colapso de su estructura, mientras que la eliminación del agua congelada por sublimación en el caso de las muestras liofilizadas favorece la formación de una estructura porosa (Contreras et al., 2004). Aunque para comprobar que efectivamente los probióticos quedan retenidos vivos en la matriz sólida de las muestras SAC se tendría que haber analizado el precipitado resultante de cada etapa, además del sobrenadante, lo que está claro es que los probióticos presentes en estas matrices alimentarias no serían extraídos del alimento y se eliminarían del organismo a través de las heces.

En cuanto al efecto que las demás matrices alimentarias ejercen sobre la supervivencia del probiótico a las diferentes etapas del proceso digestivo, el análisis multifactorial de la varianza (**Figura 3**) reveló, con un nivel de confianza del 95%, que el efecto del tipo de zumo o líquido de impregnación (0%TREH_0MPa, 10%TREH_0MPa ó 0%TREH_100MPa) sobre la variable respuesta depende del tipo de matriz considerada (zumo, manzana IV o manzana LIO).

En términos generales, la cepa CECT 4063 de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* presentó una resistencia ligeramente mayor a los jugos pancreáticos que a los jugos gástricos, como se concluye a partir de los mayores porcentajes de viabilidad obtenidos para la mayoría de las muestras analizadas tras la fase intestinal. Esta tendencia resultó especialmente acusada en el caso de las muestras de manzana LIO e imperceptible en el caso de las muestras de manzana IV. En todas las matrices analizadas, la relación entre la cantidad de probiótico que queda en el sobrenadante y la que entra en la fase intestinal tomó valores muy similares: en torno al $70 \pm 8\%$ en el caso de los zumos, del orden del $68 \pm 13\%$ en el caso de las muestras de manzana IV y alrededor del $61 \pm 3\%$ en el caso de las muestras de manzana LIO. En relación a los diferentes tratamientos aplicados al zumo o líquido de impregnación, la homogeneización a 100 MPa aumentó ligeramente la viabilidad del probiótico tras la fase intestinal, mientras que la adición de un 10% en peso de trehalosa la disminuyó, de forma especialmente acusada en las muestras de manzana LIO.

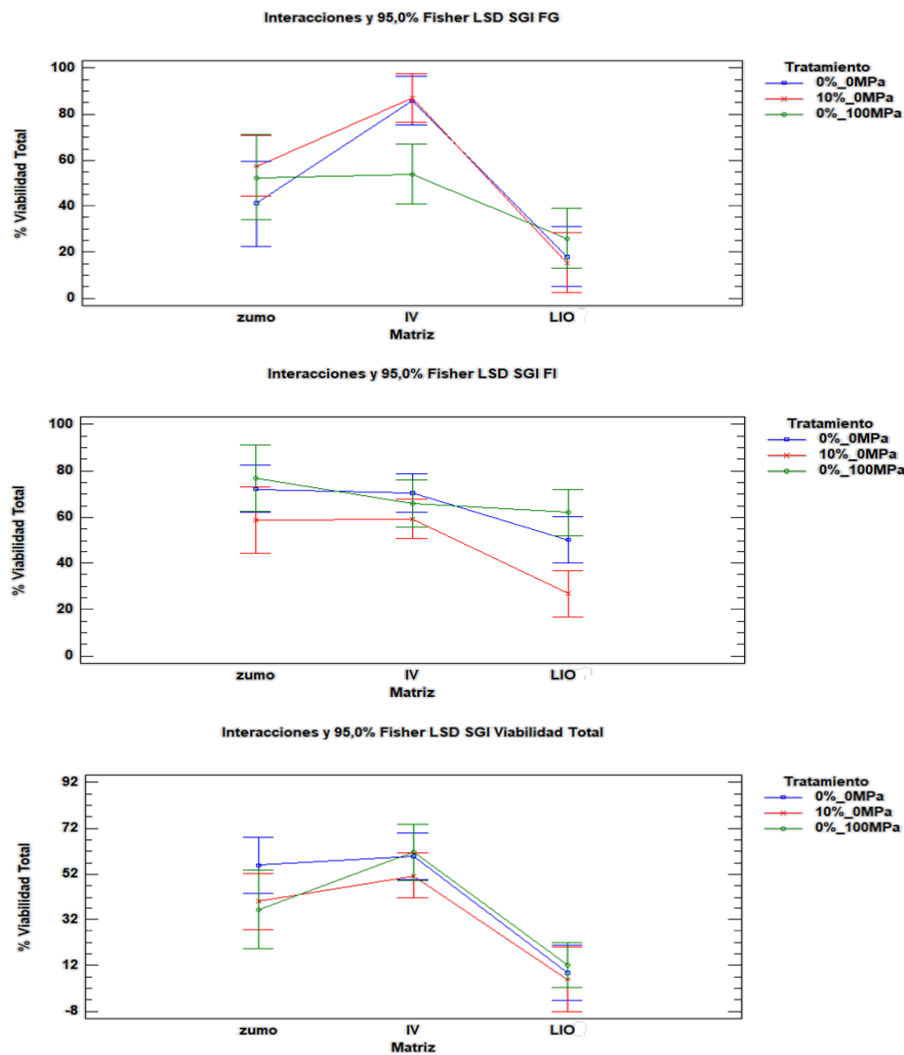


FIGURA 3. Gráficos de interacción e intervalos LSD resultantes del análisis multifactorial de la varianza llevado a cabo para evaluar el grado de significancia de las variables de proceso sobre la viabilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 tras las etapas gástrica (FG) e intestinal (FI) y tras el proceso completo (TOTAL) de digestión *in vitro*.

Al analizar los porcentajes de viabilidad correspondientes a la fase gástrica y al proceso completo de digestión se observa que el efecto de las variables objeto de estudio es en ambos casos muy similar, lo que resulta lógico puesto que, como se ha mencionado anteriormente, la viabilidad del probiótico durante la fase intestinal apenas se vio afectada por el tipo de matriz alimentaria o el tratamiento aplicado al zumo o líquido de impregnación. Tal y como se puede observar en la **Figura 3**, la relación entre la cantidad de probiótico que se libera a los jugos gástricos y la que entra en el proceso de digestión (% viabilidad FG) tomó valores ligeramente más elevados en las muestras de manzana IV ($73 \pm 13\%$) y significativamente más bajos en las muestras de manzana LIO ($20 \pm 6\%$). Teniendo en cuenta que *Helicobacter pylori* es capaz de sobrevivir a las condiciones ácidas y crecer en la capa mucosa que recubre el interior del estómago humano, la manzana IV sería la más adecuada para reducir la

incidencia de su infección al ser capaz de liberar mayor cantidad de microorganismos beneficiosos que compitieran con el patógeno por los sitios de unión. Es importante resaltar que ni la adición de un 10% en peso de trehalosa a la composición del líquido de impregnación ni su homogeneización a 100 MPa consiguieron aumentar la concentración de microorganismos vivos liberados por esta estructura a los jugos gástricos tras 2 h de incubación.

Partiendo de la concentración de probiótico en las diferentes matrices alimentarias antes de su digestión y de los valores de viabilidad total, es posible calcular la cantidad de microorganismo que es liberado por cada gramo de muestra y que llega vivo al final del proceso de digestión. Teniendo en cuenta que la ingesta diaria recomendada por la FAO/OMS (2002) para garantizar el efecto beneficioso de los probióticos sobre la salud se estima en 10^9 UFC/día, se ha calculado también la cantidad que de cada uno de los alimentos analizados debería ingerirse diariamente para satisfacer esta necesidad.

Como se puede observar en la **Tabla 1**, para todas las matrices analizadas se alcanzaron al final del tramo superior del proceso digestivo concentraciones microbianas superiores a 10^6 UFC/g, que es considerada la concentración mínima con efecto terapéutico en el momento en el que se alcanza el colon (Madureira et al., 2011). En cuanto a la ingesta diaria recomendada para cada producto, ésta toma valores en torno a $27 \pm 6,5$ mL en el caso de los zumos, alrededor de $160 \pm 71,3$ g en el caso de las muestras de manzana IV y del orden de 552 ± 448 g en el caso de las muestras de manzana LIO. En el caso de los zumos, a pesar de la baja viabilidad reportada tras el proceso digestivo, la cantidad de producto que es necesario ingerir para obtener un aporte de 10^9 UFC/día es muy baja debido a la elevada concentración del probiótico en el producto de partida. En el caso de la manzana IV, a pesar de que los recuentos iniciales resultaron bastante inferiores, la elevada protección que otorga la matriz hace que el probiótico sea menos vulnerable a los jugos gastrointestinales y que la cantidad de alimento necesario para cubrir las necesidades diarias recomendadas sea fácil de asumir por el consumidor. No ocurre lo mismo en el caso de la manzana LIO ya que, aunque los recuentos de partida son similares a los de la manzana IV, los valores de viabilidad total resultan significativamente menores. En cuanto al tratamiento aplicado sobre el zumo o el líquido de impregnación, ni la adicción de un 10% en peso de trehalosa ni la homogeneización a 100 MPa consiguieron reducir de forma notable el consumo diario recomendado, en el caso de las muestras líquidas, e incluso lo aumentaron significativamente, en el caso de las muestras sólidas.

Tabla 1. Para cada matriz analizada, cantidad que se debería ingerir para satisfacer la ingesta de probióticos diaria recomendada (IDR), calculada a partir de la concentración de probiótico en el alimento sin digerir y su viabilidad tras el proceso completo de digestión *in vitro*.

| Matriz | Tratamiento | UFC/g | % de Viabilidad | UFC/g Viables | IDR (mL/día ó g/día) |
|-------------|--------------|----------|-----------------|---------------|----------------------|
| Zumos | 0%TREH_OMP | 1,40E+09 | 28,1 | 3,94E+08 | 25,39 |
| | 10%TREH_OMP | 7,15E+08 | 40,1 | 2,87E+08 | 34,86 |
| | 0%TREH_100MP | 1,23E+09 | 36,5 | 4,49E+08 | 22,29 |
| Manzana IV | 0%TREH_OMP | 2,06E+08 | 60 | 1,23E+08 | 81,20 |
| | 10%TREH_OMP | 8,90E+07 | 51 | 4,56E+07 | 219,36 |
| | 0%TREH_100MP | 1,28E+08 | 43 | 5,52E+07 | 181,09 |
| Manzana LIO | 0%TREH_OMP | 4,23E+08 | 9 | 3,71E+07 | 269,52 |
| | 10%TREH_OMP | 1,52E+08 | 6,1 | 9,35E+06 | 1069,34 |
| | 0%TREH_100MP | 1,95E+08 | 16 | 3,14E+07 | 318,56 |

Cambios en las propiedades antioxidantes durante la simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal

Tal y como se ha mencionado en el apartado de material y métodos correspondiente, el efecto de la trehalosa y la homogeneización sobre los cambios en las propiedades antioxidantes experimentados por las diferentes matrices alimentarias durante el proceso digestivo, únicamente se evaluó para las muestras de manzana IV, manzana SAC y manzana LIO.

En primer lugar, en la **Figura 4** se muestra los gráficos de interacción e intervalos LSD resultantes del análisis multifactorial de la varianza aplicado con el objeto de evaluar el grado de significancia de las variables de proceso sobre el contenido en fenoles totales y flavonoides y sobre la capacidad antioxidante de las diferentes muestras analizadas antes de la SGI *in vitro*.

Como se puede observar, ninguna de las propiedades antioxidantes analizadas en las muestras de manzana IV se vio significativamente afectada por el tratamiento aplicado al líquido de impregnación. Tras la liofilización, pero principalmente tras el secado por aire caliente de las muestras, éstas experimentaron un significativo aumento tanto en el contenido en fenoles y flavonoides totales como en la capacidad antioxidante medida por el método DPPH. Estas diferencias observadas entre las muestras de manzana LIO y las de manzana SAC no son debidas a la humedad alcanzada por las mismas al final del proceso, ya que ésta resultó ligeramente más elevada en el caso de las muestras de manzana SAC ($\approx 9,6 \pm 0,8\%$) que en el de las muestras LIO ($\approx 4,2 \pm 0,4\%$). Probablemente, como se ha comentado anteriormente, la liofilización de las muestras promueva la formación de una estructura más porosa en la que los compuestos antioxidantes queden más expuestos al oxígeno y sean más susceptibles de ser oxidados, de manera que su concentración en las muestras de manzana LIO resulte inferior al de las muestras SAC. En cuanto al tratamiento aplicado sobre el líquido de impregnación, su efecto sobre las propiedades antioxidantes de las muestras deshidratadas resultó diferente en función de la propiedad analizada y del tipo de tratamiento aplicado (SAC o LIO). En términos generales se podría afirmar que ni la adición de un 10% en peso a la composición del líquido de impregnación ni la homogeneización del mismo a 100 MPa produjo una

mejora significativa, sino que más bien redujo el contenido en fenoles y flavonoides totales y la actividad antioxidante de las muestras de manzana deshidratada, por lo que no sería recomendable su aplicación. El aumento significativo en el contenido en fenoles totales que se observa el caso de las muestras de manzana LIO como consecuencia de la homogeneización del líquido de impregnación no viene acompañado del correspondiente aumento en el contenido en flavonoides totales y en la actividad antioxidante, por lo que cuesta pensar que se deba realmente al tratamiento y no a otros factores.

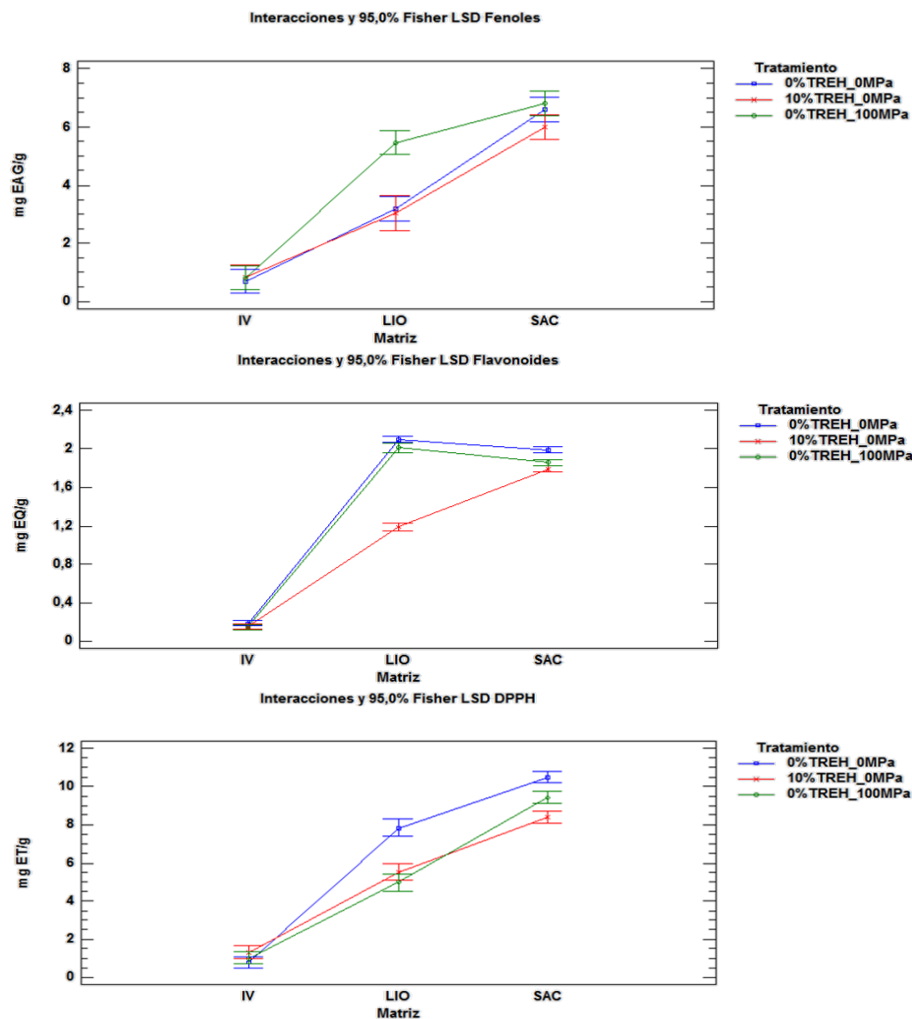


Figura 4. Gráficos de interacción e intervalos LSD resultantes del análisis multifactorial de la varianza llevado a cabo para evaluar el grado de significancia de las variables de proceso sobre la sobre el contenido en fenoles totales y flavonoides y sobre la capacidad antioxidante de las diferentes muestras analizadas antes de la digestión *in vitro*.

En las **Figura 5** se muestra el efecto de la matriz alimentaria y del tratamiento aplicado al líquido de impregnación sobre la cantidad de fenoles, flavonoides y antioxidantes totales liberados al medio durante las diferentes etapas del proceso de simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal.

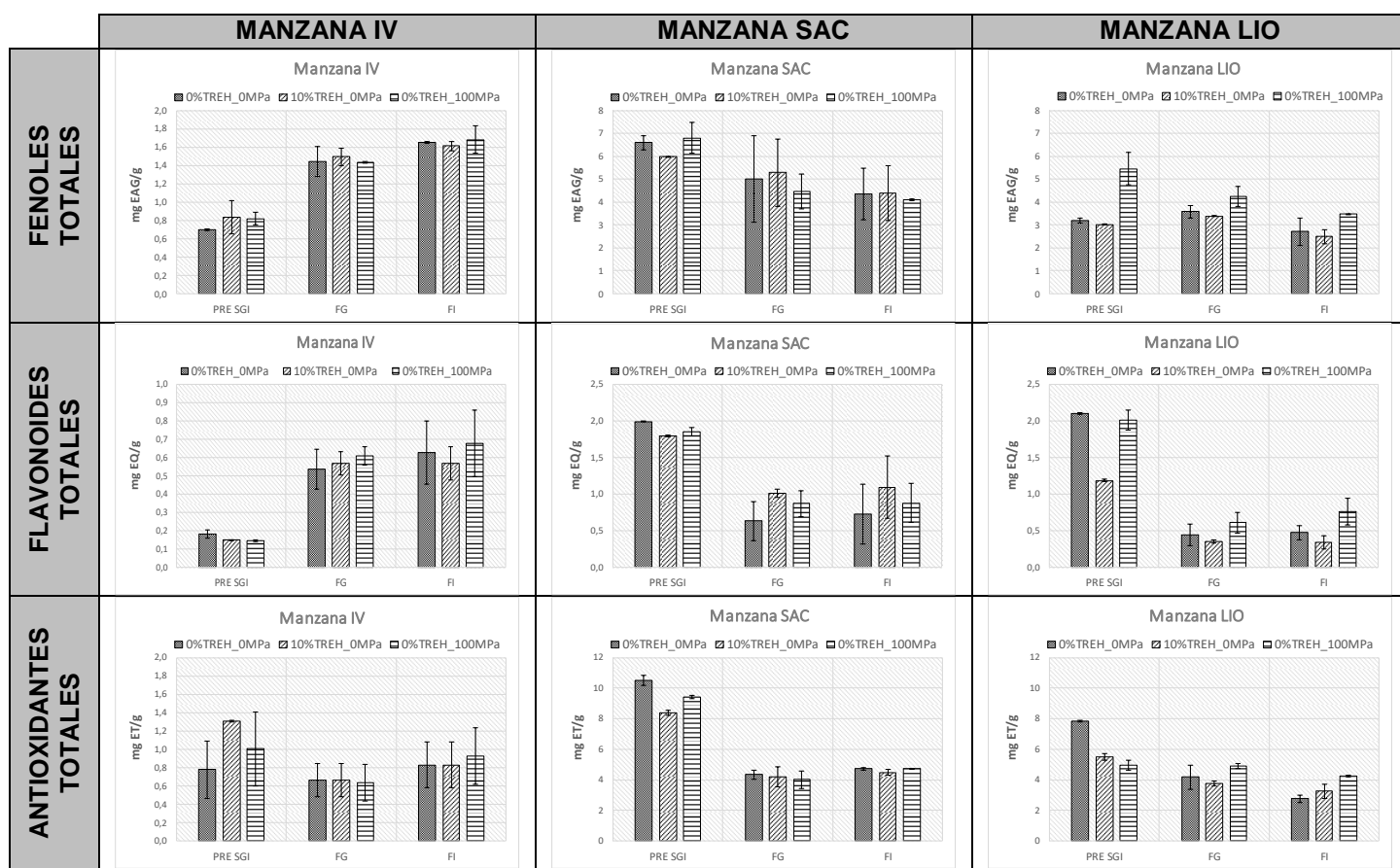


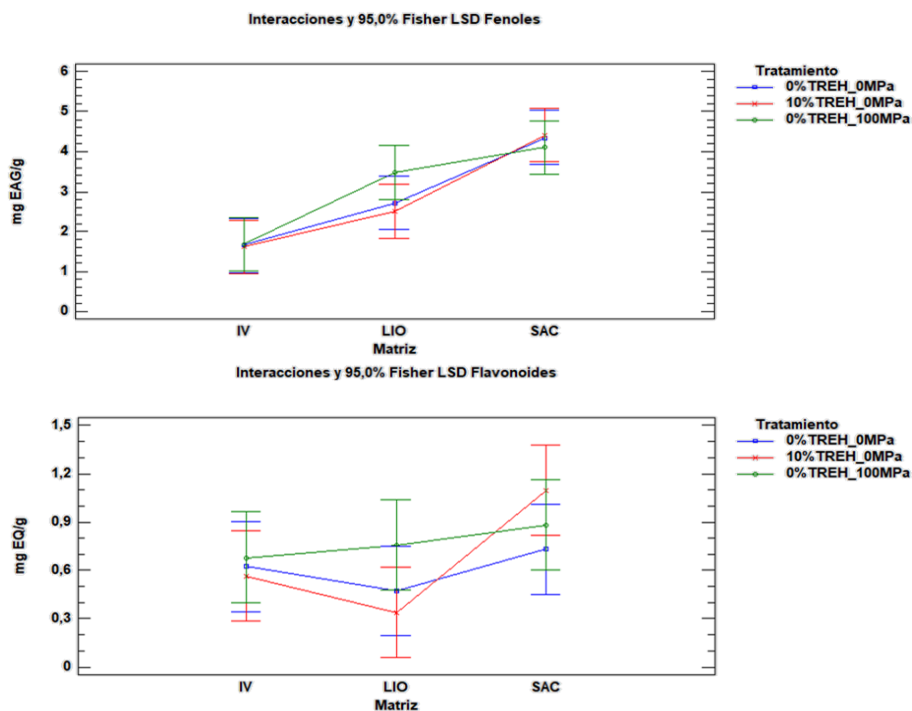
FIGURA 5. Evolución del contenido en fenoles totales (mg EAG/g), flavonoides totales (mg EQ/g) y actividad antioxidante (mg ET/g) a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las diferentes muestras de manzana analizadas.

Lo primero que llama la atención al analizar estos resultados es el notable aumento que experimenta la concentración de fenoles y flavonoides totales en las muestras de manzana IV tras la digestión gástrica e intestinal, en comparación con las muestras de manzana SAC y LIO, en las que la concentración de estos compuestos se ve disminuida por la acción de las disoluciones de pepsina y pancreatina. Este comportamiento podría deberse a que los compuestos fenólicos presentes en las diferentes matrices alimentarias se solubilizaran mejor o peor en los medios de digestión simulada que en la propia mezcla metanol/agua (80/20, v/v) empleada para su extracción. También es posible que, una vez extraídos de las muestras SAC y LIO, los compuestos fenólicos, en especial los del tipo flavonoides, sean más vulnerables a las condiciones de procesado. Por otra parte, el descenso general en la actividad antioxidante de todas las muestras analizadas tras el proceso de digestión confirma la existencia de otros compuestos (del tipo del ácido ascórbico) con efecto sobre su actividad antioxidante y que se solubilizan peor en los jugos gastrointestinales y/o que se degradan más rápidamente durante la simulación *in vitro* de su digestión. Aunque poco concluyentes, los resultados discutidos hasta el momento son similares a los reportados por otros autores que han estudiado la evolución de los

compuestos fenólicos durante el proceso digestivo en diferentes matrices. En productos tales como zumo de granada (Pérez-Vicente et al., 2002), manzana (McDougall et al., 2007), cerezas (Fazzari et al., 2008) o col lombarda (Bouayed et al., 2012), las pérdidas de compuestos fenólicos al final de la digestión se estimaron en torno al 70-75%, mientras que en productos tales como brócoli, vino, zumos y anacardos (Vallejo et al., 2004; Noguer et al., 2008; Wootton-Beard et al., 2011; Chandrasekara & Shahidi, 2012) se observó un efecto favorable de la digestión sobre la liberación de estos compuestos o aumento de su fracción soluble.

Otro aspecto a resaltar de los resultados de la **Figura 5** es la similitud entre las concentraciones que, para un determinado producto, se alcanzan tras las etapas de digestión gástrica e intestinal. Con esto se pondría de manifiesto que los compuestos antioxidantes analizados son solubilizados y/o degradados fundamentalmente durante el contacto con la disolución de pepsina y que permanecen inalterables durante el contacto con la disolución de pancreatina.

Finalmente, para evaluar el efecto que la adición de trehalosa o la homogeneización del líquido de impregnación ejercen sobre la cantidad de compuestos antioxidantes que son extraídos, solubilizados y expuestos durante la digestión de las diferentes matrices alimentarias, en la **Figura 6** se muestran los gráficos de interacción e intervalos LSD obtenidos tras el análisis multifactorial de la varianza llevado a cabo para tal fin.



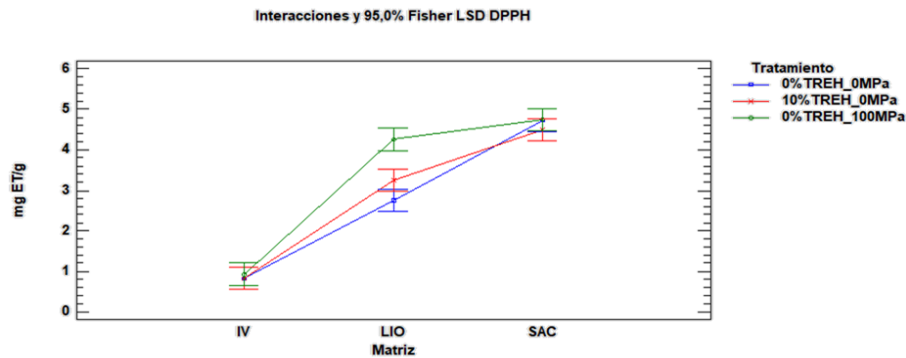


FIGURA 6. Gráficos de interacción e intervalos LSD resultantes del análisis multifactorial de la varianza llevado a cabo para evaluar el grado de significancia de las variables de proceso sobre la liberación de fenoles totales y flavonoides y sobre la capacidad antioxidante tras las tras el proceso completo de digestión *in vitro*.

De acuerdo a los resultados mostrados en la **Figura 6**, el efecto de cada uno de los factores considerados se vio notablemente afectado por el tipo de compuesto analizado. Comenzando por la cantidad de fenoles totales que alcanzan el final del proceso tras la digestión de 1 g de producto, ésta resultó significativamente más elevada en las muestras de manzana deshidratadas que en las simplemente impregnadas. En este caso, la mayor concentración en la que estos compuestos se encuentran en los productos antes de la digestión ($6,5 \pm 0,5$ mg EAG/g en el caso de las muestras de manzana SAC y $3,9 \pm 1,3$ mg EAG/g en el caso de las muestras de manzana LIO) es la principal causa de que, pese a su menor solubilidad y/o mayor degradación en contacto con las disoluciones de pepsina y pancreatina, su concentración en el producto digerido sea significativamente mayor. En ningún caso, la adición de un 10% en peso de trehalosa o la homogeneización del zumo a 100 MPa produjeron efecto significativo alguno sobre la extracción de los fenoles.

En cuanto a la cantidad de flavonoides totales que alcanzan el final del proceso tras la digestión de 1 g de producto, llama la atención que ésta sea muy similar ($\approx 0,7 \pm 0,2$ mg EQ/g) en todas las matrices alimentarias, con independencia de la composición del líquido de impregnación y de la aplicación o no de una u otra técnica de estabilización. Para explicar esto hay que tener en cuenta que, aunque la concentración de flavonoides totales en las muestras IV sin digerir resultó mucho menor ($0,16 \pm 0,02$ mg EQ) que en las muestras SAC ($1,88 \pm 0,10$ mg EQ) y LIO ($1,6 \pm 0,2$ mg EQ), su extracción fue mucho más elevada y/o su degradación mucho menor.

En cuanto a la capacidad antioxidante de las muestras digeridas, ésta se vio solo significativamente afectada por la composición del líquido de impregnación en el caso de las muestras de manzana LIO, en las que se observa una notable mejora en la capacidad antioxidante como consecuencia de la adición de un 10% en peso de trehalosa a la formulación del líquido de impregnación, pero principalmente como consecuencia de la homogeneización del mismo a 100 MPa. Por otra parte, como se ha argumentado anteriormente para el contenido en fenoles totales, la capacidad antioxidante resultó significativamente más elevada en las muestras de manzana deshidratadas que en las simplemente impregnadas.

CONCLUSIONES

El estudio realizado pone de manifiesto que la bioaccesibilidad tanto de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 como de los compuestos antioxidantes se ve afectada fundamentalmente por la matriz estructural de la que formen parte.

La mayor viabilidad del probiótico se observa cuando éste es incorporado en la estructura porosa de manzana mediante la técnica de impregnación a vacío, pero su bioaccesibilidad disminuye significativamente tras la aplicación de una etapa de deshidratación.

Aunque los antioxidantes se encuentren en mayor concentración en las muestras deshidratadas, los cambios estructurales asociados a las operaciones de secado y liofilización disminuyen su bioaccesibilidad de manera que la concentración que alcanzan al final del proceso de digestión es muy similar a la obtenida tras la digestión de las muestras impregnadas.

REFERENCIAS

- Basson, A., Flemming, L.A., Chenia, H.Y. 2007. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microb Ecol* 55, 1-14.
- Betoret E., Betoret, N., Carbonell J.V., Fito P. 2009. Effects of pressure homogenization on particle size and functional properties of citrus juices. *J Food Eng* 92, 18-23.
- Betoret E., Sentandreu E., Betoret N., Codoñer-Franch P., Valls-Bellés V., Fito P. (2012) Homogenization pressures applied to citrus juices manufacturing. Functional properties and application. *J Food Eng* 111, 28-33.
- Bouayed, J.; Deußer, H.; Hoffmann, L.; Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *J. Agric. Food Chem.*, 131, 1466-1472.
- Brand-Williams, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol* 28(1): 25-30.
- Castagnini, J. M., Betoret, N., Betoret, E., & Fito, P. (2015). Vacuum impregnation and air drying temperature effect on individual anthocyanins and antiradical capacity of blueberry juice included into an apple matrix. *LWT - Food Sci Technol*, 64(2), 1289-1296.
- Chandrasekara, N.; Shahidi, F. (2012). Antioxidative potential of cashew phenolics in food and biological model systems as affected by roasting. *Food Chem.*, 129, 1388-1396.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract.
- Conrad, P.B., Miller, D.P., Cielenski, P.R. & De Pablo, J.J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 41, 17-24.
- Contreras, C., Martín, M.E., Martínez-Navarrete, N., & Chiralt, A. (2004). Effect of vacuum impregnation and microwave application on structural changes which occurred during air-drying of apple. *LWT-Food Science and Technology* 38(5), 471-477.
- FAO/WHO. (2002). Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, ON, Canada: FAO/WHO.
- Fazzari, M.; Fukumoto, L.; Mazza, G.; Livrea, M. A.; Tesoriere, L.; Marco, L. D. (2008). In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Agric. Food Chem*, 56(10), 3561-3568.
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret, N., Gras, M., Cháfer, M., Martínez-Monzó, J., Andrés, A., & Vidal, D. (2001). Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering. Application in functional fresh food development. *J Food Eng* 49(2-3), 175-183.

- Iaconelli, C., Lemetals, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P. & Beney, L. (2015). Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *J. Biotechnol*, 214, 17-26.
- Küster-Boluda, I. and Vidal-Capilla, I. (2017). Consumer attitudes in the election of functional foods. *Spanish Journal of Marketing - ESIC*, 21, pp.65-79.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K. P., Dexter, D. T. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Res Int.* 38, 357–367.
- Madureira, A., Amorim, M., Gomes, A., Pintado, M. and Malcata, F. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), pp.465-470.
- Mäkeläinen, H., Forssten, S., Olli, K., Granlund, L., Rautonen, N. and Ouwehand, A. (2009). Probiotic lactobacilli in a semi-soft cheese survive in the simulated human gastrointestinal tract. *Int Dairy J*19(11), pp.675-683.
- McDougall, G.J.; Fyffe, S.; Dobson, P.; Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage—stability to simulated gastrointestinal digestion. *PHYtochemistry*, 68, 1285-1294.
- Meira, Q., Magnani, M., de Medeiros Júnior, F., Queiroga, R., Madruga, M., Gullón, B., Gomes, A., Pintado, M. and de Souza, E. (2015). Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int.*, 76, pp.828-838.
- MOLYNEUX, P. (2004). The use of the setable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
- Noguer, M.; Cerezo, A.B.; Rentzsch, M.; Winterhalter, P.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. (2008). Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography. *J. Agric. Food Chem* 56, 8879-8884.
- Ohtake, Y., & Wang, J. (2011) Trehalose: current use and future applications. *J. Pharm. Sci* 100(6), 2020-2053.
- Oku, K., Sawatani, I., Sugimoto, S., Kanbe, M., Takeuchi, K., Murai, S., Kurose, M., Kubota, M. & Fukuda, S. (2002). Functional properties of trehalose. *J. Appl. Glycosci.* 49, 351-357.
- Patrignani F., Vannini L., Leroy S., Lanciotti R., Guerzoni M.E. (2009) Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *Int J Food Microbiol* 136, 26–31.
- Pérez-Vicente, A.; Gil-Izquierdo, A.; García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J. Agric. Food Chem*, 50, 2308-2312.
- Posso, R.D (2013). Evaluación de las propiedades funcionales del tomate mediante un estudio in vitro de simulación gastrointestinal. Tesis Final de Máster, Universitat Politècnica de Valencia.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., & Adams, M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43, 1–7.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry* 89, 569-575.
- Tabanelli G., Burns P., Patrignani F., Gardini F., Lanciotti R., Reinheimer J., Vinderola G. 2012. Effect of a non-lethal high-pressure homogenization treatment on the in vivo response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiol.* 32, 302-307.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Funct Foods*, 9, 225-241.
- Vallejo, F.; Gil-Izquierdo, A.; Pérez-Vicente, A.; García-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 135-138.
- Wootton-Beard, P.C.; Moran, A.; Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Res. Int.* 44, 217-224.