



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *Viabilidad del residuo de la bebida vegetal de almendra para el crecimiento de bacterias con efecto probiótico. Efecto de las HPH*

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

ALUMNO/A:  
Andrea Fernanda Reyes Picaita

TUTOR/A ACADEMICO:  
Dra. Noelia Betoret Valls

COTUTOR/A :  
Dra. Ester Betoret Valls

DIRECTOR EXPERIMENTAL:  
Stevens Duarte Serna

*Curso Académico: 2020 - 2021*

**VALENCIA, 25 de Noviembre de 2020**

# VIABILIDAD DEL RESIDUO DE LA BEBIDA VEGETAL DE ALMENDRA PARA EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS CON EFECTO PROBIÓTICO. EFECTO DE LAS HPH

Andrea Fernanda Reyes Picaita<sup>1</sup>, Stevens Duarte Serna<sup>1</sup>, Ester Betoret Valls<sup>2</sup>, Noelia Betoret Valls<sup>1</sup>.

## RESUMEN

El bagazo de almendra es un subproducto generado en la elaboración de la bebida vegetal de almendra y que actualmente se destina, principalmente, a la alimentación animal. No obstante, este subproducto conserva una cantidad considerable de nutrientes que lo convierten en una materia prima de interés para la revalorización.

En este proyecto se ha estudiado la viabilidad de utilizar el bagazo como medio de cultivo para el crecimiento del probiótico, *Lactobacillus salivarius spp salivarius* (CECT4063). Se ha evaluado el efecto de la matriz de incubación y de las altas presiones de homogeneización (HPH), como método de encapsulación, sobre el crecimiento del probiótico, su hidrofobicidad y su resistencia a condiciones adversas de procesado, como el secado por aire caliente (SAC) y al proceso de digestión *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que el bagazo de almendra conserva macronutrientes de interés, siendo apto para utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de probióticos. En cuanto a la viabilidad del probiótico y la supervivencia a la digestión *in vitro*, el probiótico es capaz de crecer en el bagazo en todas las condiciones de estudio planteadas y además es capaz de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales a las que fue sometido. De entre los tres ensayos testados, el ensayo en el que el probiótico fue encapsulado fue el que dio mejores resultados en ambos casos. Puede concluirse que la encapsulación por HPH favorece la resistencia del microorganismo a condiciones adversas como el SAC y la digestión gastrointestinal.

**PALABRAS CLAVE:** bagazo de almendra, probiótico, digestión *in vitro*, *L. salivarius spp salivarius*, encapsulación, altas presiones de homogenización.

## RESUM

El bagàs d'ametla és un subproducte generat en l'elaboració de la beguda vegetal d'ametla i que actualment es destina, principalment, a l'alimentació animal. No obstant això, aquest subproducte conserva una quantitat

---

<sup>1</sup> Universidad Politécnica de Valencia, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Departamento Tecnología de Alimentos, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

<sup>2</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) Calle catedrático Agustín Escardino, 46980, Paterna, España.

considerable de nutrients que el converteixen en una matèria primera d'interès per a la revaloració.

En aquest projecte s'ha estudiat la viabilitat d'utilitzar el bagàs com a mitjà de cultiu per al creixement del probiòtic, *Lactobacillus salivarius spp salivarius* (CECT4063). S'ha avaluat l'efecte de la matriu d'incubació i de les altes pressions d'homogeneïtzació (HPH), com a mètode d'encapsulació, sobre el creixement del probiòtic, seua hidrofobicitat i la seua resistència a condicions adverses de processament, com l'assecat per aire calent (SAC) i al procés de digestió *in vitro*.

Els resultats obtinguts mostren que el bagàs d'ametla conserva macronutrients d'interès, sent apte per a utilitzar-se com a medi de cultiu per al creixement de probiòtics. Quant a la viabilitat del probiòtic i la supervivència a la digestió *in vitro*, el probiòtic és capaç de créixer en el bagàs en totes les condicions d'estudi plantejades i a més és capaç de sobreviure a les condicions gastrointestinals a les quals va ser sotmés. D'entre els tres assajos testats, l'assaig en el qual el probiòtic va ser encapsulat va ser el que va donar millors resultats en tots dos casos. Pot concloure's que l'encapsulació per HPH afavoreix la resistència del microorganisme a condicions adverses com el SAC i la digestió gastrointestinal.

PARAULES CLAU: bagàs d'ametla, probiòtic, digestió *in vitro*, *L. salivarius spp salivarius* encapsulació, altes pressions d'homogeneïtzació

## ABSTRACT

The almond bagasse is a by-product generated in the production of the vegetable almond drink and which is currently used mainly for animal feed. However, this by-product retains a considerable amount of nutrients that make it a raw material of interest for revaluation.

In this project, the feasibility of using bagasse as a culture medium for the growth of probiotic *Lactobacillus salivarius spp salivarius* strain (CECT4063), has been studied. The effect of the incubation matrix and the high homogenization pressures (HPH), as an encapsulation method, on the growth of the probiotic, its hydrophobicity and its resistance to adverse processing conditions, such as hot air drying (SAC) and the *in vitro* digestion process.

The results obtained show that the almond bagasse preserves macronutrients of interest, being suitable for use as a culture medium for the growth of probiotics. Regarding the viability of the probiotic and survival to *in vitro* digestion, the probiotic is able of growing in the bagasse in all the study conditions proposed and is also able of surviving the gastrointestinal conditions to which it was subjected. Among the three trials tested, the trial in which the probiotic was encapsulated was the one that gave the best results in both cases. It can be concluded that encapsulation by HPH favors the resistance of the microorganism to adverse conditions such as SAC and gastrointestinal digestion.

KEY WORDS: almond bagasse, probiotic, *in vitro* digestion, *L. salivarius spp salivarius*, encapsulation, high homogenization pressures.

## INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria es un sector en auge dentro del territorio español. Año tras año, ha conseguido aumentar su producción consolidándose como la principal actividad manufacturera del sector industrial. Según los últimos datos recogidos de Estadística Estructural de Empresas del INE, con 125841,8 M€ de cifra de negocios, representa el 22,8% del sector industrial (MAPAMA, 2019) convirtiéndolo así, en un sector estratégico de la economía.

Asociado al aumento de la producción y derivado de dicho proceso productivo, se generan una gran cantidad de residuos; sustancias orgánicas que, debido a las características del proceso o por los criterios de calidad de la industria transformadora, son desestimadas y no incluidas en la composición de los productos finales, suponiendo una pérdida considerable para el sector.

La Comisión Europea estima que cada año se desaprovecha un tercio de la producción mundial, de los que 89 millones de toneladas corresponden a la Unión Europea (FAO, 2012). En España, anualmente se desechan alrededor de 7,7 millones de toneladas de alimentos. Atendiendo a una distribución sectorial, en los hogares el desperdicio alcanza el 42% del total. En la fase de fabricación, estrechamente relacionada con el proceso productivo, se alcanza un 39%, seguido de la restauración y la distribución con un 14 y 5%, respectivamente (MAPAMA, 2017b).

En los próximos años, las acciones de política exterior de la Unión Europea (UE) buscarán la consecución de los objetivos para el Desarrollo Sostenible (ODS) planteados por la Organización de Naciones Unidas (ONU) en la Agenda 2030. En ella, hay dos objetivos estrechamente relacionados con la actividad productiva desarrollada por la industria alimentaria (IA). El tercer objetivo hace referencia a garantizar una vida sana y promover el bienestar de los ciudadanos independientemente de la edad. Ante este objetivo, el sector plantea la elaboración de productos para nuevos segmentos y nichos de consumidores específicos. En segundo lugar, el doceavo objetivo, relacionado con el consumo y la producción responsable, busca, en ambos casos, garantizar patrones sostenibles. En este caso la IA busca la gestión eficiente y responsable de la cadena de suministro, la gestión del desperdicio y la revalorización de subproductos, orientando el sector hacia la economía circular.

De esta manera, el desperdicio se ha convertido en uno de los retos centrales de la UE a abordar en los próximos años (Hernández San Juan, 2018). Actualmente, ya se dispone de algunas medidas validadas para hacer frente a dicho problema. Entre ellas, una de las más estudiadas por las empresas es la valorización y reciclaje. Dentro de este campo, se puede hablar del desarrollo de piensos y productos para alimentación animal, desarrollo de nuevos fertilizantes, el uso para la obtención de biogás y biometano y por último el desarrollo de nuevos productos alimentarios a partir de materiales excedentes, en general mediante la recuperación de compuestos de interés para un uso posterior como ingredientes o aditivos alimentarios en otras industrias, etc (Armengol Rosinés et al., 2020).

En la actualidad, hay un elevado número de estudios realizados a partir de diferentes residuos que corroboran que los excedentes generados del proceso productivo poseen una composición nutricional de interés y que presentan un amplio potencial de explotación (Carmona, 2013; Guillén, 2014; Joglar, 2016; Rojas Vergara, 2017; Andrés Mora, 2019). En la mayoría de los casos, se puede destacar la concentración de compuestos bioactivos de interés tales como antioxidantes y péptidos antimicrobianos, entre otros.

En los últimos años, las nuevas mentalidades de consumo, el incremento de ciertas patologías (alergias, intolerancias...) y la preocupación generalizada por un correcto mantenimiento de la salud han definido las tendencias a seguir en el desarrollo de nuevos alimentos. En este sentido, las bebidas de origen vegetal se han establecido como una alternativa a las bebidas lácteas. Las más comercializadas son: las bebidas de avena, arroz, soja, almendra y coco (Dávila de Campagnaro, 2017; Fuentes Cuiñas, 2019), siendo las cuatro primeras las más consumidas en el mercado español. El incremento en su consumo ha contribuido a que adquieran una mayor cuota de mercado. Los datos extraídos de MAPAMA apoyan esta tendencia, siendo el volumen (L) de consumo a nivel nacional en 2017 de 226104,33 y en 2019 de 228565,57 L. En España, las zonas con mayor consumo son el este y el noreste (MAPAMA, 2017a). Unido al consumo y, en consecuencia, a una mayor producción, se generan una gran cantidad de residuos, estimados en un 28 - 35% de extracto seco de la materia prima de partida, los cuales, generalmente, se destinan al consumo animal.

No obstante, los residuos generados en la elaboración de las bebidas aún conservan un perfil nutricional de interés, lo cual los convierte en materia de revalorización y aprovechamiento. Entre algunas empresas del sector ya ha surgido la iniciativa de convertir estos residuos en ingredientes alimentarios altamente funcionales utilizables en múltiples categorías, desde harinas, sopas y salsas hasta productos cárnicos. Un claro ejemplo de ello es la empresa estadounidense Renewal Mill especializada en la revalorización de residuos de bebidas vegetales, la cual ha creado una harina a base de los restos de pulpa de la bebida vegetal de avena (Revista Énfasis Alimentación, 2020).

Paralelamente, los estudios sobre microorganismos probióticos y su efecto en la salud han ganado relevancia. Se entiende por probiótico aquel microorganismo vivo que, administrado en cantidades adecuadas, confiere un beneficio a la salud del consumidor. Se pueden incorporar a la formulación de diferentes tipos de productos: alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Actualmente, los géneros más estudiados son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Guarner et al., 2011; Oliveira y González-Molero, 2016).

La especie *Lactobacillus salivarius spp salivarius*, tiene un gran interés como especie probiótica, puesto que cumple con los principales requisitos y propiedades de un probiótico eficaz (Neville y O'Toole 2010; Messaoudi et al. 2013). Entre estas propiedades cabe destacar la capacidad de sobrevivir a las condiciones presentes en el estómago y en el intestino delgado y a su vez ser capaz de adherirse y colonizar la mucosa intestinal (Dunne et al., 2001). La supervivencia de esta bacteria fue probada mediante ensayos *in vitro*, obteniéndose una alta tasa de supervivencia tras exponerla a las condiciones

que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal (GIT). Además, existen estudios que demuestran su eficacia en el tratamiento frente a *Helicobacter pylori* (Ryan et al. 2009), así como su contribución a la mejora de la microbiota intestinal y parámetros de la respuesta inmune en adultos (Sierra et al., 2010).

En este contexto surge la presente investigación, cuyo objetivo es el estudio de la viabilidad del crecimiento del probiótico *Lactobacillus salivarius* spp *salivarius* en el residuo del proceso de obtención de la bebida vegetal de almendra, en diferentes condiciones. Se evaluará el efecto de la matriz de incubación y las altas presiones de homogeneización (HPH) como método de encapsulación, sobre el crecimiento del probiótico, su hidrofobicidad y su resistencia a condiciones adversas de procesado como el secado por aire caliente (SAC) y al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materia prima**

Como materia prima se utilizó residuo del proceso de obtención de la bebida vegetal de almendra suministrado por la empresa Liquats Vegetals S.A., Barcelona (España).

La materia prima se conservó congelada a -11°C hasta su uso.

### **Cultivo bacteriano**

Se empleó el microorganismo *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 obtenido de la colección española de cultivo (CECT, Valencia, España).

Las cepas liofilizadas se reconstituyeron siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir del reconstituido se prepararon una batería de viales que se conservaron a -20°C para trabajar *a posteriori*.

### **Determinaciones analíticas**

Todas las determinaciones se realizaron, al menos, por triplicado.

Actividad de agua. Se determinó en las muestras de bagazo húmedo con un higrómetro de punto de rocío Aqualab® CX-2 (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) con una precisión de  $\pm 0,003$  a una temperatura de 25°C.

pH. Se valoró con un pH-metro digital S20 SevenEasy™ (Mettler Toledo Inlab), previamente calibrado con las pertinentes disoluciones tampón a pH 7 y 4.

Humedad. Se determinó por el método oficial AOAC 950.46 (1997). Se trata de un método gravimétrico indirecto a través del cual se cuantifica la pérdida de peso que experimenta la muestra. Se utilizó una estufa a vacío (Vaciotem, J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España) a 60°C (presión < 133 mbar) hasta alcanzar peso constante.

Sólidos soluble totales. Los sólidos solubles totales (SST) se calcularon mediante la determinación de los °Brix empleando un refractómetro (ABBE ATAGO, NAR T3, Japón) a una temperatura de 20°C.

Contenido en grasa. La determinación del contenido en grasa del bagazo se realizó por extracción en Soxhlet con éter de petróleo según el método 991.36 de la AOAC (1997).

Se pesaron, aproximadamente, entre 4 – 5 g de muestra liofilizada que se introdujeron en un cartucho de extracción de celulosa Albet® 900 (Filalbet, Barcelona, España) de dimensiones 22 x 80 mm. Este cartucho se colocó en la cámara de extracción del equipo Soxhlet, y se adicionó el éter de petróleo.

El montaje constaba de un refrigerador compacto, minichiller 280 OLÉ (Huber, Offenburg, AG) y un extractor Soxtec™ 2055 (FOSS, Slangerupgade, Denmark), el cual estaba acoplado a una copa de extracción de aluminio, totalmente limpio, seco y previamente pesado, donde se recogió la grasa.

Terminado el proceso de extracción se introdujeron los recipientes metálicos en una estufa a  $103 \pm 2$  °C durante 30 min. Seguidamente se atemperaron en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesaron en una balanza analítica.

Color. El color del bagazo se determinó a partir del espectro de reflexión obtenido con un espectrofotómetro de color CM – 3600d (KONIKA MINOLTA, Osaka, Japón), tomando como referencia el iluminante D65 y el observador 10°.

Para su medida, las muestras se colocaron en cubetas de plástico de 25 mL de capacidad y 2 cm de espesor.

A partir de las coordenadas colorimétricas del sistema CIEL\*a\*b\* (1976), L\* (luminosidad), a\* (desviación hacia el rojo y el verde) y b\* (desviación hacia el amarillo y el azul) obtenidas, se determinaron las coordenadas psicométricas, también conocidas como atributos de color, tono ( $h^*_{ab}$ ) y croma ( $C^*_{ab}$ ).

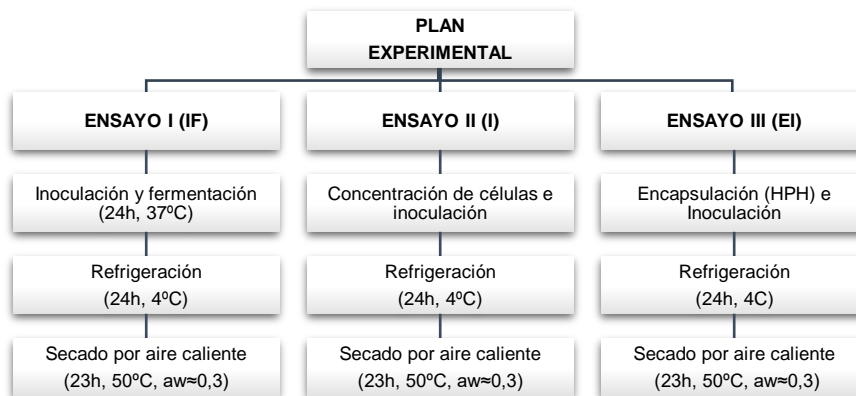
Tamaño de partícula. El tamaño de partícula del bagazo de almendra se determinó empleando el equipo Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK) equipado con fuente de luz azul, de 470 nm de longitud de onda y un rango de medida entre 0,02 – 200 micras.

Se diluyó una pequeña cantidad de muestra en agua desionizada en la celda del difractómetro a agitación moderada hasta una obscuración de 8-9%. El índice de refracción y del dispersante fue 1,5 y 1,33, respectivamente. Se tomó 0,01 como la absorbancia de las partículas de la nube.

La distribución de tamaño de partícula se caracterizó por los diámetros basados en el volumen (D [4,3]) y en el área (D [3,2]) y por los percentiles d(0.1), d(0.5) y d(0.9), los cuales representan los diámetros característicos por debajo de los cuales el 10%, 50% y 90% de las partículas se encuentran dentro de la distribución.

## Estudio de la viabilidad del probiótico. Plan experimental

Con la finalidad de evaluar la viabilidad del bagazo de almendra como medio de crecimiento de *L. salivarius spp. salivarius* se ejecutaron tres ensayos en diferentes condiciones (Figura 1). A continuación, se explican las particularidades de la primera etapa de cada ensayo.



**FIGURA 1.** Diagrama de flujo de los tres ensayos realizados para el estudio de viabilidad.

En el ENSAYO I (IF) se inoculó el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) caldo (Scharlab, Barcelona, Spain) con *L. salivarius spp. salivarius* y se incubó durante 24 h a 37°C. A continuación, se inoculó el bagazo de almendra en proporción 1:10 (v/p) y se incubó en estufa durante 24 h a 37 °C.

En el ENSAYO II (I) se inocularon 2 L de caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C en estufa. Pasadas las 24 h, se centrifugó todo el volumen durante 15 min, a 8000 rpm y 10 °C (Beckman Coulter Avanti™ J-25, California, United States). Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células del microorganismo en 100 mL de agua. Las proporciones entre el volumen de caldo, de agua de resuspensión y masa de bagazo se calcularon para conseguir en el bagazo, antes de la refrigeración, la misma concentración de células microbianas que en el ENSAYO I.

En el ENSAYO III (EI) al igual que en el ENSAYO II se inocularon 2 L de caldo MRS y tras la incubación, se separaron las células microbianas por centrifugación. A continuación, las células se suspendieron en 100 mL de agua y se sometieron al proceso de encapsulación.

En los tres ensayos se realizó el recuento de microorganismos viables después de cada una de las etapas, mediante la dilución decimal en agua de peptona tamponada (Scharlau Chemie, Barcelona, España) y siembra en superficie de placas Petri (ICMSF, 2000) con medio agar MRS (Scharlau Chemie, Barcelona, España). Se incubaron en aerobiosis a 37 °C durante 24 h en estufa.



## Encapsulación por HPH

Se siguió el método descrito por Ding y Shah (2009) con las adaptaciones realizadas por Calabuig-Jiménez et al. (2019).

Para la preparación de la emulsión de encapsulación, se mezclaron 25 mL de la suspensión del microorganismo, 100 mL de alginato de sodio (3%) (Sigma - Aldrich, Steinheim, Germany), 1 mL de Tween 80 (Scharlau, Sentmenat, Spain) y 200 mL de aceite comercial de girasol, manteniendo en todo momento la agitación. A continuación, la emulsión se homogeneizó a 70 MPa y en dos pasadas con un homogeneizador Panda Plus Niro Soavi, (Parma, Italy). Finalmente, se añadió cloruro cálcico 0,1 M (Sigma – Aldrich, Steinheim, Germany), la emulsión se mantuvo durante unas 10-12 h a 4°C y las células microbianas encapsuladas se separaron por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min a 10°C (Beckman Coulter Avanti™ J-25, California, United States).

Las células microbianas encapsuladas se añadieron al bagazo en una proporción 1:10 (p/p).

La eficiencia de encapsulación se calculó comparando el crecimiento del microorganismo antes y después de romper las cápsulas formadas y refiriéndolo al crecimiento antes de la encapsulación (ecuación 1).

La rotura de las cápsulas se realizó manteniéndolas en tampón fosfato a pH 7,4 durante 30 min en agitación.

$$E(\%) = \frac{\text{viabilidad}_{\text{cápsulas rotas}} - \text{viabilidad}_{\text{encapsulado}}}{\text{viabilidad}_{\text{sin encapsular}}} \quad (1)$$

## Secado por aire caliente

El secado por aire caliente (SAC) se realizó en una estufa CLW 750 (Heratec, Wodzislaw, Polska) con aire a 50°C hasta alcanzar una actividad de agua igual o inferior a 0,3.

## Digestión *in vitro*

Se determinó la viabilidad del microorganismo tras las fases oral, gástrica e intestinal de la digestión *in vitro* de los bagazos obtenidos en los tres ensayos antes y después de la etapa de SAC.

Para llevar a cabo la simulación de las diferentes etapas que componen el proceso digestivo se siguió la metodología propuesta por Minekus et al. (2014).

A partir de los volúmenes especificados en la tabla 1 para cada solución salina, se formularon las disoluciones madre de los fluidos de digestión simulados: fase oral, gástrica e intestinal. El ajuste del pH se realizó con NaOH 1M y HCl 6M.

**TABLA 1.** Concentración de las diferentes sales en las disoluciones madre de las fases simuladas: oral (SSF), gástrica (SGF) e intestinal (SIF). En la tabla también se presentan los volúmenes (mL) de cada una de las sales que se deben incorporar para obtener 500 mL de las disoluciones SSF, SGF y SIF (Minekus et al., 2014)

Sal	g/L	SSF (pH 7)	SGF (pH 3)	SIF (pH 7)
KCl	37,3	15,1	13,8	13,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	3,7	1,8	1,6
NaHCO <sub>3</sub>	84	6,8	25	85
NaCl	117	-	23,6	19,2
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,5	0,8	2,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,06	1	-
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> *	44	0,025	0,005	0,04

\*No se agrega el CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> a los fluidos simulados debido a que puede precipitar. Se agrega a la mezcla final de fluido de digestión simulado y alimento.

La preparación de las fases simuladas se realizó añadiendo a las disoluciones madre correspondientes las enzimas específicas para cada fase: amilasa para SSF, pepsina para SGF y pancreatina y bilis para SIF con la correspondiente actividad enzimática.

En las etapas de la digestión, la fase simulada correspondiente y el alimento o bolo alimenticio parcialmente digerido se mezclaron en proporción 1:1 (p/v). Además, previamente a la mezcla, las muestras secadas por aire caliente que habían quedado compactas se trituraron.

En relación con los tiempos de cada una de las etapas de digestión: la etapa oral se prolongó 2 min a pH 7. La etapa gástrica se mantuvo durante 2 h a 37 °C en agitación constante. Cabe recalcar que se comprobó el pH transcurrida 1h, y se ajustó con NaOH 1M o HCl 6M a un valor de 3. Por último, la etapa intestinal también se mantuvo 2h a 37 °C en agitación constante. Pasada la hora de incubación se comprobó el pH y se ajustó a 7.

### Estudio de la hidrofobicidad del probiótico

Se evaluó la hidrofobicidad del probiótico en las muestras de bagazo antes de la refrigeración y al final del proceso, mediante la medición de la afinidad por el solvente orgánico n-hexadecano, siguiendo la metodología propuesta por Vinderola y Reinheimer (2003) con las pertinentes adaptaciones.

Con la finalidad de recuperar las células bacterianas, las muestras se filtraron a la vez que se lavaban con agua. Tras el proceso de filtración, la suspensión de bacterias se centrifugó a 12000 rpm y 5°C durante 5 min. Posteriormente se sometieron a un doble lavado con tampón fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mM (pH 6,5) y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón.

Esta suspensión celular se ajustó a una absorbancia próxima a 1, a una longitud de onda de 560 nm. A continuación, se tomaron 3 mL con 0,6 mL de n-hexadecano (Scharlab, Barcelona, Spain) y se agitaron en el vórtex durante 120 s. Tras la separación de fases a 37°C se midió la absorbancia a 560 nm de la fase acuosa. La hidrofobicidad (H%) se calculó con la ecuación (2)

$$H(\%) = \left[ \frac{A_0 - A}{A_0} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

donde:  $A_0$  = absorbancia antes de añadir el n – hexadecano;  $A$  = absorbancia tras añadir el n – hexadecano.

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos mediante el software Statgraphics Centurión XVII (Statpoint Technologies, Virginia, US), utilizando análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Propiedades fisicoquímicas de la materia prima

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** recoge la composición y las principales propiedades fisicoquímicas del bagazo de almendra.

A partir de los datos obtenidos se puede observar que, tras el proceso de extracción de la bebida de almendra, aún quedan retenidos en el bagazo una parte considerable de macronutrientes. De hecho, si se comparan los valores obtenidos con los reportados por la bibliografía para almendras enteras (Yada et al., 2011; Yada et al., 2013; de Oliveira Gonçalves et al., 2020), el contenido en nutrientes se ha reducido entre un 55% y un 20%, siendo el contenido de grasa el que mayor pérdida experimenta y el de fibra el que menos.

La actividad de agua y la humedad presentan valores altos ya que la extracción para la obtención de la bebida de almendra se realiza directamente con agua. Estos valores indican que se trata de un producto altamente perecedero cuyo contenido en agua y macronutrientes lo hacen muy conveniente para el crecimiento microbiano.

El valor de pH se encuentra un poco por encima del rango de pH en el que el microorganismo considerado en este estudio es capaz de crecer, que está comprendido entre 2 y 7,4 (Rondón et al., 2008; León de la O et al., 2013). Sin embargo, cabe recalcar que el microorganismo es capaz de adaptarse con mayor facilidad a pH básicos que pH ácidos. De hecho a pH inferiores a 2 no es capaz de sobrevivir más de 60 min (Sanhueza et al., 2015).

**TABLA 2.** Propiedades fisicoquímicas del bagazo de almendra.

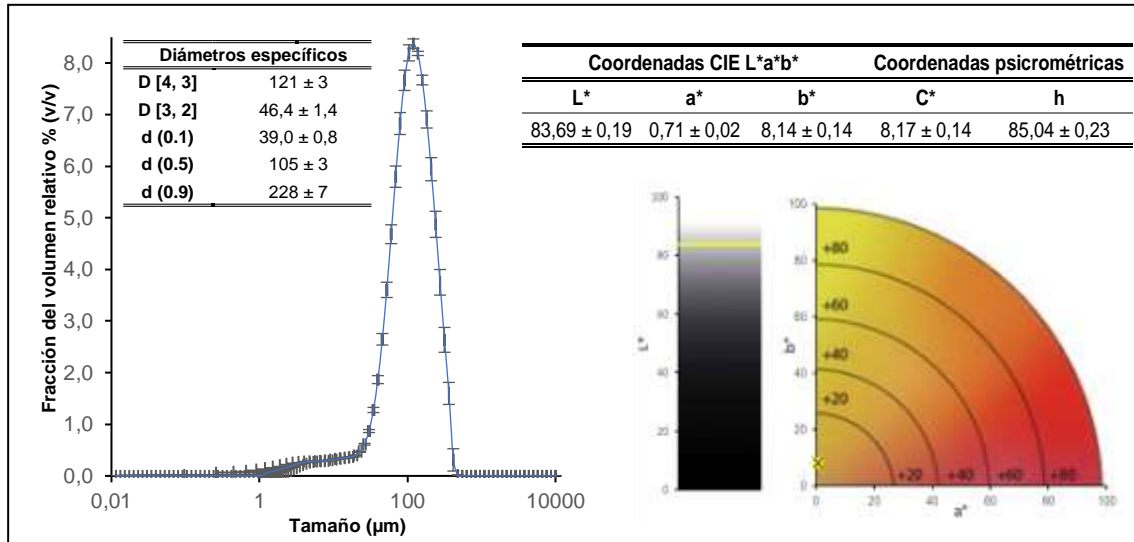
$a_w$	pH	$X_{ss}$ (g ss/g)	$X_w$ (g agua/g)	Grasa (%)	Proteína (%)*	Fibra (%)*
$0,996 \pm 0,001$	$7,62 \pm 0,04$	$0,002 \pm 0$	$0,8183 \pm 0,0022$	$25,0 \pm 0,2$	$9,9 \pm 1,0$	$5,8 \pm 0,5$

$a_w$ : actividad del agua;  $X_{ss}$ : fracción másica de sólidos solubles;  $X_w$ : fracción másica de agua.

\*El contenido de proteína como el de fibra se determinaron teóricamente mediante la aplicación de balances de masa y teniendo en cuenta datos bibliográficos de composición de la almendra y de las condiciones de extracción utilizadas.

En la gráfica de distribución de tamaño de partícula obtenida (Figura 2), se puede observar que este sigue una distribución monomodal con un único

pico que corresponde al tamaño de 120,23  $\mu\text{m}$  . Por otro lado, en función de los diámetros característicos se puede determinar que las partículas presentan un tamaño entre los 40 y 240  $\mu\text{m}$  de diámetro.



**FIGURA 2.** Distribución del tamaño de partículas del bagazo de almendra (izq.). Características ópticas del bagazo, coordenadas CIE L\*a\*b\* y coordenadas psicrométricas (dcha.).

D[4, 3]: diámetro específico medio basado en el volumen; D[3, 2]: diámetro específico medio basado en el área; d(0.1), d(0.5), d(0.9): valor del diámetro de partícula por debajo del cual se encuentran el 10%, el 50% y el 90% de las partículas de la distribución.

Respecto a las propiedades ópticas, se puede decir que la muestra presenta una luminosidad elevada con un valor próximo a 100, valor máximo que puede alcanzar dicho parámetro. En cuanto a las coordenadas a\* y b\* muestran un color de la muestra dirigido hacia los rojos y los amarillos, y un nivel bajo de saturación (C\*).

### **Efecto de las condiciones del medio sobre el crecimiento del microorganismo. Impacto del secado e influencia de la encapsulación**

En el estudio de la viabilidad del probiótico se evaluó la capacidad del microorganismo para utilizar el bagazo de almendra como medio de crecimiento. Tal y como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos, se evaluaron tres procedimientos diferentes de inoculación.

En el ensayo E1 se utilizó la encapsulación, una tecnología que actualmente se emplea para la envoltura de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas, permitiendo de esta manera controlar la interacción del material interior de la cápsula, con el medio circundante (Champagne y Fustier, 2007; Luján Jiménez, 2010). Esta técnica permite la protección de un amplio rango de compuestos bioactivos de interés, desde pequeñas moléculas y proteínas (enzimas, hormonas...) hasta células bacterianas (Thies, 2005).

Hay numerosas industrias que aplican este tipo de técnicas. En la industria alimentaria se emplean principalmente para disminuir la interacción de los

compuestos bioactivos con el medio evitando posibles degradaciones, para controlar la liberación del compuesto protegiéndolo y consiguiendo que llegue al órgano diana donde ejerce su efecto, como protección frente a tratamientos térmicos, para enmascarar sabores y para diluir el compuesto, por falta de solubilidad en el medio o debido a que debe ser incorporado en pequeñas cantidades (Shahidi y Han, 1993).

Para realizar la encapsulación de forma adecuada se deben tener en cuenta varios aspectos. La selección del material de recubrimiento es el paso más importante, para lo cual se precisa tener en cuenta qué se va a encapsular. En el caso de probióticos, un elevado número de sustancias han sido testadas como material encapsulante. Sin embargo, el uso de polisacáridos solubles en agua se ha incrementado debido a que los encapsulados resultantes presentan mejores características (Rodrigues et al. 2020). Estudios realizados por Avila-Reyes et al. (2014), Hadzieva et al. (2017) y Qi et al. (2020) muestran que la pectina, la goma arábiga y los alginatos son materiales encapsulantes adecuados para bacterias del género *Lactobacillus*. Específicamente, para la especie *L. salivarius spp salivarius*, Betoret et al. (2019) muestran en su estudio que el alginato de sodio es un buen encapsulante debido a la eficiencia de encapsulación así como al incremento en la viabilidad del microorganismo conseguida con el mismo, razón por la cual se eligió como encapsulante en el presente estudio.

Respecto al método de encapsulación se elige de acuerdo con la aplicación requerida, el tamaño de cápsula deseado, el material a encapsular, el costo y las propiedades físicas y químicas del recubrimiento (Pérez-Leonard et al., 2013). Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la extrusión y el secado por aspersión (Vinceković et al., 2017; Mota et al., 2018). En este caso y con la finalidad de evitar calentamientos excesivos, pero permitir la producción en continuo en la posible aplicación industrial, se seleccionó la homogenización por altas presiones (HPH).

En la tabla 3 se presentan los valores de crecimiento del probiótico en el bagazo en las tres condiciones evaluadas, y la variación provocada por la operación de secado respecto a BF<sub>1</sub> y BF<sub>2</sub>.

**TABLA 3.** Viabilidad del microorganismo (log UFC/g) en las distintas etapas del proceso.

	MRS	BF <sub>1</sub>	BF <sub>2</sub>	BS	$\left(\frac{BS-BF_1}{BF_1}\right)$	$\left(\frac{BS-BF_2}{BF_2}\right)$
<b>F</b>	9,1 ± 0,3 <sup>e</sup>	8,9 ± 0,2 <sup>d</sup>	8,7 ± 0,3 <sup>d</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>	-0,12	-0,10
<b>I</b>	9,2 ± 0,2 <sup>e</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,6 ± 0,3 <sup>ab</sup>	-0,07	-0,08
<b>EI</b>	9,1 ± 0,3 <sup>e</sup>	8,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>	7,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	-0,03	-0,01

**F:** procedimiento experimental con fermentación

**I:** procedimiento experimental con separación de células e incorporación

**EI:** procedimiento experimental con separación de células, encapsulación con HPH e incorporación

**BF:** bagazo fresco

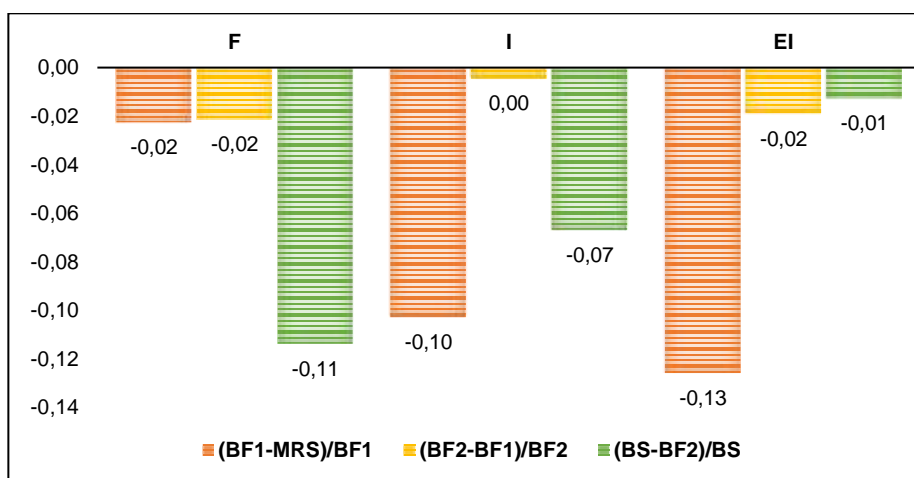
**BS:** bagazo seco

1: antes de refrigerar

2: tras 24 h en refrigeración

abc...Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p – valor < 0,05).

En la figura 3 se puede observar la pérdida de viabilidad asociada a cada una de las etapas del proceso respecto a la fase anterior.



**FIGURA 3.** Pérdida de viabilidad de microorganismo tras cada etapa del proceso. BF<sub>1</sub> respecto a MRS, BF<sub>2</sub> respecto a BF<sub>1</sub> y BS respecto a BF<sub>2</sub>.

Analizando los datos de la tabla y la figura conjuntamente, se puede apreciar como en los tres casos se parte de una concentración en el medio de cultivo MRS de referencia, similar. Sin embargo, al realizar la inoculación de la materia prima BF<sub>1</sub> se observa un descenso en la concentración siendo más notorio en el ensayo EI y mínima en el ensayo F. Este hecho pone de manifiesto la idoneidad del bagazo como medio para el crecimiento de la bacteria considerada. A pesar de la desviación del pH respecto al pH óptimo, el contenido en agua y la riqueza en nutrientes hacen posible la fermentación, alcanzándose después de 24 h de incubación, un contenido en *Lactobacillus* muy similar al alcanzado en el medio MRS de referencia.

El mayor descenso observado en los otros dos ensayos se puede atribuir al procedimiento experimental.

BF<sub>2</sub> muestra el contenido en microorganismos tras la refrigeración a 4°C durante 24 h del bagazo BF<sub>1</sub>. En esta etapa no se observaron diferencias significativas para ninguna de las condiciones ensayadas respecto a la fase anterior; la temperatura es un parámetro crítico para el crecimiento de microorganismos, los procesos de refrigeración a temperaturas de 4 °C, generalmente provocan que el microorganismo entre en una fase de latencia con ausencia de replicación, estabilizándose su concentración (Bernal Castro et al., 2017).

Finalmente, el contenido en microorganismos en las muestras BS está condicionado por el efecto del SAC sobre la viabilidad de las células. Diversos son los estudios que indican que los procesos de secado por aire caliente en torno a los 40 – 60 °C afectan negativamente la viabilidad de microorganismos con efecto probiótico. Martín Lajara (2017) en su estudio con snacks de manzanas impregnados con *L. salivarius spp salivarius* indicaba como el secado por aire caliente no contribuye a una estabilización del microorganismo, al contrario, una temperatura de 40 °C provocó un descenso de 9 a 7 unidades logarítmicas en la concentración del probiótico.

Puede observarse que, tras someter las muestras al SAC a 50 °C, la concentración de microorganismo experimentó un descenso considerable respecto al tratamiento anterior (BF<sub>2</sub>), sobre todo en los ensayos F e I. Sin embargo, en el ensayo EI la pérdida de viabilidad fue mínima y posiblemente asociada a la baja eficiencia de encapsulación que se consiguió en el presente ensayo (entre el 55 y el 57%). No obstante, fue suficiente para poner de manifiesto que la operación de encapsulación protege las células de las altas temperaturas aplicadas en la operación de SAC. Este resultado concuerda con el obtenido por Betoret et al. (2019) en el que la encapsulación contribuyó a conservar la viabilidad del microorganismo durante el procesado y almacenamiento de un snack de manzana inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. Además, cabe destacar que la encapsulación por altas presiones de homogeneización (HPH) con rangos de presión comprendidos entre 60 y 100 MPa, puede incrementar la viabilidad de probióticos en ciertos productos (Siroli et al., 2020).

En términos generales podemos decir que, mientras que en BF<sub>1</sub> la fermentación contribuye a que se mantenga la viabilidad del microorganismo, en EI es el proceso de encapsulación el que permite disminuir la pérdida de viabilidad.

### **Efecto de las condiciones de crecimiento sobre la resistencia a la digestión gastro-intestinal y la hidrofobicidad del probiótico.**

La digestión es un proceso complejo mediante el cual los alimentos ingeridos, tras una transformación mecánica y enzimática, se descomponen en sustancias químicamente más pequeñas y sencillas, que el cuerpo puede utilizar para el crecimiento, mantenimiento celular y como combustible (Andrés y García, 2019).

La desintegración tiene lugar en la boca y el estómago, mientras que la digestión enzimática y la posterior absorción tienen lugar en el intestino delgado y grueso (Guerra et al., 2012).

El estudio del proceso digestivo presenta gran relevancia puesto que permite obtener información útil acerca de la digestibilidad de los alimentos, los cambios estructurales que experimentan, la liberación de nutrientes, la absorción de un alimento, el punto de liberación de materiales encapsulados, entre otros. Actualmente, existen tanto modelos *in vivo* como *in vitro*.

Los modelos *in vivo* requieren una gran cantidad de tiempo, una elevada dotación económica y presentan restricciones éticas, debido a la experimentación con seres vivos.

Por otro lado, los modelos *in vitro*, los más utilizados en los últimos años, son ensayos realizados en laboratorios, en un entorno y condiciones ambientales controladas, fuera del organismo vivo (Rivas Montoya, 2014). Su ejecución permite reproducir las condiciones fisiológicas bajo las que tiene lugar la digestión humana de un modo flexible y reproducible (Guerra et al., 2012). Pese a sus limitaciones, es capaz de aportar resultados precisos, en un corto periodo de tiempo y más económicamente (Coles et al., 2005).

La simulación gastrointestinal en este caso fue llevada a cabo en el producto tras la inoculación (BF) y tras el tratamiento de SAC (BS) para los

tres ensayos planteados. La determinación de la viabilidad del microorganismo fue determinada al inicio y al final de las fases gástrica (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) e intestinal (I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>). Con ello se pretendía conocer la variación en la viabilidad del microorganismo en función a las condiciones de inoculación, del tratamiento térmico experimentado y en función de las particularidades en cuanto a pH y enzimas empleadas en cada una de las fases de la digestión gastrointestinal.

Es preciso hacer especial hincapié en las diferencias observadas en las matrices de estudio. Por un lado BF, presentaba un carácter más soluble, diluyéndose con facilidad al incorporar los fluidos simulados y permitiendo muestrear de forma sencilla, mientras que BS presentaba una forma más compacta, la cual tras incorporar los fluidos simulados no se disolvía totalmente adoptando una consistencia pastosa lo cual dificultó el muestreo y contribuyó a que la muestra no fuese homogénea.

Los resultados obtenidos a partir de la digestión *in vitro*, observables en la tabla 4, indican que el microorganismo es capaz de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales experimentadas en todas las condiciones estudiadas. Sin embargo, como cabía esperar las concentraciones finales del microorganismo son diferentes en función de las condiciones de inoculación de cada uno de los ensayos.

**TABLA 4.** Viabilidad del microorganismo a lo largo del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* (log UFC/g).

		Inicial	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>
F	BF	8,9 ± 0,2 <sup>d</sup>	8,0 ± 0,1 <sup>bc</sup>	8,1 ± 0,3 <sup>bc</sup>	7,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	10,1 ± 0,2 <sup>d</sup>
	BS	7,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>	8,2 ± 0,6 <sup>c</sup>	8,4 ± 0,2 <sup>cd</sup>	8,0 ± 0,5 <sup>ab</sup>	8,2 ± 1,0 <sup>c</sup>
I	BF	8,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	8,6 ± 0,5 <sup>d</sup>	8,6 ± 0,4 <sup>d</sup>	8,1 ± 0,7 <sup>ab</sup>	10,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
	BS	7,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>	8,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
EI	BF	8,0 ± 0,6 <sup>bc</sup>	7,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,5 <sup>bc</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	10,7 ± 0,1 <sup>e</sup>
	BS	7,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,6 <sup>ab</sup>	8,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,4 <sup>c</sup>

BF: bagazo fresco

BS: bagazo seco

G: etapa gástrica

I: etapa intestinal

1: al principio (inmediatamente después del cambio de pH)

2: al final (tras 2 h de digestión)

<sup>abc...</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p – valor < 0,05).

Si se comparan los resultados iniciales, muestra de partida para las digestiones, se puede observar una diferencia de concentración en torno a media y una unidad logarítmica entre BF y BS debido al tratamiento térmico experimentado por la muestra, que como se comentaba en el anterior apartado afecta a la viabilidad del microorganismo disminuyéndola.

En cuanto a G<sub>1</sub> se puede observar como en casi todos los casos se produce una leve disminución en la concentración del microorganismo, lo cual recae principalmente en el descenso del pH, de 6,5 a 3 que experimenta el probiótico debido a la incorporación de HCl. La única excepción la presente el ensayo I-BF. Estos resultados concuerdan con la viabilidad reportada por



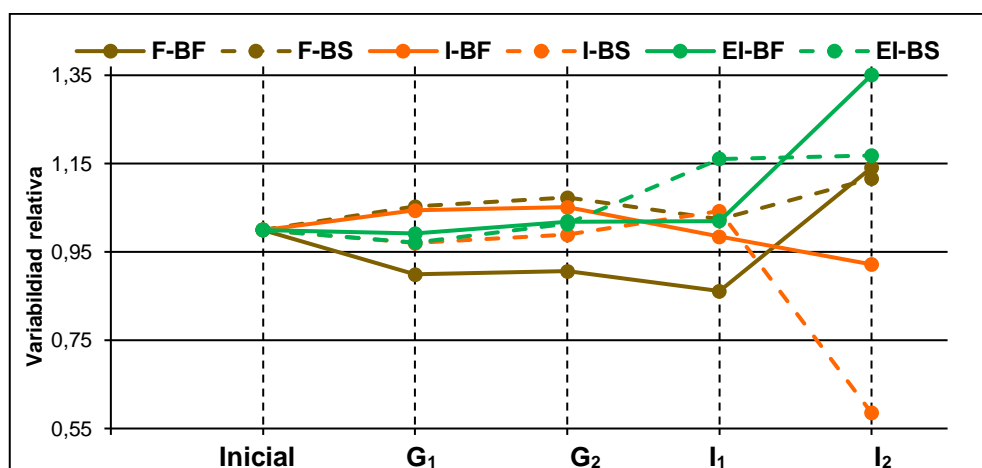
Mahmoudi et al. (2016) y Escobar-Ramírez et al. (2020) en su estudio acerca de otras especies de lactobacilos.

Al finalizar la fase gástrica ( $G_2$ ) tras las 2 h de incubación que han experimentado las muestras, la concentración del microorganismo vuelve a aumentar, con la excepción de I-BF que mantiene su concentración. En esta situación, tras el tiempo de incubación el microorganismo ha sido capaz de adaptarse al cambio de pH, que al estar dentro del rango de crecimiento de *L. salivarius spp salivarius*, no impide el crecimiento del mismo.

Respecto a  $I_1$ , el cambio de pH 3 a 7, al igual que en la fase  $G_1$  provoca una disminución en la concentración del microorganismo en casi todas las muestras. No obstante, en la muestra EI - BF se mantiene mientras que en las muestras I-BS y EI-BS, en lugar de disminuir la concentración aumenta. Con lo cual se puede deducir que el microorganismo se adapta mejor a pH cercanos a la basicidad.

Finalmente, al culminar la fase intestinal ( $I_2$ ) se puede ver como el ensayo I presenta un descenso en su concentración siendo más notorio en BS, que en BF. Por otro lado, tanto en el ensayo F como EI se ve un incremento en la concentración del microorganismo. Entre los dos ensayos, EI presenta valores de crecimiento más elevados que F, lo cual puede atribuirse al proceso de encapsulación por HPH que contribuye a la protección del probiótico de las condiciones adversas del medio circundante, en este caso las variaciones de pH experimentadas. Existen estudios, como el realizado por Betoret et al. (2019) que demuestra que este tipo de técnicas contribuyen al aumento de la viabilidad de las células microbianas.

La evolución de la viabilidad relativa (contenido en microorganismos después de la etapa considerada dividido por el contenido de microorganismos antes de iniciar la digestión) de las células microbianas tras las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal se puede observar en la figura 4. En ella se muestra que tanto el ensayo EI tanto en BF como en BS, es el que proporciona los valores más elevados de concentración de microorganismos al terminar el proceso digestivo, seguido por el ensayo F.



**FIGURA 4.** Evolución relativa del contenido en *Lactobacillus salivarius spp. salivarius* a lo largo del proceso de digestión gastrointestinal en las muestras frescas y secas de cada uno de los ensayos.

Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta el efecto protector, frente a las condiciones del tracto gastrointestinal, que la encapsulación ejerce sobre las células microbianas en el ensayo EI. En el ensayo F, la adaptación del microorganismo al medio sólido constituido por el bagazo y el crecimiento inicial en el mismo puede haber contribuido a una mayor resistencia de las células a las condiciones adversas asociadas al proceso digestivo. En el ensayo I en el que no se da ninguna de las circunstancias anteriores la resistencia es menor.

En microorganismos probióticos, la hidrofobicidad celular está estrechamente ligada con la capacidad de las diferentes cepas bacterianas de adherirse e interactuar con la mucosa intestinal, pudiendo así ejercer su efecto (Kos et al., 2003; Savedboworn et al., 2020). En general se acepta que es necesario que el microorganismo en cuestión presente una hidrofobicidad  $\geq$  al 40% para ser considerado como probiótico (Del Re et al., 2000).

Estudios realizados en el género *Lactobacillus* indican una hidrofobicidad comprendida entre 32 – 70% (Vinderola y Reinheimer, 2003; Sivamaruthi et al., 2020; Vijayalakshmi et al., 2020). Concretamente en el estudio realizado por Betoret et al. (2017) en el que se habla de la hidrofobicidad del probiótico *Lactobacillus salivarius spp salivarius* incubado en MRS caldo se obtuvieron valores del 66,9 %.

En cuanto a los resultados de hidrofobicidad obtenidos en el presente estudio (tabla 5), el valor obtenido para el microorganismo en caldo MRS no llega al valor mínimo necesario. Sin embargo, cabe recalcar que la metodología citada en dichos artículos es diferente a la empleada en la determinación, puesto que en lugar de utilizar xileno o tolueno se utilizó n-hexadecano. De igual manera la determinación de la densidad óptica se realizó a una longitud de onda diferente. No hay otros indicios que expliquen esta discrepancia de resultados.

**TABLA 5.** Hidrofobicidad de *Lactobacillus salivarius spp salivarius* en las diferentes condiciones ensayadas. Los valores son el resultado promedio de cuatro réplicas.

Condiciones	Hidrofobicidad(%)
MRS	23,29 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
F-BF	44,33 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
F-BS	45,617 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>
I-BS	42,01 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
EI-BS	45,144 $\pm$ 0,011 <sup>c</sup>

abc...Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ( $p - \text{valor} < 0,05$ ).

Los valores de hidrofobicidad del microorganismo incubado en bagazo sí que fueron superiores al 40% requerido para ser denominado como probiótico. Resultados superiores fueron obtenidos por Betoret et al. (2017) al cultivar el microorganismo y transferirlo al zumo de mandarina como medio de incubación.

El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los valores obtenidos. Esta variabilidad muestra, una mayor hidrofobicidad en el ensayo F y EI, frente a un valor más bajo en el ensayo I.

Generalmente, la variación en la hidrofobicidad está relacionada con el cambio en la estructura de las paredes bacterianas al someter al microorganismo a condiciones de estrés tales como variaciones de pH o altas temperaturas (en el tratamiento de SAC) entre otras (Remeta et al., 2002).

El hecho de que F y EI presenten valores más elevados puede asociarse a que en el ensayo F, el microorganismo experimenta un proceso de adaptación con los consiguientes cambios en su estructura y en el ensayo EI, el someter el microorganismo a estrés por las HPH ha contribuido a que se adapte mejor a condiciones hidrofóbicas, en ambos casos confiriendo al probiótico una mayor hidrofobicidad y en consecuencia una mejor adhesión al epitelio intestinal.

Estudios realizados por Tabanelli et al. (2012) y Betoret et al. (2017) han demostrado que el tratamiento a HPH a 50 MPa puede contribuir, en bacterias probióticas a mejorar ciertas propiedades funcionales tales como la hidrofobicidad, la agregación y la resistencia al estrés biológico, permitiendo de esta manera preservar la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento y convirtiendo a esta tecnología en una opción a tener en cuenta para microencapsular probióticos.

## CONCLUSIONES

Tras el pertinente análisis de resultados se puede concluir que los nutrientes de interés tales como proteínas, lípidos y fibra, que conserva el bagazo lo convierten en una materia prima de interés para estudios de revalorización, en este caso como medio de cultivo para probióticos.

Respecto a la viabilidad del probiótico, se ve influenciada por los diferentes tratamientos a los que se ha sometido el bagazo, siendo el más agresivo el SAC. Entre los tres ensayos testados, el ensayo EI es el que mejores resultados presenta poniendo de manifiesto que la encapsulación contribuye positivamente al mantenimiento en la viabilidad del microorganismo frente a las condiciones adversas del SAC.

Finalmente, los resultados de la digestión *in vitro* muestran que el microorganismo es capaz de sobrevivir a las variaciones del pH experimentadas en las diferentes fases de la digestión en los tres ensayos, siendo nuevamente el ensayo EI el que proporciona una mayor viabilidad del microorganismo al final del proceso digestivo. Sin embargo, respecto a la hidrofobicidad, no se puede concluir que el tratamiento por HPH para encapsular contribuya a un incremento significativo en la hidrofobicidad del microorganismo, puesto que la diferencia con respecto al ensayo F es mínima.

## REFERENCIAS

Andrés, A. 2019. «Desarrollo de un sistema de digestión *in vitro* para la determinación de la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de componentes bioactivos». Trabajo Fin de Grado, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

- Andrés Mora, C. 2019. «Valoración *in vitro* del efecto de polvos ricos en compuestos bioactivos procedentes de subproductos de frutas sobre la microbiota intestinal de adultos.» Trabajo Fin de Grado, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Armengol Rosinés, M. T.; Salamero Teixidó, I.; Plana Farran, M. 2020. «El desperdicio de alimentos como externalidad negativa: soluciones contenidas en la normativa francesa y propuestas para el caso español». *Revista Catalana de Derecho Ambiental* XI(1):1-47.
- Ávila-Reyes, S V.; García-Suárez F.J.; Jiménez, M. T.; San Martín-Gonzalez, M. F.; Bello-Perez, L. A. 2014. «Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability». *Carbohydrate Polymers* 102:423-30.
- Bernal Castro C. A.; Díaz-Moreno, C.; Gutiérrez-Cortés, C. 2017. «Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas». *Revista chilena de nutrición* 44(4):383-92.
- Betoret, E.; Betoret, N.; Calabuig-Jiménez, L.; Patrignani, F.; Barrera, C.; Lanciotti, R.; Dalla Rosa, M. 2019. «Probiotic survival and *in vitro* digestion of *L. salivarius* spp. *salivarius* encapsulated by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix». *LWT* 111:883-88.
- 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». *Food Science and Technology*. 85:418-22.
- Calabuig-Jiménez, L.; Betoret, E.; Betoret, N.; Patrignani, F.; Barrera, C.; Seguí, L.; Lanciotti, R.; Dalla Rosa, M. 2019. «High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion». *Journal of Food Engineering* 240:43-48.
- Carmona, I. 2013. «Utilización de los residuos de la industria del tomate para la obtención de compuestos bioactivos». *Agrimundo* 7:4.
- Champagne, C. P.; Fustier, P. 2007. «Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods». *Current Opinion in Biotechnology* 18(2):184-90.
- Coles, L. T.; Moughan, P. J.; Darragh, A.J. 2005. «*In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals». *Animal Feed Science and Technology* 123-124:421-44.
- Dávila de Campagnaro, E. 2017. «Bebidas vegetales y leches de otros mamíferos». *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría* 80(3):96-101.
- Del Re, B.; Sgorbati, B.; Miglioli, M.; Palenzona, D. 2000. «Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 Strains of *Bifidobacterium longum*». *Letters in Applied Microbiology* 31(6):438-42.
- Ding, W. K.; Shah, N. P. 2009. «Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein». *Journal of Food Science* 74(6):M231-36.
- Dunne, C.; O'Mahony, L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; O'Sullivan, G.C.; Shanahan, F.; Collins J. K. 2001. «*In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings». *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2 Suppl):386S-392S.
- Escobar-Ramírez, M. C.; Jaimez-Ordaz, J.; Escorza-Iglesias, V. A.; Rodríguez-Serrano, G. A.; Contreras-López, E.; Ramírez-Godínez, J.; Castañeda-Ovando, A.; Morales-Estrada, A. I.; Felix-Reyes, N.; González-Olivares, L. G. 2020. «*Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: an *in vitro* digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented mexican beverage». *Revista Argentina de Microbiología*.
- FAO. 2012. *Pérdidas y desperdicios de alimentos en el mundo. Alcance, causas y prevención. Congreso Internacional «Save Food»*. Roma, Italia.
- Fuentes Cuiñas, A. A. 2019. «Cambios en el consumo y percepciones en torno a la alimentación saludable de la leche tradicional y bebidas de origen vegetal». *RIVAR (Santiago)* 6(17):1-14.
- Guarner, F.; Khan, A. G.; Garish, J.; Eliakim, R.; Gangl, A.; Thomson, A.; Krabshuis, J.; Lemair, T. 2011. *Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y Prebióticos*. Organización Mundial de Gastroenterología.

- Guerra, A.; Etienne-Mesmin, L.; Livrelli, V.; Denis, S.; Blanquet-Diot, S.; Alric, M. 2012. «Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion». *Trends in Biotechnology* 30(11):591-600.
- Guillén, V. 2014. «Revalorización de estigmas de maíz negro *Millo Corvo*». Trabajo Fin de Máster, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Hadzieva, J.; Mladenovska, K.; Crcarevska, M. S.; Dodov, M. G.; Dimchevska, S.; Geškovski, N.; Grozdanov, A.; Popovski, E.; Petruševski, G.; Chachorovska, M.; Ivanovska, T. P.; Petruševska-Tozi, L.; Ugarkovic, S.; Goracinova, K. 2017. «*Lactobacillus casei* encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying». *Food Technology and Biotechnology* 55(2):173-86.
- Hernández San Juan, I. 2018. «La producción y consumo sostenible y la reducción del desperdicio alimentario como una de sus metas». *Ricerche Giuridiche sull'Amministrazione e l'Economia* 0(1):125-47.
- Joglar, J. M. 2016. «Revalorización de coproductos: producción de péptidos con actividad antimicrobiana a partir de proteínas de suero lácteo». Trabajo Fin de Máster, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Kos, B.; Šušković, J.; Vuković, S.; Šimpraga, M.; Frece, J.; Matošić, S. 2003. «Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92». *Journal of Applied Microbiology* 94(6):981-87.
- León de la O, D. I.; Calderón Yépez, B.; Martínez Ballinas, A.; Sánchez Herrera, E.; Zulatto Lobato, A. C.; Camacho Hernández, I.; Arredondo Villanueva, A. L.; Salgado Brito, R. 2013. «Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque». *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar* 12(12):133-44.
- Luján Jiménez, M. 2010. «Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora en administración oral». Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
- Mahmoudi, I.; Ben Moussa, O.; El Moulouk Khaldi, T.; Kebouchi, M.; Soligot, C.; Le Roux, Y.; Hassouna, M. 2016. «Functional *in vitro* screening of *Lactobacillus* strains isolated from tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic». *Small Ruminant Research* 137:91-98.
- MAPAMA. 2017a. *Informe del consumo de alimentación en España 2017 - 2019*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, España.
- MAPAMA. 2017b. *Las pérdidas y el desperdicio alimentario en la industria agroalimentaria española: la situación actual y retos del futuro*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, España.
- MAPAMA. 2019. *Informe anual de la industria alimentaria española periodo 2019 - 2020*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid, España.
- Martín Lajara, J. 2017. «Efecto de la trehalosa y la homogenización sobre la actividad antioxidante y el efecto probiótico de manzana impregnada y secada por aire caliente durante su almacenamiento». Trabajo Fin de Grado, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Messaoudi, S.; Manai, M.; Kergourlay, G.; Prévost, H.; Connil, N.; Chobert, J. M.; Dousset, X. 2013. «*Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity». *Food Microbiology* 36(2):296-304.
- Minekus, M.; Alming, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Egger, L.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Recio, I.; Santos, C. N.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Brodtkorb, A. 2014. «A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus». *Food & Function* 5(6):1113-24.
- Mota, M. J.; Lopes, R. P.; Koubaa, M.; Roohinejad, S.; Barba, F. J.; Delgado, I.; Saraiva, J.A. 2018. «Fermentation at non-conventional conditions in food- and bio-sciences by the application of advanced processing technologies». *Critical Reviews in Biotechnology* 38(1):122-40.
- Neville, B. A.; O'Toole, P. W. 2010. «Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species». *Future Microbiology* 5(5):759-74.

- de Oliveira Gonçalves, T.; Silverio Filbido, G.; de Oliveira Pinheiro, A. P.; Pinto Piereti, P. D.; Dalla Villa, R.; Paiva de Oliveira, A. 2020. «*In vitro* bioaccessibility of the Cu, Fe, Mn and Zn in the baru almond and bocaiúva pulp and, macronutrients characterization». *Journal of Food Composition and Analysis* 86:103356.
- Olveira, G.; González-Molero, I. 2016. «Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica». *Endocrinología y Nutrición* 63(9):482-94.
- Pérez-Leonard, H.; Bueno-García, G.; Brizuela-Herrada, M. A.; Tortoló-Cabañas, K.; Gastón-Peña, C. 2013. «Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos». *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar* 47(1):14-25.
- Qi, X.; Simsek, S.; Chen, B.; Rao, J. 2020. «Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: Effect of biopolymer type and concentrations». *International Journal of Biological Macromolecules* 165:1675-85.
- Redacción Énfasis Alimentación. 2020. «Residuos de leche vegetal, el reciclaje de ingredientes». *Énfasis Alimentación*.
- Remeta, D. P.; Krumbiegel, M.; Minetti, C. A. S. A.; Puri, A.; Ginsburg, A.; Blumenthal, R. 2002. «Acid-induced changes in thermal stability and fusion activity of Influenza Hemagglutinin». *Biochemistry* 41(6):2044-54.
- Rivas Montoya, E. 2014. «Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados». Tesis Doctoral, Universidad de Málaga, Málaga, España.
- Rodrigues, F. J.; Cedran, M.F.; Bicas, J. L. Sato, H. H. 2020. «Encapsulated probiotic cells: relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review». *Food Research International* 137:109682.
- Rojas Vergara, M. 2017. «Avances tecnológicos en la revalorización de productos de la vinificación». Trabajo Fin de Grado, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Rondón, A. J.; Samaniego, L. M.; Bocourt, R.; Rodríguez, S.; Milián, G.; Ranilla, M. J.; Laurencio, M.; Pérez, M. 2008. «Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus* strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers». *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6(1):56-63.
- Ryan, K. A.; O'Hara, A. M.; van Pijkeren, J. P.; Douillard, F. P.; O'Toole, P.W. 2009. «*Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*». *Journal of Medical Microbiology* 58(Pt 8):996-1005.
- Sanhueza, E.; Paredes-Osses, E.; González, C. L.; García, A. 2015. «Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO\_979C wild type and the pH acid acclimated variant». *Electronic Journal of Biotechnology* 18(5):343-46.
- Savedboworn, W.; Noisumdang, C.; Arunyanon, C.; Kongcharoen, P.; Phungamngoen, C.; Rittisak, S.; Charoen, R.; Phattayakorn, K. 2020. «Potential of protein-prebiotic as protective matrices on the storage stability of vacuum-dried probiotic *Lactobacillus casei*». *LWT* 131:109578.
- Shahidi, F.; Han, X. Q. 1993. «Encapsulation of food ingredients». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33(6):501-47.
- Sierra, S.; Lara-Villoslada, F.; Sempere, L.; Olivares, M.; Boza, J.; Xaus, J. 2010. «Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults». *Anaerobe* 16(3):195-200.
- Siroli, L.; Braschi, G.; Rossi, S.; Gottardi, D.; Patrignani, F.; Lanciotti, R. 2020. «*Lactobacillus paracasei* A13 and high-pressure homogenization stress response». *Microorganisms* 8(3).
- Sivamaruthi, B. S.; Fern, L. A.; Rashidah Pg Hj Ismail, D.S. N.; Chaiyasut, C. 2020. «The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 128:110310.
- Tabanelli, G.; Patrignani, F.; Gardini, F.; Vinderola, G.; Reinheimer, J.; Grazia, L.; Lanciotti. 2012. «Effect of a sublethal high-pressure homogenization treatment on the fatty acid membrane composition of probiotic *Lactobacillus*». *LWT - Food Science and Technology* 58(2):109-17.
- Thies, C. 2005. «A survey of microencapsulation processes». In S. Benita (Ed) *Microencapsulation*:1-20.

- Vijayalakshmi, S.; Adeyemi, D. E.; Choi, I. Y.; Sultan, G.; Madar, I. H.; Park, M. K. 2020. «Comprehensive *in silico* analysis of lactic acid bacteria for the selection of desirable probiotics». *LWT* 130:109617.
- Vinceković, M.; Viskić, M.; Jurić, S.; Giacometti, J.; Kovačević, D. B.; Putnik, P.; Donsì, F.; Barba, F. J.; Jambrak, A. R. 2017. «Innovative technologies for encapsulation of mediterranean plants extracts». *Trends in Food Science & Technology* 69:1-12.
- Vinderola, C. G.; Reinheimer, J. A. 2003. «Lactic acid starter and probiotic bacteria: A Comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance». *Food Research International* 36(9):895-904.
- Yada, S.; Huang, G.; Lapsley, K. 2013. «Natural variability in the nutrient composition of California-grown almonds». *Journal of Food Composition and Analysis* 30(2):80-85.
- Yada, S.; Lapsley, K.; Huang, G. 2011. «A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients». *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4):469-80.