



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ***ALMACENAMIENTO DE ZUMO DE CLEMENTINA INOCULADO CON *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063): EFECTO DE LA TREHALOSA Y/O LA HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA ADHESIÓN A LA MUCINA INTESTINAL Y OTRAS PROPIEDADES FUNCIONALES***

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

ALUMNA: NICOLE ANDREA BAENA NORIEGA  
TUTOR/A ACADEMICO: NOELIA BETORET VALLS  
COTUTOR/A: MARÍA CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS  
DIRECTOR EXPERIMENTAL:  
CRISTINA GABRIELA BURCA

*Curso Académico: 2018-2019*  
VALENCIA, septiembre 2019

# ALMACENAMIENTO DE ZUMO DE CLEMENTINA INOCULADO CON *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063): EFECTO DE LA TREHALOSA Y/O LA HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA ADHESIÓN A LA MUCINA INTESTINAL Y OTRAS PROPIEDADES FUNCIONALES

Nicole Andrea Baena Noriega, Noelia Betoret Valls, Cristina Barrera Puigdollers

## RESUMEN

Los probióticos son microorganismos que, consumidos en cantidades adecuadas, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud del huésped. Para su inclusión en los alimentos deben ser considerados como ingredientes GRAS y reunir determinados criterios, entre ellos resistir a los procesos de fabricación y almacenamiento y ser capaces de adherirse a la mucosa intestinal. Por ello, en este estudio se evalúa el efecto que el medio de crecimiento (MRS Broth o zumo de clementina comercial), la adición de un 10% (w/w) de trehalosa antes de la inoculación y/o la homogeneización a 100 MPa tras 24 h de incubación ejercen sobre la capacidad de *L. salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) para adherirse a la mucina intestinal, así como sobre la funcionalidad del zumo almacenado a 4 °C durante 30 días. Los resultados obtenidos confirman que el zumo de clementina es un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo probiótico, además de aumentar su habilidad para adherirse a las proteínas de la mucosa intestinal, sin que la adición de trehalosa ni la homogeneización a 100 MPa ni la combinación de ambos factores ejerzan efecto alguno sobre esta propiedad. Por otra parte, se establece que el almacenamiento del zumo fermentado en nevera a 4 °C no debería durar más de 15 días para mantener la condición de bebida probiótica. En términos generales, la homogeneización del zumo a 100 MPa tras 24 h de incubación con el microorganismo resulta ser la mejor opción para reducir la pérdida de viabilidad del mismo durante el almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, la homogeneización acelera la degradación de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento y enmascara el efecto protector que ejerce la trehalosa sobre los mismos.

**PALABRAS CLAVE:** probióticos, antioxidantes, adhesión, trehalosa, homogeneización

## RESUM

Els probiòtics són microorganismes que, consumits en quantitats adequades, exerceixen efectes beneficiosos sobre la salut de l'hoste. Per a la seua inclusió en els aliments han de ser considerats com a ingredients GRAS i reunir determinats criteris, entre ells resistir als processos de fabricació i emmagatzematge i ser capaços d'adherir-se a la mucosa intestinal. Per això, en aquest estudi s'avalua l'efecte que el mitjà de creixement (MRS Broth o suc de clementina comercial), l'addició d'un 10% (w/w) de trehalosa abans de la inoculació i/o l'homogeneïtzació a 100 MPa després de 24 h

d'incubació exerceixen sobre la capacitat de *L. salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) per a adherir-se a la mucina intestinal, així com sobre la funcionalitat del suc emmagatzemat a 4 °C durant 30 dies. Els resultats obtinguts confirmen que el suc de clementina és un mitjà adequat per al creixement del microorganisme probiòtic, a més d'augmentar la seua habilitat per a adherir-se a les proteïnes de la mucosa intestinal, sense que l'addició de trehalosa ni l'homogeneïtzació a 100 MPa ni la combinació de tots dos factors exercisquen efecte algun sobre aquesta propietat. D'altra banda, s'estableix que l'emmagatzematge del suc fermentat en nevera a 4 °C no hauria de durar més de 15 dies per a mantindre la condició de beguda probiòtica. En termes generals, l'homogeneïtzació del suc a 100 MPa després de 24 h d'incubació amb el microorganisme resulta ser la millor opció per a reduir la pèrdua de viabilitat del mateix durant l'emmagatzematge en refrigeració. No obstant això, l'homogeneïtzació accelera la degradació dels compostos fenòlics durant l'emmagatzematge i emmascara l'efecte protector que exerceix la trehalosa sobre aquests.

**PARAULES CLAU:** probiòtics, antioxidants, adhesió, trehalosa, homogeneïtzació

## ABSTRACT

Probiotics are microorganisms that, when consumed in adequate amounts, have beneficial effects on the health of the host. To be included in foods, they must be considered as GRAS ingredients and meet certain criteria, including resisting manufacturing and storage processes and being able to adhere to the intestinal mucosa. Therefore, this study evaluates the effect that the growth medium (MRS Broth or commercial clementine juice), the addition of 10% (w/w) trehalose before inoculation and/or homogenization at 100 MPa after 24 h of incubation exert on the ability of *L. salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) to adhere to the intestinal mucin, as well as on the functionality of the juice stored at 4 °C for 30 days. The results obtained confirm that clementine juice is a suitable medium for the growth of the probiotic microorganism, in addition to increasing its ability to adhere to the proteins of the intestinal mucosa, without the addition of trehalose or homogenization at 100 MPa or the combination of both factors exerting any effect on this property. On the other hand, it is established that the storage of fermented juice in the fridge at 4 °C should not take more than 15 days to maintain the condition of a probiotic drink. Generally, homogenization of the juice at 100 MPa after 24 h incubation with the microorganism is the best option to reduce the loss of viability of the microorganism during refrigerated storage. However, homogenization accelerates the degradation of phenolic compounds during storage and masks the protective effect of trehalose on them.

**KEY WORDS:** probiotics, antioxidants, adhesion, trehalose, homogenization

## INTRODUCCIÓN

Los consumidores están cada vez más concienciados por llevar un estilo de vida saludable. Esto se pone de manifiesto en la creciente demanda de alimentos que promueven el mantenimiento y la mejora de la salud, entre los que se encuentran los alimentos ricos en probióticos (Martins et al., 2013). Se entiende por probiótico cualquier microorganismo vivo que, al ser suministrado en cantidades adecuadas (en torno a  $10^8$ - $10^9$  UFC/día), ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (FAO/WHO, 2002). Para que estos microorganismos puedan ser incluidos en los alimentos deben ser considerados como ingredientes **GRAS (generalmente reconocidos como seguros)**, además de reunir unos criterios tales como: resistir las condiciones ácidas del estómago y las enzimas digestivas del tracto, ser capaces de adherirse a la mucosa intestinal, excluir de forma competitiva a los patógenos, resistir los procesos de producción y almacenamiento industriales, ser inocuos y haberse demostrado científicamente su eficiencia. Las cepas probióticas más utilizadas en la industria alimentaria pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se emplean cepas de *Enterococcus* y *Propionibacterium* (Collado et al., 2010; FAO/OMS, 2006; FDA, 2018). Entre los efectos beneficiosos que ejercen los probióticos sobre la salud de los consumidores cabe destacar la prevención de la diarrea causada por ciertas bacterias patógenas y virus, la estimulación del sistema inmune del huésped, la reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa y la prevención del estreñimiento, entre otros (FAO/OMS, 2006). Todo ello se debe a la combinación de diferentes mecanismos de acción: inducción de un pH ácido que favorece el crecimiento de determinadas bacterias en el colon, competición con los patógenos por los sitios de unión y los nutrientes y aumento de la función barrera de la mucosa intestinal (Collado et al., 2010). Según esto, la habilidad de la cepa probiótica para adherirse a la mucosa intestinal será fundamental para que ésta pueda ejercer su efecto beneficioso. Para evaluar esta propiedad suelen emplearse modelos *in vitro* con líneas celulares epiteliales humanas, en su mayoría Caco-2 y HT29, o tejido intestinal humano (Collado et al., 2010).

En cuanto a los alimentos que incorporan estos probióticos, se trata en su mayoría de productos lácteos fermentados, ya que la leche resulta una excelente matriz alimentaria para tal fin. Sin embargo, estos productos tienen altos niveles de colesterol, lactosa y proteínas que pueden limitar su consumo en algunos grupos de población. Por ello, existe un creciente interés por desarrollar productos probióticos no lácteos para responder a las necesidades nutricionales de los vegetarianos, intolerantes a la lactosa, alérgicos a las proteínas de la leche y consumidores con dietas restrictivas por el colesterol (Granato et al., 2010; Ranadheera et al., 2010). En concreto, la industria alimentaria se está planteando utilizar frutas, verduras y cereales para desarrollar productos probióticos de base no láctea y satisfacer las necesidades de estos grupos específicos (Peres et al., 2012). Por lo general, las bebidas son las matrices con mejores índices de crecimiento, tanto en el procesado como en la conservación (Vasudha y Mishra, 2013). El uso de vegetales permite, además, desarrollar alimentos que conserven su integridad celular, como es el caso de las manzanas impregnadas con bacterias probióticas (Martins et al., 2013).

Respecto a la viabilidad de los probióticos en los alimentos, ésta puede verse afectada por varios factores (Tripathi y Giri, 2014): factores relacionados con la composición del

alimento (pH, oxígeno, presencia de sales, azúcares, etc.), factores relacionados con las condiciones de procesado y almacenamiento y factores de tipo microbiológico (cantidad inoculada, tipo de cepa, etc.). En este aspecto, gracias a los avances tecnológicos, se ha logrado mejorar la vida útil del probiótico desde su producción hasta el momento de ser consumido. Algunas de las técnicas empleadas para solventar este problema son el cambio en las condiciones de procesado y almacenamiento, la adición de diferentes agentes protectores o la encapsulación (Tripathi y Giri, 2014). En relación con la adición de agentes protectores, se puede emplear la trehalosa, que es un disacárido no reductor constituido por dos moléculas de glucosa que se encuentra en diversos organismos, en los cuales actúa como azúcar de reserva y como protector ante el estrés abiótico (Ohtake y Wang, 2011). Entre sus funciones, la trehalosa es capaz de mantener y preservar un extenso grupo de moléculas biológicamente activas. Este efecto es debido al establecimiento de interacciones que contribuyen a crear una barrera capaz de mantener la integridad de las estructuras celulares y prevenir su descomposición durante las operaciones de procesado y almacenamiento (Colaço y Roser, 1994).

Otra técnica que permite mejorar la funcionalidad de los probióticos es la homogeneización a alta presión. Se trata de una tecnología no térmica que se aplica para inactivar enzimas, mejorar la calidad sensorial y tecnológica de los alimentos y aumentar la disponibilidad de compuestos activos. En un estudio realizado por Betoret et al. (2012) se ha demostrado que la aplicación de esta técnica en zumos de mandarina incrementa la estabilidad de la suspensión y, por tanto, mejora la disponibilidad de compuestos bioactivos con actividad antioxidante. En lo concerniente a los microorganismos probióticos, esta tecnología se ha aplicado para incrementar la supervivencia de estas cepas y/o mejorar sus propiedades funcionales. Burns et al. (2015) aplicó altas presiones de homogeneización en un rango entre 60 y 100 MPa con el fin de incrementar la viabilidad de *L. paracasei* A13 y *L. acidophilus* 08 en leches fermentadas y quesos. Por otra parte, Tabanelli et al. (2013) y Betoret et al. (2017) demostraron que al emplear una presión de 50 MPa se produjo una mejora de las propiedades funcionales del probiótico tales como la hidrofobicidad, la autoagregación y la resistencia al estrés biológico en diferentes matrices alimentarias y también preservó la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento en refrigeración. La hidrofobicidad celular se ha relacionado con la capacidad de adhesión de la cepa y, tal y como se ha comentado anteriormente, se considera un factor importante para la interacción de bacterias probióticas con el intestino y las células inmunes asociadas a él (Burns et al., 2011). Finalmente, la aplicación de altas presiones de homogeneización también puede incrementar la resistencia del microorganismo probiótico a la digestión gastrointestinal.

Por lo comentado anteriormente, el presente trabajo se plantea con el objetivo de estudiar el efecto que el medio de crecimiento (MRS Broth o zumo de clementina comercial), el estrés osmótico y/o el estrés causado por un gradiente de presión ejercen sobre la capacidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) para adherirse a la mucina intestinal. Por otra parte, se analizará cómo estas mismas variables afectan a la funcionalidad de un zumo de clementina inoculado e incubado durante 24 horas a 37 °C con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 49063 durante su almacenamiento en refrigeración a 4 °C. Por propiedades funcionales se considera el contenido en fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante medida por diferentes métodos (DPPH y ABTS), además del contenido en células vivas y con potencial efecto probiótico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Materia prima

Para llevar a cabo este experimento, se utilizó zumo de clementina comercial (marca Hacendado) como medio de crecimiento para el microorganismo probiótico. Adicionalmente, se empleó trehalosa de grado alimentario obtenida a partir de almidón de tapioca (TREHA™, Cargill, Ibérica, Barcelona, España), la cual se incorporó al zumo de clementina debido a su capacidad de mantener y preservar moléculas biológicamente activas. Finalmente, se seleccionó la cepa de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia) por su potencial efecto probiótico.

### Recuperación del microorganismo

Antes de inocular los zumos objeto de estudio fue necesario reactivar la cepa empleada. Para ello, el microorganismo se descongeló y resuspendió en el caldo agar MRS Broth estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) con el fin de favorecer un óptimo crecimiento. El medio inoculado se incubó en aerobiosis a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se comprobó el número de células vivas mediante la técnica de dilución seriada, siembra en superficie de agar MRS, incubación y posterior recuento. De esta forma se obtuvieron caldos con una concentración microbiana en torno a 10<sup>9</sup> UFC/mL.

### Preparación del zumo probiótico

Con el fin de favorecer el crecimiento del microorganismo probiótico en el zumo de clementina, éste se enriqueció con extracto de levadura (5 g/L) y su pH se elevó desde 3,8 hasta 6,5 mediante la adición de bicarbonato de sodio (9,8 g/L). A una parte del zumo se le incorporó trehalosa en su formulación en una proporción de 100 g/Kg. Para disolver correctamente todos los ingredientes, la mezcla de estos se realizó en agitación. A continuación, el zumo fue inoculado con el caldo MRS (4 mL/L) que contenía el microorganismo activo y se incubó a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se procedió a la homogeneización de una parte del zumo aplicando una presión de 100 MPa en un homogenizador de altas presiones a escala de laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia). Se prepararon un total de 4 muestras diferentes de zumo enriquecido con la cepa probiótica:

- Z0%\_0MPa: zumo de clementina sin trehalosa y sin homogeneizar.
- Z0%\_100 MPa: zumo de clementina sin trehalosa y homogeneizado a 100 MPa tras la incubación durante 24 h a 37 °C.
- Z10%\_0MPa: zumo de clementina con trehalosa (10%, w/w) y sin homogeneizar.
- Z10%\_100 MPa: zumo de clementina con trehalosa (10%, w/w) y homogeneizado a 100 MPa tras la incubación durante 24 h a 37 °C.

Finalmente, los zumos se almacenaron en refrigeración (4 °C) durante 30 días.

## Determinaciones analíticas

A lo largo del almacenamiento en refrigeración (0, 1, 2, 3, 7, 10, 15, 21 y 30 días) se analizaron las muestras en términos de pH, contenido en sólidos solubles (Brix), contenido en células vivas y propiedades antioxidantes, concretamente el contenido en fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante medida por diferentes métodos (DPPH y ABTS). Previamente al almacenamiento de los zumos también se evaluó la capacidad de la cepa probiótica incorporada para adherirse a la mucosa intestinal.

### SÓLIDOS SOLUBLES (Brix)

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

### DETERMINACIÓN DEL pH

El pH de las muestras líquidas se midió a 25 °C con un potenciómetro con sistema autocalibrante (pH Meter S20, Mettler Toledo - Seven Easy) capaz de trabajar con compensación automática de temperatura. El equipo se calibró previamente con disoluciones tampón a pH 4,0 y 7,0.

### RECuento DE CÉLULAS VIABLES

La concentración de células vivas presentes en los diferentes zumos formulados se determinó mediante el procedimiento de dilución seriada en agua destilada estéril y siembra en placa (ICMSF, 2000). La siembra se realizó en la superficie de placas Petri con agar MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), que se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se realizó el recuento de las placas con un número de colonias comprendido entre 30 y 300.

### CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

El contenido en fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965). Esta metodología está basada en la capacidad que tienen los compuestos fenólicos presentes en la muestra de reducir a pH básico el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfowolfrámico y ácido fosfomolibdico). Como resultado de esta reacción, el reactivo de color amarillo adquiere una coloración azul cuya intensidad se mide con un espectrofotómetro a 760 nm (Medina, 2010).

Concretamente, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 125 µL de la muestra de zumo diluida en agua bidestilada en una proporción 1:5 (v/v), 125 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 500 µL de agua bidestilada. Tras 6 min de reposo en oscuridad, se adicionaron 1,25 mL de bicarbonato de sodio al 7,5% (m/v) y 1 mL de agua bidestilada. Como referencia, se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de 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. Paralelamente se obtuvo una recta de calibrado utilizando ácido gálico como fenol de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 ppm. Los

resultados obtenidos se compararon con este patrón de ácido gálico y se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por mL de zumo (mg EAG/mL).

### CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES

El contenido en flavonoides totales se determinó mediante el método colorimétrico propuesto por Luximon-Rama et al. (2005). Para ello, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 1,5 mL de zumo de clementina diluido en agua bidestilada en una proporción 1:5 (v/v) y 1,5 mL de una disolución de cloruro de aluminio al 2% (m/v) en metanol. Después de 10 min de reposo en oscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 368 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se sustituyó por el mismo volumen de agua bidestilada. Paralelamente se obtuvo una recta de calibrado utilizando quercetina como flavonoide de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 ppm. Los resultados obtenidos se compararon con este patrón de quercetina y se expresaron en miligramos equivalentes de quercetina por mL de zumo (mg EQ/mL).

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ABTS-TEAC

Este método se basa en medir la decoloración que experimenta el catión ABTS<sup>•+</sup> que, tras secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra, se reduce y pasa de un color verdeazulado a incoloro. En primer lugar, para liberar el catión ABTS<sup>•+</sup> se preparó una disolución 7 mM de ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) y 2,45 mM de persulfato potásico en agua bidestilada y se incubó en oscuridad durante 16 h. Transcurrido este tiempo, la disolución se diluyó en tampón fosfato hasta conseguir una absorbancia de  $0,7 \pm 0,01$  leída a 734 nm (Re et al., 1999). A continuación, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 2910  $\mu$ L de esta disolución y 90  $\mu$ L de zumo de clementina diluido en agua bidestilada en una proporción 1:5 (v/v). Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Tras 6 min de reposo en oscuridad, se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Paralelamente se obtuvo una recta de calibrado utilizando trólox como antioxidante de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 200 ppm. Los resultados obtenidos se compararon con este patrón de trólox y se expresaron en mg equivalentes de trólox por mL de zumo (mg ET/mL).

### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Este método se basa en medir el cambio de coloración que experimenta el radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) que, tras secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra, se reduce y pasa de un color morado a una coloración amarilla (Brand-Williams et al., 1995; Molyneux, 2004). Para ello, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 100  $\mu$ L de zumo de clementina diluido en agua bidestilada en una proporción 1:5 (v/v), 900  $\mu$ L de metanol y 2000  $\mu$ L de una disolución de DPPH 100 mM en metanol. Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se sustituyó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 30 min de reposo en oscuridad, se



midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Paralelamente se obtuvo una recta de calibrado utilizando trólox como antioxidante de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 200 ppm. Los resultados obtenidos se compararon con este patrón de trólox y se expresaron en miligramos equivalentes de trólox por mL de zumo (mg ET/mL).

## ADHESIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS A LA MUCOSA INTESTINAL

Para evaluar de qué manera afectan el medio (agar MRS Broth o zumo de clementina), la incorporación de trehalosa y la homogeneización sobre la capacidad del microorganismo probiótico de adherirse a la mucina intestinal, se empleó una técnica basada en marcar las bacterias con carboxifluoresceína (cFDA) antes de añadir las a celdas multipocillo que contienen la proteína inmovilizada. Tras 1 h de incubación a 37 °C, se lavó con PBS para eliminar las células no adheridas y se midió la señal fluorescente de las células adheridas en un equipo Fluoroskan Ascent plate reader (Thermo Scientific) a una longitud de onda 485 nm de excitación y 538 nm de emisión.

En este estudio se ha evaluado la adhesión de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* a tres proteínas: mucina, colágeno y albúmina de suero bovino (BSA). Para ello, se prepararon disoluciones de 500 ppm de cada proteína en tampón fosfato y 100 µL de cada disolución se inmovilizaron en un par de filas de una placa multipocillo (96 pocillos) de poliestireno negro (Maxisorp, Nunc, Denmark) mediante incubación a 4 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con 200 µL de PBS 1x con el fin de eliminar las proteínas no adheridas.

Por otra parte, el caldo MRS y las muestras de zumo inoculadas con el probiótico e incubadas en condiciones aerobias a 37 °C durante 24 h se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Seguidamente se retiró el sobrenadante y el probiótico precipitado se transfirió a tubos Eppendorf. Se añadieron 2 mL de tampón fosfato PBS en los tubos y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. Tras la centrifugación, se retiró nuevamente el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con PBS seguido de centrifugación con el fin de eliminar los restos de medio de cultivo. El probiótico precipitado se resuspendió nuevamente en PBS. Una vez preparadas las muestras, se ajustó su absorbancia medida por espectrofotometría a 600 nm a  $0,25 \pm 0,05$ , equivalente a una concentración microbiana de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL. Esta suspensión bacteriana se marcó con 75 µM de carboxifluoresceína (cFDA) en oscuridad y se dejó en reposo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, las células bacterianas se centrifugaron y se lavaron con tampón fosfato para eliminar los restos de cFDA.

En la placa multipocillo, la cual contenía las diferentes proteínas adheridas, se emplearon también microorganismos como controles positivo y negativo. Se añadieron 100 µL de la suspensión de bacterias de la cepa *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* marcadas con cFDA a cada una de las celdas de la placa multipocillo y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Tras la incubación, las celdas se lavaron dos veces con 200 µL de PBS para eliminar las células no adheridas. A continuación, se adicionaron 100 µL de PBS a las bacterias adheridas para no medir la fluorescencia en seco. Así mismo, se incorporaron 100 µL de la suspensión bacteriana marcada con cFDA en pocillos que contenían también las proteínas con el fin de tomarlos como medida de referencia de fluorescencia. La señal fluorescente de las bacterias adheridas a la mucina se midió con un equipo Fluoroskan Ascent plate reader (Thermo Scientific) a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión. La

adhesión se expresó como el porcentaje de fluorescencia recuperado después de la adhesión en relación con la fluorescencia de la suspensión bacteriana añadida a la mucina inmovilizada en la placa.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Statgraphics Centurion XVI. II. Se realizó un análisis simple y multifactorial de la varianza (ANOVA) para evaluar, con un nivel de confianza del 95%, el grado de significancia de las diferencias observadas entre los factores analizados en diferentes condiciones de proceso.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de los zumos tras 24 h de incubación con *L. salivarius* spp. *salivarius*

En la **tabla 1**, se muestra el efecto que la adición de un 10% de trehalosa y/o la homogeneización a 100 MPa ejercen sobre el contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* del zumo de clementina comercial. En la misma tabla se muestra también la variación en el pH y en el contenido en sólidos solubles de los zumos tras 24 h de incubación a 37 °C con el microorganismo probiótico. Cabe destacar que, en todos los casos, las muestras fueron inoculadas con 4 mL de caldo MRS con un contenido microbiano en torno a 10<sup>9</sup> UFC/mL.

**TABLA 1.** Valores de pH, Brix y recuento de viables en zumos de clementina sometidos a diferentes tratamientos tras 24 h de incubación a 37 °C (t = 0).

Zumo	pH	Brix	Log UFC/mL
Z0%_0MPa	4,39 ± 0,03 <sup>bc</sup>	11,60 ± 0,28 <sup>a</sup>	9,46 ± 0,05 <sup>b</sup>
Z0%_100MPa	4,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	11,75 ± 0,07 <sup>a</sup>	8,67 ± 0,44 <sup>a</sup>
Z10%_0MPa	4,42 ± 0,03 <sup>c</sup>	18,70 ± 0,10 <sup>b</sup>	9,38 ± 0,08 <sup>b</sup>
Z10%_100MPa	4,34 ± 0,01 <sup>ab</sup>	18,65 ± 0,07 <sup>b</sup>	8,92 ± 0,03 <sup>a</sup>

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

Como se puede observar, el zumo de clementina resultó un medio adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* y la adición de un 10% de trehalosa a la composición de este apenas afectó a la viabilidad del probiótico. Sin embargo, tras la homogeneización a 100 MPa se redujo significativamente (p-valor < 0,05) el contenido microbiano de estos zumos. A pesar de ello, todos los zumos presentaron tras 24 h de incubación recuentos microbianos lo suficientemente elevados (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> UFC/mL) como para poder afirmar de ellos que se trata de zumos ricos en probióticos con un potencial efecto beneficioso sobre la salud del huésped (FAO/WHO, 2002; Karimi et al., 2011; Tripathi y Giri, 2014).

En relación con el pH y los Brix de los zumos, ambos se vieron significativamente reducidos como consecuencia del crecimiento del microorganismo probiótico y la

producción de ácido láctico por parte de este (Gómez y Jarrín, 2015), no pudiéndose establecer una correlación entre el mayor o menor crecimiento microbiano y el mayor o menor descenso en dichos parámetros. Por otra parte, como era de esperar, los zumos que incluían trehalosa en su composición presentaron un mayor contenido en sólidos solubles totales tras 24 h de incubación con la cepa probiótica, lo que seguramente condicionará la aceptación del producto por parte del consumidor.

En la **tabla 2** se muestra cómo la adición de trehalosa y/o la homogeneización a 100 MPa afectan al contenido en antioxidantes de los zumos tras 24 h de incubación con el microorganismo probiótico. Aunque estos efectos ya han sido analizados por otros autores (Barrera et al., 2019), resulta imprescindible volver a comentarlos en aras de poder justificar su evolución a lo largo del posterior almacenamiento.

**TABLA 2.** Propiedades antioxidantes de los zumos de clementina sometidos a diferentes tratamientos tras 24 h de incubación a 37 °C (t = 0).

zumo	FENOLES TOTALES mg EAG/mL	FLAVONOIDES TOTALES mg EQ/mL	DPPH mg ET/mL	ABTS mg ET/mL
<b>Z0%_0MPa</b>	0,78 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,24 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,315 ± 0,011 <sup>ab</sup>	1,30 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>Z0%_100MPa</b>	0,75 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>Z10%_0MPa</b>	0,83 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,69 ± 0,12 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,06 <sup>a</sup>
<b>Z10%_100MPa</b>	0,79 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,39 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,242 ± 0,012 <sup>ab</sup>

<sup>a, b, c...</sup> letras diferentes para una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Cabe mencionar que, debido a la gran reproducibilidad de los datos experimentales, el análisis estadístico reveló diferencias significativas en las propiedades antioxidantes analizadas en el zumo en función del tratamiento aplicado. Sin embargo, lo cierto es que en todos los zumos analizados el contenido en fenoles y flavonoides totales resultó del mismo orden, así como la actividad antioxidante medida por los métodos DPPH y ABTS.

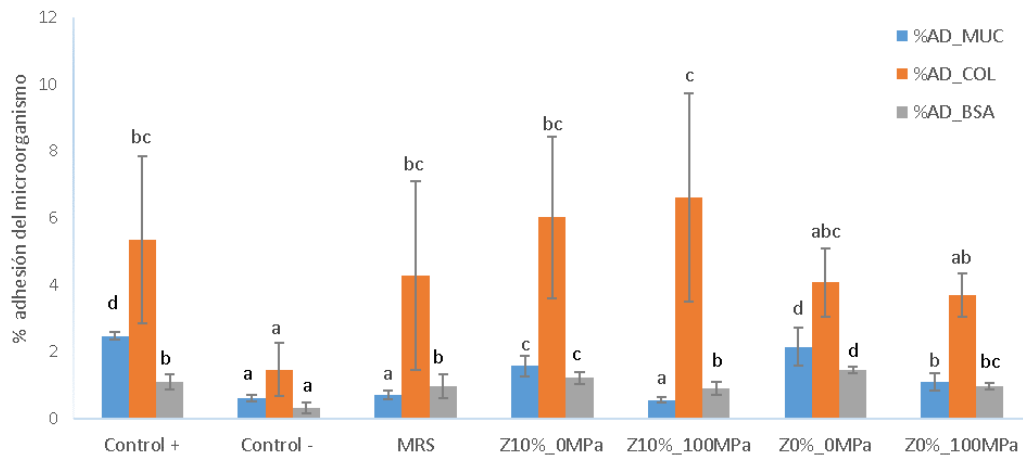
Por un lado, la adición de un 10% de trehalosa a la formulación del zumo aumentó significativamente el contenido en flavonoides totales, pero disminuyó la actividad antioxidante total medida por el método ABTS. Este incremento se debe a la capacidad de este disacárido para prevenir la oxidación de determinados compuestos fenólicos. Diversos estudios muestran que el efecto estabilizador de la trehalosa se debe a su configuración química, que le permite unirse fácilmente a grupos polares con múltiples puntos de interacción (Crowe et al., 1984; Elbein, 1974; Higashiyama, 2002). Por otro lado, el aumento en el contenido en flavonoides totales podría deberse también a que el probiótico, en presencia de trehalosa, en lugar de obtener la energía de los nutrientes del zumo lo hace del propio disacárido y libera como resultado compuestos fenólicos, fundamentalmente flavonoides (Ortiz, 2015; Picard, 2015). En relación con el contenido en fenoles totales, el motivo por el cual éste no se vio significativamente incrementado por la presencia de trehalosa podría ser la capacidad del propio disacárido para unirse a

estos compuestos a través de sus grupos -OH, impidiendo que puedan reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu empleado para su determinación analítica (Picard, 2015).

Por otro lado, la homogeneización del zumo tras la incubación con el probiótico aumentó significativamente el contenido en flavonoides totales, pero apenas afectó a las demás propiedades antioxidantes analizadas. Este incremento en los flavonoides totales puede deberse a que gran parte de los compuestos fenólicos del zumo están asociados a las partículas de la pulpa que forman parte de la nube, de manera que cuando se aplican altas presiones de homogeneización se consigue reducir el tamaño de estas partículas, la nube se estabiliza y los compuestos fenólicos se liberan y aumentan su disponibilidad (Arnao et al., 1997). Por otra parte, al liberarse más compuestos fenólicos, estos quedarían más expuestos a la luz y al oxígeno de manera que, incluso en presencia de trehalosa, su degradación se vería acelerada (Guacho, 2018). Respecto al efecto de las dos variables de proceso aplicadas, al comparar las muestras homogeneizadas con trehalosa (Z10%\_100MPa) con aquellas que no contenían este disacárido (Z0%\_100MPa), se observa que la adición de un 10% de trehalosa disminuyó el contenido en flavonoides totales pese a que el análisis estadístico no reveló diferencias significativas. Las demás propiedades antioxidantes analizadas a penas se vieron afectadas. Como ya se ha mencionado anteriormente, esta reducción podría deberse a la rápida degradación de los compuestos fenólicos liberados tras homogeneizar el zumo, o bien, a que la trehalosa no está disponible en cantidad suficiente para unirse a los grupos -OH de estos compuestos y ejercer su efecto protector. En relación con esto, otro motivo podría ser que, la presencia de trehalosa interfiera en la reacción de los flavonoides con el reactivo, quedando menos fenoles disponibles para su determinación analítica.

Finalmente, es interesante resaltar la diferente afinidad que existe entre los compuestos antioxidantes presentes en los zumos y los radicales de referencia empleados en los diferentes métodos de determinación de la actividad antioxidante. En general, predominan los compuestos con carácter hidrofílico, los cuales presentan una mayor afinidad por el radical ABTS que por el radical DPPH, lo que explicaría la mayor actividad antioxidante medida por el método ABTS (Arnao, 2000).

Para concluir la caracterización de los zumos transcurridas 24 h desde su inoculación con el microorganismo, en la **figura 1** se muestra la capacidad de la cepa CECT 4063 de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* para adherirse a la mucina (MUC), el colágeno (COL) y la albúmina de suero bovino (BSA) en función de la composición del medio en el que se ha hecho crecer. En este ensayo se estudia la adhesión a la mucina y el colágeno puesto que estas forman parte de la mucosa intestinal, la adhesión del lactobacilo a estas proteínas estará relacionada con su habilidad para colonizar el intestino y prevenir la adhesión de los patógenos. Por otro lado, para determinar si la adhesión bacteriana al moco fue causada por interacciones no específicas, también se probó la adhesión a la albúmina sérica bovina (BSA).



**FIGURA 1.** Capacidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* para adherirse a la mucina (MUC), el colágeno (COL) y la albúmina de suero bovino (BSA) en función de la composición del medio en el que se ha hecho crecer y las variables de proceso empleadas. <sup>abc...</sup> letras diferentes en una misma serie indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05).

Tal como se ha mencionado anteriormente, la capacidad de adhesión de la cepa probiótica a la mucosa intestinal es importante para que ésta pueda ejercer un efecto beneficioso sobre el huésped. El moco contiene receptores que reconocen proteínas de adhesión específicas. Estas proteínas de adhesión se encuentran en la superficie de la cepa probiótica y por medio de éstas el microorganismo puede unirse a las células epiteliales del intestino delgado. Con ello contribuye a la exclusión competitiva de los patógenos y proporciona estabilidad a la flora microbiana del individuo.

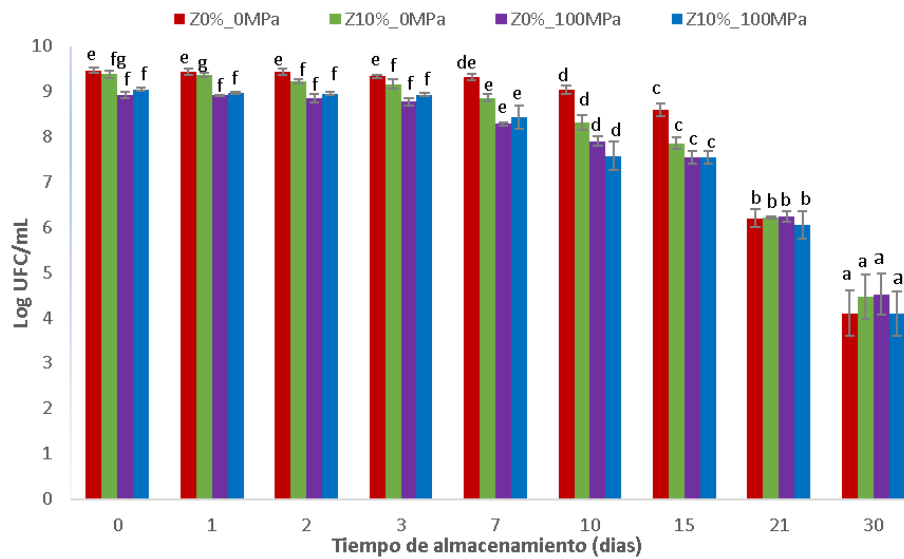
Como se pone de manifiesto en la **figura 1**, la afinidad entre el microorganismo y cada una de las proteínas estudiadas resultó ser muy diferente. Todos los microorganismos ensayados (incluida la cepa CECT 4063 de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*) presentaron una mayor afinidad por el colágeno que por las otras dos proteínas. Esto se debe a que los lactobacilos expresan múltiples tipos de adhesinas capaces de interactuar con el colágeno de la mucosa intestinal. Entre ellas destaca la adhesina Cbp, que ejerce un papel decisivo en la colonización efectiva y en el desplazamiento competitivo de los patógenos intestinales, especialmente *E. coli* 0157:H7, por lo que podría servir como potencial biomarcador probiótico (Yadav et al., 2013).

En comparación con el microorganismo empleado como control positivo, el *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* crecido en medio MRS presentó una menor capacidad para adherirse a la mucina ( $0,72 \pm 0,12\%$  frente a  $2,48 \pm 0,12\%$ ) y una capacidad similar para adherirse al colágeno ( $4 \pm 2\%$  frente a  $5 \pm 3\%$ ) y a la albúmina de suero bovino ( $1,0 \pm 0,4\%$  frente a  $1,1 \pm 0,2\%$ ). El empleo del zumo de clementina (Z0%\_0MPa) como medio de crecimiento en lugar del medio específico MRS aumentó la capacidad del microorganismo para adherirse a cualquiera de las tres proteínas consideradas, alcanzando valores similares a los del control positivo (en el caso de la mucina y el colágeno) o incluso superiores (en el caso de la albúmina de suero bovino). De esta forma se confirma que los zumos de frutas constituyen una excelente matriz

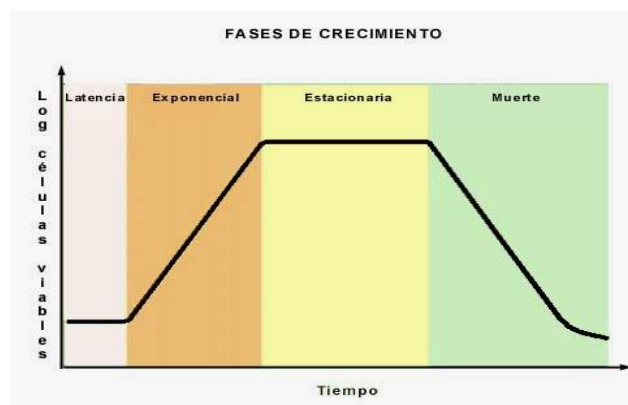
alimentaria para el crecimiento del lactobacilo y la mejora de sus propiedades probióticas. Ni la adición de trehalosa al zumo antes de ser inoculado, ni la homogeneización a 100 MPa del zumo inoculado y fermentado, ni la combinación de estos dos factores mejoró significativamente la capacidad del microorganismo para adherirse a las proteínas. Cabe resaltar que, aunque el análisis estadístico no reveló diferencias significativas, la capacidad del *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* para adherirse al colágeno fue ligeramente superior a la del microorganismo empleado como control positivo cuando se hizo crecer en el zumo de clementina que contenía un 10% (w/w) de trehalosa y, tras 24 h de incubación, fue homogeneizado a 100 MPa. Sin embargo, en estas condiciones el mismo microorganismo presentó los valores más bajos de adhesión a la mucina. Ya en un estudio previo, Celebioglu et al. (2017) observaron que la trehalosa influye en algunas propiedades de las bacterias ácido-lácticas, como en la producción de bacteriocinas o la tasa de crecimiento, pero no se apreciaron cambios en las propiedades de adhesión a la mucina. En cuanto a la aplicación de altas presiones de homogeneización, los resultados obtenidos en este estudio difieren de los mostrados por otros autores (Betoret et al., 2017; Tabanelli et al., 2012) quienes constataron que las presiones de homogeneización pueden cambiar la estructura celular de los microorganismos y aumentar su hidrofobicidad, facilitando de esta forma su adhesión a las paredes del tracto digestivo.

### **Análisis de los zumos fermentados con *L. salivarius* spp. *salivarius* durante 30 días de almacenamiento**

En este apartado se analiza cómo evoluciona el contenido en microorganismos y en antioxidantes de los zumos de clementina fermentados con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C. Para empezar, en la **figura 2** se muestran los resultados del recuento de viables. Como se puede observar, en todos los casos el número de células vivas se mantuvo constante durante los 3 primeros días de almacenamiento, lo que coincide con lo constatado previamente por otros autores (Betoret et al., 2017). A partir del séptimo día la población microbiana comenzó a disminuir de forma significativa (p-valor < 0,05), pero no fue hasta el día 21 cuando alcanzó valores por debajo de 10<sup>6</sup> UFC/mL, considerada la concentración mínima necesaria para que el alimento pueda recibir el calificativo de probiótico (IDF/FIL, 1992). Al comparar la evolución en el recuento de viables con la curva teórica de crecimiento microbiano (**figura 3**), se comprueba que los primeros días de almacenamiento coinciden con la fase estacionaria, en la que cesa el crecimiento debido a la baja temperatura, al agotamiento de nutrientes y oxígeno y/o a la excreción de ácidos orgánicos y otros contaminantes bioquímicos al medio. Por otro lado, la reducción de la población microbiana al final del almacenamiento coincide con la fase de muerte celular causada, entre otros factores, por las condiciones tóxicas del medio. Cabe destacar que la refrigeración retrasa la progresión de la fase de muerte celular, haciendo que los cultivos sean viables durante un mayor tiempo (Tortora et al., 2007).



**FIGURA 2.** Evolución del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) en los diferentes zumos durante 30 días de almacenamiento. a, b, c... letras diferentes para una misma serie indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor < 0,05).



**FIGURA 3.** Curva típica del crecimiento microbiano. FUENTE: Tortora et al., 2007.

Con el fin de determinar el efecto positivo o negativo que la adición de un 10% de trehalosa y/o la homogeneización a 100 MPa ejercen sobre la viabilidad del probiótico, se ha realizado un análisis estadístico de la variación que se produce en la pérdida de viabilidad del microorganismo ( $\Delta V$ ) entre el inicio ( $t = 0$ ) y el final ( $t = 30$  días) del almacenamiento (ecuación 1).

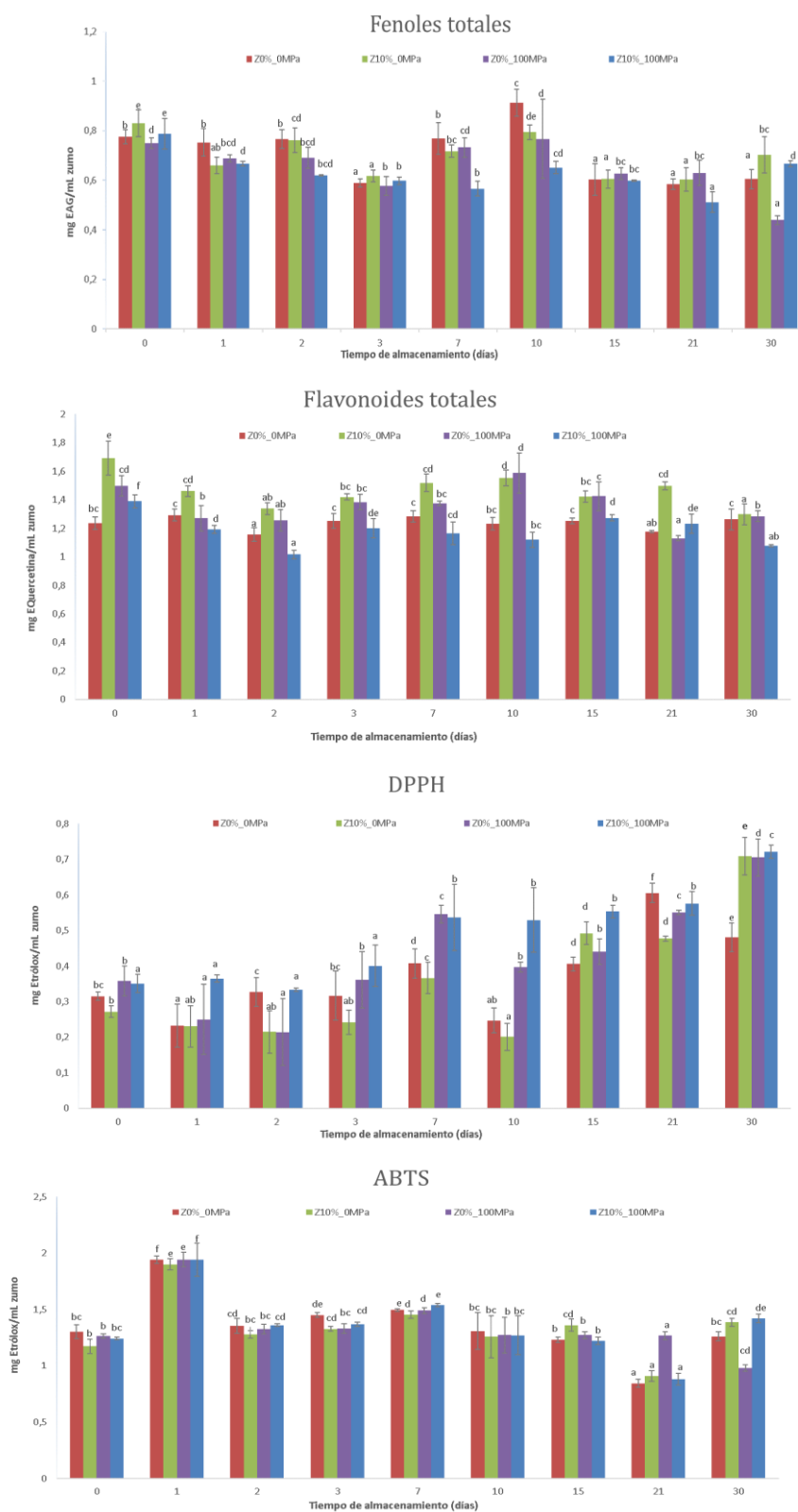
$$\Delta V = \text{Log UFC}_{t=30} - \text{Log UFC}_{t=0} \quad (1)$$

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, con un nivel de confianza del 95%, que el zumo no homogeneizado y sin trehalosa (Z0%\_0MPa) fue el que experimentó una mayor pérdida de viabilidad en la población microbiana ( $5,4 \pm 0,5$  ciclos logarítmicos) tras

30 días de almacenamiento en refrigeración. La simple adición de un 10% en peso de trehalosa a la formulación del zumo antes de su inoculación (Z10%\_0MPa) ya redujo ligeramente la pérdida de viabilidad a  $4,92 \pm 0,08$  ciclos logarítmicos, valor que no se vio afectado como consecuencia de la homogeneización del zumo fermentado antes de su almacenamiento (Z10%\_100MPa). Sin embargo, la aplicación de altas presiones de homogeneización sí logró disminuir significativamente la pérdida de viabilidad del probiótico durante el almacenamiento de los zumos que no incluían trehalosa en su formulación (Z0%\_100MPa), la cual tomó valores del orden de  $4,41 \pm 0,5$  ciclos logarítmicos. Resultados similares fueron obtenidos por Betoret et al. (2017), tras el almacenamiento de zumo de clementina rico en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* durante 10 días.

En la **figura 4** se muestra la evolución de las propiedades antioxidantes analizadas durante todo el almacenamiento. Como se puede observar, el contenido en fenoles y flavonoides totales experimentó ligeras fluctuaciones entorno a un valor más o menos constante (0,6 mg EAG/mL de zumo para el caso de los fenoles totales y 1,3 mg EQ/mL de zumo para los flavonoides totales). En general, los zumos que incorporaban trehalosa en su composición fueron los que experimentaron una menor pérdida de fenoles totales, lo que pone de manifiesto el efecto protector que ejerce el disacárido sobre estas estructuras químicas. Respecto al contenido en flavonoides totales, las diferencias observadas entre los zumos recién fermentados ( $t = 0$ ) se mantuvieron constantes durante todo el almacenamiento, siendo el zumo que contenía trehalosa y que se homogeneizó tras la fermentación (Z10%\_100MPa) el que presentó un contenido en flavonoides totales significativamente más bajo al final de este. Se podría decir que la capacidad antioxidante total medida por el método ABTS es la que mejor refleja la evolución en el contenido en compuestos fenólicos ya que, salvo tras 1 día de almacenamiento, los valores obtenidos se mantuvieron bastante estables durante los primeros 15 días de almacenamiento. Sin embargo, la actividad antirradical medida por el método DPPH aumentó progresivamente durante todo el almacenamiento. Este incremento podría ser consecuencia de la actividad fermentativa del probiótico que, aunque más lentamente, continúa en condiciones de refrigeración dando lugar a compuestos de carácter más hidrofóbico y con una mayor capacidad para secuestrar radicales libres. En un estudio similar, Hashemi et al. (2017) observaron que durante la fermentación ácido-láctica de zumo de limón se formaban metabolitos que aumentaban la capacidad antioxidante medida por el método DPPH.





**FIGURA 4.** Evolución de las propiedades antioxidantes de los zumos fermentados con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C.

Por lo expuesto anteriormente para la viabilidad del probiótico, el zumo de clementina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* no debería almacenarse a 4 °C durante más de 15 días porque perdería su condición de bebida probiótica. A continuación, en la **tabla 3** se muestra la variación que experimentan los principales antioxidantes presentes en el zumo al final de su vida útil ( $\Delta M^i$ ), calculada según la ecuación 2:

$$\Delta M^i = \frac{x_0^i - x_{15}^i}{x_0^i} \cdot 100 \quad (2)$$

donde:  $x_0^i$  es la concentración del antioxidante *i* en el zumo al inicio del almacenamiento;  $x_{15}^i$  es la concentración del antioxidante *i* en el zumo tras 15 de almacenamiento a 4 °C; *i* representa tanto a los fenoles totales como a los flavonoides totales o a la actividad antioxidante total medida por los métodos DPPH y ABTS.

**TABLA 3.** Variación en el contenido en antioxidantes de los zumos de clementina probióticos sometidos a diferentes tratamientos tras 15 días de almacenamiento a 4 °C.

zumos	FENOLES TOTALES	FLAVONOIDES TOTALES	DPPH	ABTS
Z0%_0MPa	-24,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	-4,9 ± 0,6 <sup>d</sup>	28,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	-5,4 ± 1,8 <sup>a</sup>
Z0%_100MPa	-42 ± 2 <sup>a</sup>	-24,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	23,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,5 ± 1,7 <sup>b</sup>
Z10%_0MPa	-15,3 ± 0,8 <sup>c</sup>	-11,4 ± 1,6 <sup>b</sup>	87,9 ± 0,4 <sup>c</sup>	13,3 ± 0,7 <sup>c</sup>
Z10%_100MPa	-15,2 ± 1,6 <sup>c</sup>	-8,5 ± 0,8 <sup>c</sup>	58 ± 5 <sup>b</sup>	-3 ± 2 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c,...</sup> letras diferentes para una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Como se puede comprobar, todas las propiedades antioxidantes analizadas experimentaron un notable descenso durante el almacenamiento en refrigeración, salvo la actividad antioxidante, en especial la medida por el método DPPH, que mejoró notablemente. En términos generales, la degradación de fenoles y flavonoides totales se vio favorecida por la homogeneización a 100 MPa del zumo tras 24 h de fermentación. Esto puede atribuirse a la reducción del tamaño de partícula que resulta de la homogeneización, de manera que los compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides, quedan más expuestos a las condiciones responsables de su deterioro. Asimismo, estos compuestos están más disponibles para ser consumidos por el probiótico a fin de que continúe con la fermentación. Othman et al. (2009) atribuyeron la pérdida de compuestos fenólicos en olivas del cultivar chetoui a la actividad fermentativa del microorganismo *Lactobacillus plantarum*. Hay que destacar también que la adición de un 10% de trehalosa a la formulación del zumo redujo notablemente el efecto negativo de la homogeneización sobre el contenido en flavonoides totales, pero apenas afectó al contenido en fenoles totales. Respecto a los zumos no homogeneizados, la adición de trehalosa redujo significativamente la degradación de fenoles totales, pero incrementó la de flavonoides totales.

En cuanto a la capacidad antioxidante total, tanto la adición de trehalosa como la homogeneización y la combinación de ambos factores dieron como resultado una menor pérdida (medida por el método del radical ABTS) o un mayor incremento (según medida por el método del radical DPPH). Esta mejora en la actividad antirradical observada tras 15 días de almacenamiento fue significativamente más evidente en los zumos no homogeneizados que incluían un 10% en peso de trehalosa en su formulación. Esto podría ser consecuencia del efecto protector antes comentado que ejerce el disacárido sobre los compuestos fenólicos, con los que interacciona formando una capa protectora. Por su parte, la homogeneización a 100 MPa aplicada sobre el zumo tras 24 h de incubación con el probiótico incrementó significativamente la capacidad antioxidante medida por el método ABTS, pero apenas afectó la misma medida por el método DPPH. Finalmente hay que comentar que la homogeneización del zumo que incluía trehalosa en su composición disminuyó el efecto beneficioso atribuido a este disacárido sobre la capacidad antioxidante total de los zumos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el zumo de clementina comercial es un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo probiótico, además de aumentar su habilidad para adherirse a las proteínas de la mucosa intestinal, sin que la adición de trehalosa ni la homogeneización a 100 MPa ni la combinación de ambos factores ejerzan efecto alguno sobre esta propiedad. Por otra parte, se establece que el almacenamiento del zumo fermentado en nevera a 4 °C no debería durar más de 15 días para mantener la condición de bebida probiótica. En términos generales, la homogeneización del zumo a 100 MPa tras 24 h de incubación con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) resulta ser la mejor opción para reducir la pérdida de viabilidad del mismo durante el almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, la homogeneización acelera la degradación de los compuestos fenólicos y enmascara el efecto protector que ejerce la trehalosa sobre los mismos. Haría falta completar este estudio con pruebas de evaluación sensorial que permitan saber el grado de aceptación del producto final por parte del consumidor en función de las variables de proceso.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras por guiarme en todo momento y haber hecho posible la realización de este trabajo, el cual se ha desarrollado gracias a la beca de colaboración concedida para llevar a cabo la investigación en el contexto del proyecto GV/2015/066: MEJORA DE LA CALIDAD FUNCIONAL DE UN SNACK CON EFECTO PROBIÓTICO Y ANTIOXIDANTE MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE TREHALOSA Y LA APLICACIÓN DE ALTAS PRESIONES DE HOMOGENIZACIÓN. También quiero agradecer a Mari Carmen Collado, investigadora del IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos), perteneciente al departamento de biotecnología de alimentos, y a su colega

José Gimeno también investigador del mismo centro, quienes han hecho posible una parte de estudio ayudándonos con sus conocimientos y experiencia.

Agradezco a mis padres y a Antoine, por el apoyo incondicional que me han mostrado siempre y por hacer posible la culminación de una meta más.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arnao, M.B.; Cano, A. & Acosta, M. (1997). La actividad antioxidante total en zumos de cítricos como factor de calidad del producto. *Agrícola Vergel*, 192: 654-658.
- Arnao, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 419-421.
- Barrera, C., Betoret, E., Betoret, N., Burca, C., Garcia-Hernández, J. & Hernández, M. (2019). Improving antioxidant properties and probiotic effect of clementine juice inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063) by trehalose addition and/or sublethal homogenisation. *International Journal of Food Science and Tchnology*, 54: 2109-2122
- Betoret, E., Calabuig-Jiménez, L., Patrignani, F., Lanciotti, R. & Dalla Rosa, M. (2017). Effect of high-pressure processing and trehalose addition on functional properties of Mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. *LWT-Food Science and Technology*, 85: 418-422.
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N. & Fito, P. (2012). Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering*, 111: 28-33.
- Brand-Williams., W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Burns, P., Patrignani, F., Tabanelli, G., Vinderola, G., Siroli, L., Reinheimer, J., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2015). Potential of high-pressure homogenization on probiotic Caciotta cheese quality and functionality. *Journal of Functional Foods* 13: 126-136.
- Burns, P., Reinheimer, J. & Vinderola, G. (2011). Impact of bile salt adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 on its interaction capacity with the gut. *Research in Microbiology* 162: 782-790.
- Celebioglu, H.U., Olesen, S.V., Prehn, K., Lahtinen, S.J., Brix, S., Abou Hachem, M. & Svensson, B. (2017). Mucin- and carbohydrate-stimulated adhesion and subproteome changes of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Journal of Proteomics* 163: 102-110.
- Colaço, C.A.L.S. & Roser, B. (1994). Trehalose, a multifunctional additive for food preservation in: *Food Packaging and Preservation*. Ed. M. Mathlouthi. Boston, 123 - 140.
- Collado, M.C., Gueimonde, M. & Salminen, S. (2010). Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action, in: *Bioactive Foods in Promoting Health*. Elsevier, pp. 353-370.
- Crowe, J., Crowe, L. & Champan, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science* 223: 209 - 217.
- Elbein, A.D. (1974). The metabolism of  $\alpha$ -trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 30: 227-256.
- FAO/WHO (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Report 2002.
- FAO/OMS (2006). *Próbioticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*. Estudio FAO alimentación y nutrición n°85.
- FDA (2018). GRAS Notices. Consultado el 2 de enero de 2019. [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN\\_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=bifidobacterium](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=bifidobacterium)
- Guacho, M.B. (2018). *Fermentación de zumo de clementina con Lactobacillus salivarius spp. salivarius (CECT 4063): Efecto de la trehalosa y la homogeneización sobre el contenido en compuestos antioxidantes*. Trabajo Final de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.

- Gómez, H., & Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Revista Biosalud*, 14
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., & Faria, J.A.F. (2010). Functional foods and non-dairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 292 - 302.
- Hashemi, S.M.B., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F.J., Nemat, Z., Sohrabi-Shokofte, S. & Alizadeh, F. (2017). Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Functional Foods*, 38: 409-414.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure Application Chemistry*, 74 (7): 1263-1269.
- IDF/FIL (International Dairy Federation, 1992). Physiological and Functional Properties of Probiotics. Bulletin of the International Federation, 272: 17-22.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganismos de los Alimentos. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios. *Editorial Acribia*, Zaragoza. Vol. 6. 2000.
- Karimi, R., Mortazavian, A.M., & Cruz, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. *Dairy Science & Technology*, 91: 283-308.
- Luximon-Rama, A., Baharun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T., & Aruoma, O.I. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and. *Food Research International*, 38: 357-367.
- Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Vanzela, E.S.L., Stringheta, P.C., de Oliveira Pinto, C.L & Martins, J.M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51: 764-770.
- Medina, L.A. (2010). *Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos*. Rev. Electrónica Autodidacta ISSN:1989-9041 consultado el 1 de septiembre de 2019. [https://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas\\_para\\_la\\_determinaci%C3%B3n\\_de\\_compuestos\\_antioxidante\\_en\\_alimentos.\\_Laura\\_Agudo\\_Medina\\_ISSN\\_1989-9041\\_Autodidacta](https://www.academia.edu/13924487/T%C3%A9cnicas_para_la_determinaci%C3%B3n_de_compuestos_antioxidante_en_alimentos._Laura_Agudo_Medina_ISSN_1989-9041_Autodidacta)
- Molyneux, P. (2004). The use of the setable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26(2): 211-219.
- Ohtake, S. & Wang, Y.J. (2011). Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (6): 2020-2053.
- Ortiz, A. (2015). *Efecto de la concentración de trehalosa y la presión de homogenización sobre las propiedades antioxidantes de zumo de mandarina comercial inoculado con Lactobacillus salivarius spp. salivarius*. Trabajo final de Máster, Universidad Politécnica de Valencia.
- Othman, N.B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., & Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116(3): 662-669.
- Peres, C. M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., & Malcata, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria— With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26: 31 - 42.
- Picard, C. (2015). *Efecto de la trehalosa y de las altas presiones de homogenización sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de mandarina*. Trabajo fin de grado, Universidad Politécnica 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.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144 - 158.
- Tabanelli, G., Patrignani, F., Vinderola, G., Reinheimer, J.A., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2013). Effect of sub-lethal high-pressure homogenization treatments on the in vitro functional and



- biological properties of lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology* 53 (2): 580-586.
- Tabanelli, G., Burns, P., Patrignani, F., Gardini, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J. & Vinderola, G. (2012). Effect of a non-lethal High-Pressure Homogenization treatment on the in vivo response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology*. 32: 302-307.
- Tortora, G., Funke, B. & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. EE. UU: Medica Panamericana.
- Tripathi, M.K. & Giri, S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9: 225-241.
- Vasudha, S. & Mishra, H.N. (2013). Non-dairy probiotic beverages, *International Food Research Journal* 20(1): 7-15.
- Yadav, A.K., Tyagi, A., Kaushik, J.K., Saklani, A.C., Grover, S. & Batish, V.K., (2013). Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. *Microbiological Research* 168: 639–645.