

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRÒNOMICA I DEL MEDI NATURAL



**EVOLUCIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS Y ANTIOXIDANTES DE
PRODUCTOS DE MANZANA LIOFILIZADA DURANTE SU
ALMACENAMIENTO.**

Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

ALUMNA: REBECA ÚBEDA CATALÀ

TUTORA: Dra. CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS

COTUTORA: Dra. NOELIA BETORET VALLS

Curso académico 2017 – 2018

Valencia, Diciembre de 2017

Evolución de las propiedades probióticas y antioxidantes de productos de manzana liofilizada durante su almacenamiento

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria patógena que causa graves problemas gástricos a gran parte de la población mundial, especialmente en países menos desarrollados. Los tratamientos tradicionales a base de antibióticos tienen efectos secundarios y no son efectivos al 100%. Estudios recientes demuestran que algunas cepas del género *Lactobacillus* son efectivas en el tratamiento contra *Helicobacter pylori*, reduciendo la colonización de este patógeno, lo que ha promovido su incorporación en la formulación de determinados alimentos. Sin embargo, la supervivencia de este microorganismo en alimentos es bastante limitada, especialmente si no son de origen lácteo.

Este Trabajo de Final de Grado se plantea con el objeto de desarrollar un snack probiótico mediante impregnación a vacío con zumo de clementina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* y posterior liofilización. Para aumentar la viabilidad del probiótico durante el procesado y almacenamiento del citado snack se propone la incorporación de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación con el probiótico y/o la homogeneización a presión moderada tras su incubación.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la liofilización es una técnica adecuada para la estabilización de láminas de manzana impregnadas con el microorganismo probiótico ya que, a pesar de los daños estructurales ocasionados por la congelación y posterior sublimación del agua, tanto el recuento de viables como el contenido en compuestos con actividad antioxidante se vio incrementado tras esta operación de deshidratación. Sin embargo, pese a la baja actividad del agua alcanzada por las muestras al final del proceso, tanto la viabilidad del probiótico como el contenido en flavonoides disminuyeron tras 30 días de almacenamiento. En cuanto a la composición del líquido de impregnación, la adición de un 10% de trehalosa en peso y/o la homogeneización a 100 MPa aceleraron la pérdida de viabilidad del probiótico pero retardaron la de flavonoides y promovieron un aumento en el contenido en fenoles y antioxidantes totales. Finalmente, la liofilización de las muestras impregnadas produjo los cambios esperados en las propiedades ópticas y mecánicas, las cuales permanecieron más o menos estables hasta el final del almacenamiento.

Palabras clave: Trehalosa, homogeneización, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, impregnación a vacío, liofilización, antioxidantes.

Evolució de les propietats probiòtiques i antioxidants de productes de poma liofilitzada durant el seu emmagatzemament

RESUM

Helicobacter pylori és un bacteri patògen que causa greus problemes gàstrics a gran part de la població mundial, especialment en països menys desenvolupats. Els tractaments tradicionals a base d'antibiòtics tenen efectes secundaris i no són efectius al 100%. Estudis recents demostren que alguns ceps del gènere *Lactobacillus* són efectives en el tractament contra *Helicobacter pylori*, reduint la colonització d'aquest patògen, la qual cosa ha promogut la seua incorporació en la formulació de determinats aliments. No obstant això, la supervivència d'este microorganisme en aliments és prou limitada, especialment si no són d'origen lacti.

En aquest Treball de Fi de Grau es planteja amb l'objectiu de desenvolupar un snack probiòtic per mitja de la tècnica d'impregnació al buit amb suc de clementina inoculat amb *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* i posterior liofilització. Per tal d'augmentar la viabilitat del probiòtic durant el processat i emmagatzematge de l'esmentat snack es proposa la incorporació de trehalosa al líquid d'impregnació abans de la seua inoculació amb el probiòtic i/o l'homogeneïtzació a pressió moderada després de la seua incubació.

D'acord amb els resultats obtinguts, la liofilització és una tècnica adequada per a l'estabilització de làmines de poma impregnades amb el microorganisme probiòtic ja que, a pesar dels danys estructurals ocasionats per la congelació i posterior sublimació de l'aigua, tant el recompte de viables com el contingut en compostos amb activitat antioxidant es va veure incrementat després d'aquesta operació de deshidratació. No obstant això, a pesar de la baixa activitat de l'aigua aconseguida per les mostres al final del procés, tant la viabilitat del probiòtic com el contingut en flavonoides van disminuir després de 30 dies d'emmagatzematge. Pel que fa a la composició del líquid d'impregnació, l'addició d'un 10% de trehalosa en pes i/o l'homogeneïtzació a 100 MPa van accelerar la pèrdua de viabilitat del probiòtic però van retardar la de flavonoides i van promoure un augment en el contingut en fenols i antioxidants totals. Finalment, la liofilització de les mostres impregnades va produir els canvis esperats en les propietats òptiques i mecàniques, les quals van romandre més o menys estables fins al final de l'emmagatzematge.

Paraules clau: Trehalosa, homogeneïtzació, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, impregnació al buit, liofilització, antioxidants.

Evolution of the antioxidant and probiotic properties of freeze dried apple during storage

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a pathogenic bacterium that causes severe gastric problems to a large part of the world's population, especially in less developed countries. Traditional treatments based on antibiotics have side effects and are not 100% effective. Recent studies show that some strains of the *Lactobacillus* genus are effective in the treatment against *Helicobacter pylori*, reducing the colonization of this pathogen, which has promoted the incorporation of *Lactobacillus* in the formulation of certain foods. However, the survival of this microorganism in food is rather limited, especially in not dairy products.

The aim of this Final Degree Project is to develop a probiotic apple snack by vacuum impregnation with different clementine juices inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* and subsequent freeze drying. In order to increase the viability of the probiotic during the snack manufacture and storage, it is suggested to add trehalose to the juice formulation before its inoculation with the probiotic and/or to homogenize the juice under moderate pressure after its incubation.

According to the results obtained, freeze drying is a suitable technique for the stabilization of impregnated apple slices with the probiotic microorganism because, in spite of the structural damages caused by the freezing and following sublimation of the frozen water, both the count of viable cells and the content of compounds with antioxidant activity increased after this dehydration operation. However, despite the low water activity reached by the samples at the end of the process, both the viability of the probiotic and the flavonoid content decreased after 30 days of storage. As for the composition of the impregnation liquid, the addition of 10% of trehalose by weight and/or the homogenization at 100 MPa accelerated the loss of probiotic viability but delayed flavonoids degradation and promoted an increase in the amount of both phenols and total antioxidants. Finally, freeze drying of the impregnated samples caused the expected changes in the optical and mechanical properties, which remained more or less stable until the end of storage.

Key words: Trehalose, homogenization, *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius*, vacuum impregnation, lyophilisation, antioxidants.

Alumno: Rebeca Úbeda Català
Tutora: Cristina Barrera Puigdollers
Cotutora: Noelia Betoret Valls

VALENCIA, Diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer en primer lugar a Cristina Barrera por aceptar ser mi tutora sin la cual no hubiera sido posible, por el apoyo y ayuda en la realización del trabajo.

A todas las compañeras del laboratorio por la ayuda y consejos que me han dado durante los meses de experimental.

A mis compañeros de agro por todos los años juntos.

Y en especial a mi familia por haber hecho posible que haya llegado hasta aquí.

“Sempre seras l'estrella que més brillarà”

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	<i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2.	Probióticos	2
1.2.1	Efectos beneficiosos del consumo de probióticos y valor terapéutico.....	2
1.1.2.	Alimentos probióticos	3
1.3.	Técnicas de ingeniería empleadas en el desarrollo de alimentos probióticos	4
1.3.1.	Homogeneización a altas presiones.....	4
1.3.2.	Impregnación a vacío	5
1.3.3.	Trehalosa	5
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	6
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1.	Materias primas	7
3.2.	Preparación de los líquidos de impregnación	7
3.3.	Metodología experimental.....	8
3.3.1.	Impregnación a vacío	8
3.3.2.	Liofilización	8
3.3.3.	Almacenamiento	8
3.4.	Determinaciones analíticas	8
3.4.1.	Actividad del agua	8
3.4.2.	Humedad	9
3.4.3.	Propiedades mecánicas.....	9
3.4.4.	Propiedades ópticas	9
3.4.5.	Propiedades antioxidantes.....	9
3.4.6.	Recuento de viables	11
3.5.	Análisis estadístico	11
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1.	Efecto sobre el contenido en <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i>	12
4.2.	Efecto sobre las propiedades antioxidantes	15
4.3.	Efecto sobre las propiedades ópticas.....	18
4.4.	Efecto sobre las propiedades mecánicas.	20
5.	CONCLUSIONES	24
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Líquidos de impregnación empleados en el estudio.....	7
Tabla 4.1. Resultados obtenidos tras el ajuste lineal de los datos experimentales con un nivel de confianza del 99%.....	14
Tabla 4.2. Evolución de la humedad, la actividad del agua y las propiedades mecánicas de las muestras de manzana impregnada y liofilizada a lo largo del almacenamiento. Valores medios \pm desviación estándar.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 4.1.** Valores teóricos y experimentales de las propiedades antioxidantes en manzana liofilizada. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05)..... 122
- Figura 4.2.** Evolución del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* de las muestras de manzana liofilizada durante el almacenamiento. Para un mismo líquido de impregnación, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05)..... 144
- Figura 4.3.** Valores teóricos y experimentales de las propiedades antioxidantes en manzana liofilizada. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05)..... 155
- Figura 4.4.** Evolución de las propiedades antioxidantes a lo largo del almacenamiento. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05)..... 17
- Figura 4.5.** Variación neta en el contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante tras 30 días de almacenamiento de las muestras de manzana liofilizadas. Donde $(X^i_{LIO})_{t=0}$ es la concentración en base seca del antioxidante i (g i/g sólido seco) en la manzana liofilizada al inicio del almacenamiento y $(X^i_{LIO})_{t=30}$ es la concentración en base seca del antioxidante i (g i/g sólido seco) en la manzana liofilizada al final del almacenamiento. Para una misma serie. Letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05)..... 18
- Figura 4.6.** Coordenadas de color CIE L*, a* y b* de las muestras de manzana impregnadas con los diferentes líquidos de impregnación (marcador con relleno) y de las muestras de manzana impregnada y posteriormente liofilizada (marcador sin relleno)..... 19
- Figura 4.7.** Evolución del color global de las muestras liofilizadas durante los 30 días de almacenamiento. Para un mismo líquido de impregnación, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). 20
- Figura 4.8.** Gráfico de interacciones e intervalos LSD resultantes del análisis multifactorial de la varianza llevado a cabo para evaluar el grado de significancia de las variables de proceso (tipo de líquido de impregnación y aplicación o no de una etapa de liofilización) sobre las propiedades mecánicas de láminas de manzana. 21
- Figura 4.9.** Curvas típicas del ensayo de punción de las muestras de manzana impregnadas con el líquido 10%_OMPa, antes y después de la etapa de liofilización. 222

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, curvada que mide 2-3 nm de longitud y 0,5-1.0 nm de diámetro y que posee seis flagelos unipolares cubiertos con una membrana y con terminación bulbar. Es una bacteria microaerófila que coloniza la mucosa gástrica y provoca la gastritis crónica.

Fue redescubierta a partir de biopsias gástricas y posterior aislamiento por dos investigadores australianos, Warren y Marshall en 1984. Se trata de uno de los patógenos gastrointestinales más comunes en humanos, que afecta al menos al 50% de la población (Taylor & Blaser, 1991). La infección suele aparecer en la infancia. La bacteria coloniza la mucosa gástrica, causando una gastritis que puede progresar a gastritis crónica, úlcera péptica, úlcera de duodeno y en algunos casos cáncer gástrico. (Parsonnet, 1998).

Actualmente, para su erradicación se aplica un tratamiento durante 7-14 días con dos o tres antibióticos (amoxicilina, tetraciclina, claritromicina o metronidazol) y un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol o esomeprazol) o un antagonista de los receptores H2 (ranitidina, cimetidina, famotidina o nizatidina). Aunque este tratamiento es efectivo en el 85% de los casos (Graham y Yamaoka, 2000), puede fallar por la aparición de resistencia o intolerancia de los pacientes a los antimicrobianos (Lopes et al., 2014).

Como alternativa al tratamiento tradicional con antibióticos, se han desarrollado diversos estudios clínicos y modelos *in vitro* que demuestran que la asociación de bacterias del género *Lactobacillus* con antibióticos para el tratamiento de *Helicobacter pylori* ejercen un efecto antagonista frente a este microorganismo y reduce los síntomas de intolerancia digestiva debidos a los antibióticos (Hamilton-Miller, 2003). El mecanismo de acción de los probióticos es bastante complejo, ejerciendo acción directa e indirecta sobre la bacteria *Helicobacter pylori*, la flora intestinal, así como sobre la mucosa y la respuesta inmunológica del huésped (Boirivant et al., 2007; Bortoli et al., 2007).

A nivel de laboratorio se ha demostrado que *Lactobacillus acidophilus* es capaz de amortiguar las reacciones metabólicas desencadenadas por este patógeno y que estimulan la formación de precursores de la respuesta pro-inflamatoria (Yang et al., 2012). Los lactobacilos pueden atenuar la hipoclorhidria asociada a la infección por *Helicobacter pylori*, mediante la secreción de ácido láctico. De esta forma se restaura el pH luminal como mecanismo gástrico de defensa y se induce a la producción de prostaglandinas endógenas protectoras de la mucosa gástrica debido a la alta concentración de ácido láctico en el estómago (Cats et al., 2003; Sgouras et al., 2004; Sykora et al., 2005; Uchida et al., 2004). Finalmente, se ha observado que ciertos lactobacilos (en especial, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* y *Lactobacillus acidophilus*) son resistentes al pH gástrico, pudiendo residir en el estómago humano de manera transitoria

(Marteau et al., 1997), compitiendo por los sitios de unión al huésped e inhibiendo la colonización por *Helicobacter pylori*.

1.2. Probióticos

El término probiótico fue usado por primera vez por Lilly y Stillwell en 1965 para describir sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otros microorganismos. Posteriormente, Fuller (1989) lo definió como microorganismos incluidos en productos dietéticos que contribuyen al balance microbiano intestinal (López-Brea y Domingo, 2007). En 2001, la Organización Mundial de la Salud lo redefinió como microorganismos vivos que, consumidos en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador (FAO/OMS, 2001; López-Brea y Domingo, 2007). Según algunos autores es imprescindible ingerir una cantidad diaria de 10^7 - 10^8 UFC para que un probiótico mantenga su función, y que si es menor, este es incapaz de ejercer su beneficio sobre la salud (Gómez, Nova y Marcos).

Los microorganismos probióticos deberán ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en los intestinos, o ser consumido en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso del estómago y a la exposición a la bilis. Son bacterias grampositivas pertenecientes generalmente a los géneros, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Holzapel et al., 1998; Klein et al., 1998). Estos microorganismos han sido reconocidos como organismos GRAS (*Generally Regarded As Safe*). (Suarez, 2013). El óptimo para su crecimiento es una temperatura de 35 – 40 °C y un pH de 4,5 – 6,4 (Shah, 2007).

- ❖ *Lactobacillus*: bacilos gran positivos con pared celular gruesa, los cuales podemos encontrar tanto de metabolismo heterofermentativas como homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto que obtienen a partir de carbohidratos (Euzeby, 2013).
- ❖ *Bifidobacterium*: bacilos gran positivos en forma de V o Y (Euzeby, 2013) homofermentativos, inmóviles, incapaces de formar esporas. Son organismos clave en el intestino de animales y humanos, asociados al mantenimiento del balance microbiano (Pokusaeva et al., 2011).

1.2.1 Efectos beneficiosos del consumo de probióticos y valor terapéutico

Son varios los beneficios asociados a la ingesta de probióticos, entre los cuales cabe destacar los siguientes:

- Tratamiento de los problemas digestivos: los probióticos han sido usados para restablecer la flora intestinal normal durante la terapia con antibióticos, además de reducir la incidencia de la diarrea aguda causada por la infección por rotavirus (Saavedra et al., 1994). También se ha demostrado la eficacia de los probióticos en combinación con tratamientos médicos para el tratamiento de úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori* (Hamilton-Miller, 2003).
- Modulación del sistema inmunológico: estudios han demostrado que los probióticos de las cepas *Bifidobacterium* y *Lactobacillus rhamnosus* son capaces de activar los

macrófagos y linfocitos mejorando los niveles de inmunoglobulina (Gupta y Garg, 2009).

- Reducción de cáncer de colon: estudios del uso de probióticos han demostrado efectos antimicrobianos contra microorganismos productores de carcinógenos, propiedades antimutagénicas y alteración de los procesos de diferenciación celular en tumores (Liong, 2008). Cambios en la dieta, incluyendo el consumo de probióticos han sido recomendados para aumentar el sistema inmunológico (Davis y Milner, 2009).
- Intolerancia a la lactosa: se ha demostrado que bacteria que contienen β -galactosidasa, ayudan aliviar los problemas de digestión de la lactosa (Kim y Gilliland, 1983). Además algunos probióticos (*L. delbrueckii. ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus*) indicadoras de la fermentación de lactosa también tienen efectos positivos para la digestión de la lactosa (Kim y Gilliland, 1984; Kolars et al., 1984).
- Disminución del colesterol: algunos estudios ponen de manifiesto que ciertos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium*) disminuyen el nivel de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (Ooi y Liong, 2010).
- Enfermedades cardiovasculares: hay indicios que la utilización de probióticos podría conferir beneficios al corazón, como la prevención y terapias de cardiopatías isquémicas (Oxman et al., 2001).
- Infecciones del aparato urinario: hay estudios que relacionan la ingesta de probióticos de las cepas *Lactobacillus*, con un restablecimiento de la flora vaginal, dominada por lactobacillus y con consiguiente reducción del riesgo de reaparición de enfermedades del aparato urinario (Reid et al., 2001b).

Hasta el momento, la forma más habitual de ingerir los microorganismos probióticos es a través de alimentos, tales como los productos lácteos (los microorganismos se encuentran vivos pero en menor concentración), o de suplementos dietéticos o preparados farmacéuticos liofilizados (los microorganismos se encuentran en elevada concentración pero generalmente inactivos) (Sanders, 1999 y Ouwerhand, 2002). Existe un interés creciente en el desarrollo de alimentos probióticos no lácteos debido a problemas como la intolerancia a la lactosa y el elevado contenido en colesterol que presentan los productos fermentados (Heenan et al., 2004). Los avances tecnológicos han permitido alterar características estructurales de las matrices de frutas y hortalizas mediante la modificación de algunos componentes de los alimentos de forma controlada (Betoret et al, 2003). A continuación se detallan algunos de los alimentos con efecto probiótico.

1.1.2. Alimentos probióticos

- Leches fermentadas: son alimentos obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche por fermentación láctica, por medio de microorganismos específicos. Dentro de este tipo, la normativa diferencia entre dos tipos: por un lado el yogur, el cual su fermentación se lleva a cabo mediante la incorporación de microorganismos tales como *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus* y por otro lado las leches fermentadas que utiliza otros cultivos tales como *Bifidobacterium spp.*, *L. acidophilus*, *L. casei* etc. Los yogures pasteurizados, incluidos actualmente en el

termino yogur, al ser sometidos a proceso de pasteurización pierden la flora láctica y por tanto sus efectos beneficiosos atribuidos a las bacterias viables (Sanz et al., 2003).

- **Zumos:** como alternativa a los productos lácteos, los cuales no pueden ser ingeridos por toda la población, hay un interés por el desarrollo de zumos de frutas o bebidas funcionales con probióticos que son atractivos para todo tipo de edades (Tuorila and Cardello, 2002; Yoon et al., 2004; Sheehan et al., 2007). Se han encontrado cepas de *Lactobacillus* capaces de crecer en matrices de frutas (Salminen and Von Wrigh, 1993). La viabilidad celular depende de la cepa utilizada, las características del sustrato, el contenido en oxígeno y la acidez final del producto (Shah, 2001). *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de sobrevivir en zumo de naranja en concentraciones superiores a 10^7 UFC/mL, sin embargo después de aplicar un tratamiento térmico y un tratamiento de altas presiones, la concentración disminuye a valores por debajo de 10^6 UFC/mL (Sheehan et al., 2007).
- **Cereales:** Los cereales son una fuente importante de proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fibra (Chavan y Kadam, 1989). Estos pueden ser capaces de estimular selectivamente el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presente en el colon, actuando como prebióticos (Andersson et al., 2001).

Otros alimentos como los helados, la carne, los quesos o los productos vegetales, tales como frutas, también pueden influir en el crecimiento, la viabilidad y la supervivencia, la tolerancia a los ácidos y la bilis, y la diferente funcionalidad de los probióticos, lo que determina su eficacia en el tracto gastrointestinal (Ranadheera et al., 2010)

1.3. Técnicas de ingeniería empleadas en el desarrollo de alimentos probióticos

A continuación se detallan algunas técnicas de ingeniería empleadas en el presente estudio con la finalidad de aumentar la supervivencia de los probióticos frente a las condiciones adversas de procesado, almacenamiento y/o digestión.

1.3.1. Homogeneización a altas presiones

La homogeneización es un proceso que se basa en hacer pasar un alimento fluido a través de una válvula que ofrece resistencia, lo que permite obtener presiones elevadas. Hay estudios que han aplicado esta nueva tecnología para aumentar la supervivencia de cepas con efecto probiótico o mejorar sus propiedades funcionales, aumento en la hidrofobicidad y, por tanto, en su capacidad para adherirse a la mucina (Patrignani et al., 2009).

Las altas presiones de homogeneización están cobrando gran importancia en la industria alimentaria como alternativa a los tratamientos térmicos tradicionales, los cuales aunque garantizan la seguridad microbiológica también destruyen gran parte de los compuestos con

actividad funcional (Gómez et al., 2011). Hay estudios que demuestran las ventajas de usar presiones de homogenización sobre la estabilidad de los componentes bioactivos con efecto antioxidante. En zumo de mandarina, la homogenización disminuye el tamaño de las partículas suspendidas, aumentando la estabilidad de la nube y, con ello, la disponibilidad de los componentes activos con propiedades antioxidantes (Betoret et al., 2009; Betoret et al., 2012b).

1.3.2. Impregnación a vacío

La técnica de impregnación a vacío (IV) de un producto poroso consiste en intercambiar el gas interno o líquido ocluido en poros abiertos por una fase líquida externa, debido a la acción de los mecanismos hidrodinámicos (HDM) promovidos por los cambios de presión (Fito, 1994; Fito & Pastor, 1994). Esta operación se lleva a cabo en dos etapas. En una primera etapa, la presión de vacío (50-100 mbar) se impone en el sistema durante un corto tiempo en el tanque cerrado, promoviendo así la expansión y el flujo de salida del gas interno del producto. En la segunda etapa, la presión atmosférica se restablece durante un tiempo y la compresión conduce a una gran reducción de volumen del gas restante en los poros, y por lo tanto al flujo subsecuente del líquido externo hacia el interior de la estructura porosa.

La impregnación a vacío puede permitirnos incorporar cualquier ingrediente, ya sean ácidos, conservantes, azúcares, probióticos, etc. en un producto poroso para adaptar su composición a ciertos requisitos de calidad o estabilidad. En el caso de incorporar probióticos en la estructura porosa de un tejido vegetal, es de esperar que éste le confiera cierta protección frente a las condiciones adversas de procesado, almacenamiento y digestión. Puede considerarse una herramienta para el desarrollo de nuevos productos de frutas o vegetales sin alterar su estructura celular (Chiralt et al., 1999).

1.3.3. Trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido), el cual se encuentra presente en una amplia gama de organismos, en los que actúa como azúcar de reserva y como protector frente al estrés abiótico. La trehalosa posee amplias aplicaciones biotecnológicas ya que protege proteínas y membranas biológicas, lo que permite su uso como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos, además de su empleo como sustitutivo de la sacarosa en productos de panadería y bollería (Ohtake y Wang, 2011). En la protección de las proteínas, la trehalosa forma una capsula a alrededor de las mismas y preserva su estructura terciaria (Lins et al., 2004). Se ha demostrado el efecto crioprotector de la trehalosa durante la congelación y posterior liofilización de cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Conrad et al., 2000). Es de esperar, por tanto, que la adición de trehalosa a la formulación del líquido de impregnación aumente la supervivencia del probiótico a las condiciones adversas de procesado y almacenamiento.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo Final de Grado consiste en mejorar la funcionalidad de un snack probiótico a base de manzana obtenido mediante impregnación a vacío con zumo de clementina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 y posterior liofilización. Para conseguir este objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 2.1. Evaluar el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación y la homogenización del mismo a 100 MPa una vez inoculado ejercen sobre el contenido probiótico, las propiedades antioxidantes, el color y la textura de *muestras de manzana impregnadas*.
- 2.2. Evaluar el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación y la homogenización del mismo a 100 MPa una vez inoculado ejercen sobre el contenido probiótico, las propiedades antioxidantes, el color y la textura de *muestras de manzana impregnadas y liofilizadas*.
- 2.3. Evaluar el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación y la homogenización del mismo a 100 MPa una vez inoculado ejercen sobre el contenido probiótico, las propiedades antioxidantes, el color y la textura de *muestras de manzana impregnadas, liofilizadas y almacenadas durante 30 días*.

A continuación, se detalla el plan de trabajo planteado para la consecución de los objetivos comentados:

- Formulación de los líquidos de impregnación y preparación de las láminas de manzana.
- Impregnación a vacío de las láminas de manzana y análisis de las muestras impregnadas.
- Estabilización de las muestras impregnadas mediante congelación y posterior liofilización.
- Análisis de las muestras liofilizadas y almacenamiento durante 30 días en condiciones adecuadas.
- Análisis de las muestras almacenadas a diferentes tiempos a lo largo de los 30 días de almacenamiento.
- Tratamiento y discusión de los datos obtenidos experimentalmente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materias primas

Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron manzanas de la variedad *Granny Smith*, cortadas en láminas de 5 mm de espesor y 20 y 65 mm de diámetro interno y externo respectivamente.

El líquido para la impregnación se elaboró a partir de zumo de clementina comercial (marca Hacendado) con o sin un 10% de trehalosa en peso, de grado alimentario, obtenida a partir de almidón de tapioca (TREHA™, Cargill, S.L.U, Barcelona).

Como microorganismo probiótico para este estudio se empleó la cepa probiótica CECT 4063 de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia), seleccionado por sus efectos beneficiosos frente a la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*, bacteria patógena que causa graves problemas gástricos. Para su reactivación, las cepas liofilizadas y/o congeladas se resuspendieron en caldo MRS estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, se sembraron 0,1 mL en la superficie de placas con agar MRS y se incubaron en estufa a 37 °C durante 24 h. Tras un máximo de una semana de almacenamiento a 4 °C, se recogió con un asa de siembra la capa blanca crecida en la superficie de la placa con agar MRS, se introdujo en un tubo con 9 mL de caldo MRS Broth previamente esterilizado y se volvió a incubar con las condiciones anteriores (24 h a 37 °C). De esta forma se obtuvo el inóculo con una concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* del orden de $7,7 \pm 0,9 \times 10^8$ UFC/mL.

3.2. Preparación de los líquidos de impregnación

De acuerdo con el método descrito por (Betoret et al., 2012), para el correcto crecimiento del probiótico en el zumo de clementina se adicionó extracto de levadura (5 g/L) y se elevó su pH desde 3,7 hasta 6 mediante la adición de bicarbonato de sodio (9,8 g/L). Además, en determinados casos, se añadió trehalosa (100 g/Kg) a la formulación del zumo. Para la correcta disolución de todos los ingredientes, la mezcla se realizó en agitación a 200 rpm. A continuación, el líquido se inoculó con el caldo MRS Broth (4 mL/L) que contenía el microorganismo crecido. Una vez inoculado, el líquido se incubó a 37 °C durante 24 h. Pasado este tiempo, una parte del líquido se homogenizó a 100 MPa en un homogenizador de altas presiones a escala de laboratorio (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia) y el resto se empleó directamente en la etapa de impregnación a vacío. Se prepararon un total de cuatro líquidos de impregnación diferentes (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Líquidos de impregnación empleados en el estudio.

LÍQUIDO DE IMPREGNACIÓN	[TREHALOSA] (g/100g)	PRESIÓN (MPa)
0%_0MPa	0	0
0%_100MPa	0	100
10%_0MPa	10	0
10%_100MPa	10	100

3.3. Metodología experimental

A continuación se describen las operaciones unitarias implicadas en el proceso de obtención de snacks de manzana con alto contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*.

3.3.1. Impregnación a vacío

La impregnación a vacío se llevó a cabo en una cámara de vacío (HERAEUS Vacuun Oven, THERMO SCIENTIFIC), conectada a una bomba de vacío (ILMVAC, ALEMANIA). Para ello, las rodajas de manzana se sumergieron en el líquido de impregnación y se aplicó una presión de vacío de 50 mbar durante 10 min. Transcurrido ese tiempo se rompió el vacío y se restauró la presión atmosférica que se mantuvo durante otros 10 min más.

3.3.2. Liofilización

En primer lugar, las muestras se mantuvieron durante 24 h en un congelador a -40 °C (Matek modelo CVN-40/105). A continuación, las muestras se introdujeron en un liofilizador a escala de plata piloto (TELSTAR LIOALFA 6-80) donde permanecieron a -45 °C y una presión de vacío de 0,1 mbar durante otras 24 h.

3.3.3. Almacenamiento

Las rodajas de manzana liofilizadas se almacenaron en bolsas herméticas y opacas en condiciones de humedad relativa y temperatura controladas durante 30 días. A diferentes tiempos a lo largo del almacenamiento (7, 15, 21 y 30 días) las muestras se analizaron en términos de humedad, actividad del agua, textura, color, propiedades antioxidantes y contenido probiótico.

3.4. Determinaciones analíticas

Todas las determinaciones analíticas descritas en este apartado se realizaron al menos por triplicado sobre muestras de zumo y manzana en diferentes instantes a lo largo del proceso de elaboración de las mismas.

3.4.1. Actividad del agua

La actividad del agua se midió con un higrómetro de punto de rocío (Decagon Aqualab modelo CX-2, con una precisión de $\pm 0,003$) a 25 °C, previamente calibrado.

3.4.2. Humedad

La humedad de las muestras de manzana se determinó según el método oficial 20.013 de la AOAC (1980) para frutas ricas en azúcar. El método consiste en cuantificar la pérdida de peso que experimenta una cantidad conocida de muestra durante su secado en una estufa de vacío (VACIOTEM-T J.P. SELECTA) a 60 °C y una presión de 200 mbar hasta alcanzar peso constante (ecuación 1).

$$x_w = \frac{M1 - M2}{M1 - M0} \quad \text{ecuación 1}$$

donde: M0 = peso del crisol vacío (g), M1 = peso del crisol con la muestra antes del secado en estufa a 60 °C (g) y M2 = peso del crisol con la muestra después del secado en estufa a 60 °C (g).

3.4.3. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron mediante ensayo de punción con un texturómetro TA- XT Plus (Stable Micro Systems).

El ensayo se llevó a cabo con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 2 mm de diámetro que recorrió una distancia de 10 mm hasta atravesar completamente la muestra. Las condiciones del ensayo fueron una velocidad de avance de 2 mm/s, una fuerza de 0,04903 N y una celda de carga de 50 Kg. A partir de las curvas fuerza-distancia proporcionadas por el equipo se obtuvieron los valores de fuerza máxima ($F_{m\acute{a}x}$, N) y distancia recorrida por el punzón hasta alcanzar la fuerza máxima ($d_{m\acute{a}x}$, mm).

3.4.4. Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas se midieron en un espectrocolorímetro (Minolta, CM-3600d) sobre fondo negro, utilizando como iluminante D65 y como observador 10°. Las medidas de color se expresaron como coordenadas CIE L*a*b donde L* es la medida de la luminosidad, a* es la medida del contenido de color rojo o de verde y b* es la medida del contenido de color en amarillo o azul. A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las diferencias de color experimentadas por las muestras de manzana liofilizada a lo largo del almacenamiento (ecuación 2).

$$\Delta E = \sqrt{(L_t^* - L_{t0}^*)^2 + (a_t^* - a_{t0}^*)^2 + (b_t^* - b_{t0}^*)^2} \quad \text{ecuación 2}$$

donde: L_{t0}^* , a_{t0}^* y b_{t0}^* son las coordenadas de color de las muestras de manzana impregnadas y recién liofilizadas y L_t^* , a_t^* y b_t^* son las coordenadas de color de las muestras de manzana impregnadas, liofilizadas y almacenadas durante un tiempo t.

3.4.5. Propiedades antioxidantes

Las determinaciones se llevaron a cabo a partir de extractos de las muestras sólidas, obtenidos al mezclar una cantidad conocida de manzana (2 g para manzana fresca e impregnada y 0,35 g para la manzana liofilizada) con 10 mL de una disolución de metanol-agua en una relación

80:20 (v/v). Una vez en contacto las dos fases, la mezcla se trituro con un ULTRA-TURRAX T25 digital y se dejó 1 h en agitación a 200 rpm y en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min, quedando la mayor parte de los antioxidantes disueltos en el sobrenadante.

CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

El contenido en fenoles totales se determinó mediante el método del reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) basado en la medida a 760 nm de una intensidad de coloración azulada generada a partir de la reacción a pH básico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos al entrar en contacto con el reactivo. La reacción se llevó a cabo mezclando en las cubetas de espectrofotometría 125 µL de extracto, 500 µL de agua bidestilada y 125 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Tras 6 min en oscuridad se añadieron 1,25 mL de Na₂CO₃ al 7% y 1 mL de agua bidestilada. Como referencia utilizamos un blanco donde el extracto fue reemplazado por la misma cantidad de disolvente metanol-agua (80:20, v/v). Para completar el desarrollo del color, se dejó en oscuridad durante 90 min. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific.

Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g) obtenidos a partir de la recta de calibrado preparado con este fenol de referencia y en el rango de concentraciones entre 100 y 500 ppm.

CONTENIDO EN FLAVONOIDES TOTALES

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el método colorimétrico del cloruro de aluminio (Luximon-Ramma et al., 2005) que consiste en hacer reaccionar el extracto con una disolución de cloruro de aluminio al 2% (w/v) en metanol. Para ello, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 1,5 mL de extracto con 1,5 mL de la disolución de AlCl₃. Tras 10 min de reacción en oscuridad, se midió la absorbancia a 368 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific.

Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra (mg EQ/g), obtenidos a partir de la recta de calibrado preparada con este flavonoide de referencia y en el rango de concentraciones comprendido entre 12,5 y 200 ppm.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Este método consiste en medir el cambio de coloración de una disolución del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en metanol con el extracto a 515 nm, debido a la capacidad que tiene de secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra y reducirlos, pasando de un color morado a un color amarillento (Brand-Williams et al., 1995). El ensayo se realizó añadiendo 50 µL de extracto y 2950 µL de una disolución DPPH-metanol 0,06 mM en una cubeta espectrofotométrica y dejando durante 90 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific.

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trólox por gramo de muestra (mg ET/g), calculados a partir de la recta de calibrado preparada con este antioxidantes de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 100 y 300 ppm.

3.4.6. Recuento de viables

La concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* se analizó tanto en el medio de crecimiento, como en el zumo y en las muestras de manzana impregnadas y liofilizadas, mediante dilución seriada en tubos con agua destilada estéril, siembra en superficie de placas petri con agar MRS e incubación en estufa a 37 °C durante 24 h. En el caso de las muestras de manzana sólida, la primera dilución se llevó a cabo en una bolsa stomacher en la que se trituraron 5 g de muestra con 45 mL de agua de peptona estéril.

3.5. Análisis estadístico

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestra el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa a la formulación del líquido de impregnación y/o la aplicación de una presión de homogeneización ejercen sobre las propiedades funcionales y fisicoquímicos de un snack de manzana con efecto probiótico obtenido mediante impregnación a vacío y posterior liofilización.

4.1. Efecto sobre el contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius*

En la Figura 4.1 se muestra el contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius* medido de forma experimental tanto en los diferentes líquidos de impregnación como en las muestras de manzana impregnadas con cada uno de ellos (manzana IV) y posteriormente liofilizadas (manzana LIO).

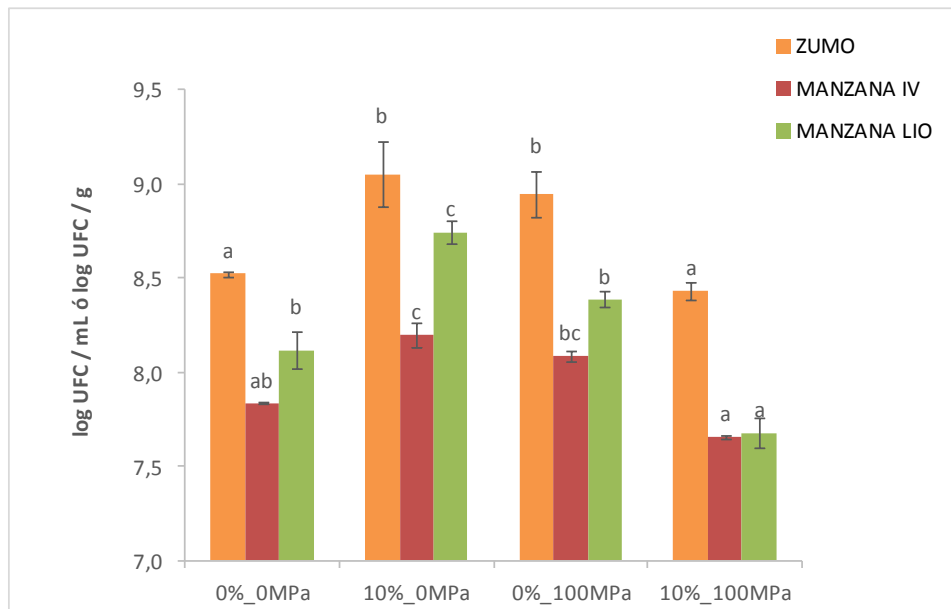


Figura 4.1. Valores teóricos y experimentales de las propiedades antioxidantes en manzana liofilizada. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Tal y como se puede observar, los recuentos obtenidos fueron en todos los casos superiores a 10^7 UFC/g, valor mínimo necesario para que un alimento pueda considerarse probiótico o, dicho en otras palabras, para que el consumo de 100 g ó 100 mL de dicho alimento proporcione la dosis diaria de 10^9 UFC recomendada para percibir los efectos beneficiosos que los probióticos ejercen sobre la salud (Ranadheera et al., 2010).

Analizando el contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* de las muestras de zumo se aprecia un aumento significativo en los líquidos en los que únicamente se añadió un 10% en peso de trehalosa (10%_0MPa) o se aplicó una presión de homogeneización de 100 MPa (0%_100MPa). Sin embargo, la combinación de ambas variables (10%_100MPa) no mejoró significativamente el recuento de viables.

Analizando el contenido probiótico de las muestras de manzana impregnada se observa que éste es significativamente menor al de los líquidos de impregnación. Este resultado es lógico si se tiene en cuenta que durante la etapa de impregnación a vacío sólo el 20% del volumen inicial de la muestra es ocupado por el líquido de impregnación (Fito et al., 2001). En concordancia con los resultados comentados anteriormente para los líquidos de impregnación, las muestras de manzana impregnada que presentaron mayores recuentos fueron las impregnadas con los líquidos 10%_OMP_a y 0%_100MP_a, mientras que las muestras de manzana impregnadas con el líquido 10%_100MP_a presentaron un contenido probiótico muy similar al de las muestras impregnadas con el líquido control que no incluía trehalosa en su composición ni había sido sometido a una operación de homogeneización (0%_OMP_a).

Finalmente, como era de esperar por el descenso en el contenido en agua que experimentan las muestras durante la liofilización, las muestras de manzana liofilizadas presentaron recuentos microbianos superiores a los de las muestras de manzana impregnadas. Sin embargo, estos recuentos no resultaron tan elevados como deberían ser, teniendo en cuenta que durante la congelación y posterior sublimación del agua congelada en las muestras su humedad desciende desde un 85,3 ($\pm 1,2$)% hasta un 4,97 ($\pm 1,02$)%. De esta forma se pone de manifiesto el impacto negativo que esta operación unitaria ejerce sobre la viabilidad del probiótico. De nuevo las muestras impregnadas con los líquidos con mayor contenido microbiano (10%_OMP_a y 0%_100MP_a) son las que obtuvieron un mayor recuento de viables tras la liofilización, aunque las diferencias con respecto a la muestra control (0%_OMP_a) sólo resultaron significativas desde un punto de vista estadístico para el caso de las muestras impregnadas con el líquido que incluía trehalosa en su composición. Nuevamente, la combinación de los dos factores en el líquido 10%_100MP_a es la que produjo peores resultados desde el punto de vista microbiológico. Además, mientras que en las muestras de zumo y en las de manzana impregnada los niveles de probiótico se mantuvieron del orden de los obtenidos en el líquido 0%_OMP_a, en el caso de las muestras de manzana liofilizada los recuentos resultaron significativamente más bajos. En otras palabras, se podría decir que la combinación del estrés osmótico debido a la mayor concentración de solutos en el medio y el estrés causado por la elevada presión aplicada durante la homogeneización hacen que el probiótico *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* sea más vulnerable al proceso de liofilización.

Por otra parte, se ha estudiado la evolución del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en las muestras de manzana liofilizadas a lo largo de su almacenamiento durante 30 días (Figura 4.2). Tal y como se observa, a lo largo de los 30 días de almacenamiento hay una disminución del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. Durante los primeros 15 días todas las muestras contenían una concentración en *Lactobacillus* superior a 10^7 UFC/g, lo cual indica que el snack sí tenía efecto probiótico. Al final del almacenamiento, únicamente las muestras impregnadas con los líquidos 0%_OMP_a y 10%_OMP_a reunían esta condición.

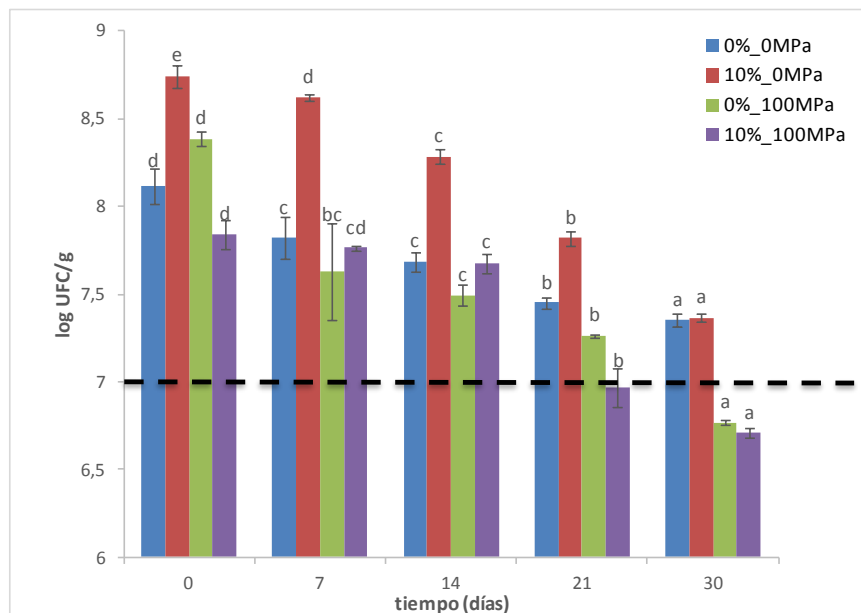


Figura 4.2. Evolución del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* de las muestras de manzana liofilizada durante el almacenamiento. Para un mismo líquido de impregnación, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor < 0,05).

Para corroborar de forma numérica el efecto que ejerce el líquido de impregnación sobre la viabilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* durante el almacenamiento, se ha obtenido el ajuste lineal de los datos experimentales y los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Resultados obtenidos tras el ajuste lineal de los datos experimentales con un nivel de confianza del 99%.

TRATAMIENTO	ORDENADA (Log UFC/g)	PENDIENTE (Log UFC/g · día)	R-CUADRADO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
0%_0MPa	8,256	-0,1898	97,94	-0,9794
10%_0MPa	9,234	-0,3555	96,24	-0,9817
0%_100MPa	8,589	-0,3599	93,05	-0,9651
10%_100MPa	8,308	-0,3052	87,54	-0,9284

En general, los valores de R-cuadrado resultaron elevados, lo que indica que el modelo predice con bastante exactitud el descenso en la población microbiana con el tiempo de almacenamiento. Por otra parte, los valores de la pendiente más elevados en el caso de las muestras impregnadas con los líquidos que incluían trehalosa en su composición y/o habían sido homogenizados confirman que la combinación del estrés causado por el gradiente de concentración y/o el gradiente de presión y el debido a los cambios experimentados durante el procesado resulta en una pérdida de viabilidad más acusada a lo largo del almacenamiento. En el caso de las muestras impregnadas con el líquido 10%_0MPa, dada la elevada concentración de microorganismo presente en la muestra liofilizada ($t = 0$ días), el producto no perdió su carácter probiótico tras 30 días de almacenamiento, como sí lo hicieron las muestras impregnadas con los líquidos 0%_100MPa y 10%_100MPa.

4.2. Efecto sobre las propiedades antioxidantes

En la figura 4.3 se muestra el contenido en fenoles totales, flavonoides totales y la actividad antioxidante de las muestras de manzana impregnadas con los diferentes líquidos de impregnación y de las impregnadas y posteriormente liofilizadas. Para las muestras liofilizadas, se comparan además los valores obtenidos de forma experimental y los calculados de forma teórica mediante la aplicación de balances de materia (ecuaciones 3 y 4).

$$m_{IV} \cdot x_{IV}^W = (m_{IV} - m_{LIO}) + m_{LIO} \cdot x_{LIO}^W \quad \text{ecuación 3}$$

$$m_{IV} \cdot x_{IV}^i = m_{LIO} \cdot x_{LIO}^i \quad \text{ecuación 4}$$

donde: m_{IV} = peso de la muestra impregnada (g), m_{LIO} = peso de la muestra liofilizada, x_{IV}^W = humedad de la muestra impregnada (g agua/g total), x_{LIO}^W = humedad de la muestra liofilizada (g agua/g total), x_{IV}^i = fracción másica del antioxidante i en la muestra impregnada (g i/g total) y x_{LIO}^i = fracción másica del antioxidante i en la muestra liofilizada (g i/g total).

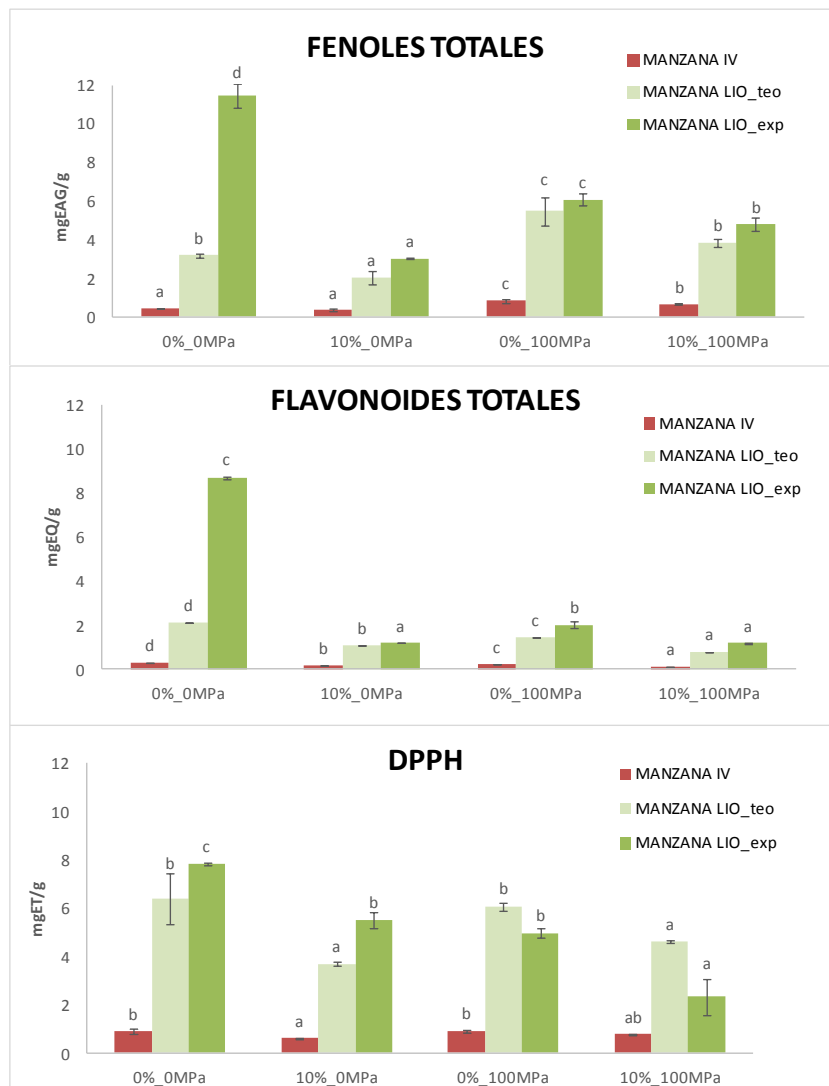


Figura 4.3. Valores teóricos y experimentales de las propiedades antioxidantes en manzana liofilizada. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Como se puede observar, el contenido en antioxidantes de las muestras impregnadas tomó valores mucho menores que el de las muestras liofilizadas, lo que resulta lógico por la pérdida de agua que se produce durante la liofilización.

En el caso de las muestras de manzana impregnadas, solo el contenido en fenoles totales se vio significativamente incrementado con respecto al control (0%_OMP_a) tras la impregnación con el zumo homogeneizado que incluía o no trehalosa en su composición (10%_100MP_a y 0%_100 MP_a). Para entender este hecho cabe tener presente que la homogeneización implica una reducción en el tamaño medio de las partículas del zumo en las que se encuentran retenidos los compuestos fenólicos, permitiendo que éstos entren con mayor facilidad en la matriz sólida durante la etapa de impregnación a vacío (Ortín, 2016).

Analizando las muestras liofilizadas, tanto para el contenido en fenoles totales como en flavonoides totales se obtuvieron valores más elevados de forma experimental que los estimados de forma teórica. Esta diferencia, que resultó mucho más acusada para las muestras impregnadas con el líquido 0%_OMP_a, podría indicar que la extracción de compuestos fenólicos, incluidos los del tipo flavonoides, de las matrices impregnadas no fue tan eficiente como lo fue de las matrices impregnadas y posteriormente liofilizadas. De hecho, la liofilización es una etapa unitaria a menudo incluida en los protocolos de preparación de las muestras de fruta para la correcta extracción de los compuestos antioxidantes (Vasco et al., 2008; Wojdylo et al., 2008). De esta manera se reduce el riesgo de que se produzcan isomerizaciones y otros procesos de deterioro como consecuencia de su elevada actividad enzimática (Antolovich et al., 2000), al mismo tiempo que se favorece la liberación de los compuestos antioxidantes de las estructuras biológicas en las que se encuentran retenidos (Shofian et al., 2011). No se podría afirmar lo mismo para todos los compuestos con actividad antioxidantes, cuyo contenido resultó en unas ocasiones más elevado tras la estimación teórica (muestras impregnadas con los líquidos homogenizados) y en otras ocasiones tras la medida experimental (muestras impregnadas con los líquidos sin homogeneizar).

En la figura 4.4 se muestra la variación en las propiedades antioxidantes (contenido en fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidantes medida por el método DPPH) de las muestras de manzana impregnadas y liofilizadas durante su almacenamiento.

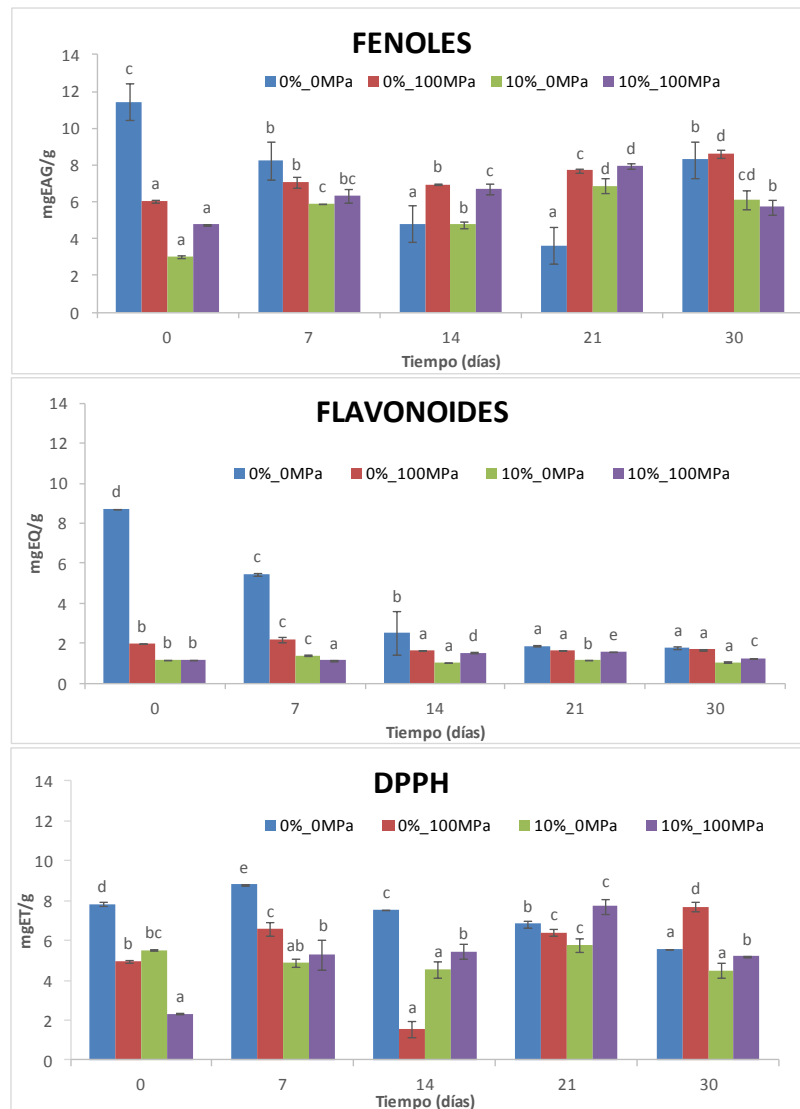


Figura 4.4. Evolución de las propiedades antioxidantes a lo largo del almacenamiento. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor < 0,05).

Se puede observar que a lo largo del almacenamiento no hay una tendencia clara en la evolución de las propiedades antioxidantes, lo que podría ser debido a ligeras variaciones en el contenido en agua de las propias muestras analizadas. En términos generales, las muestras a las que no se le añadió trehalosa ni se les aplicó una presión de homogenización (0%_OMP) experimentaron una notable disminución en el contenido en fenoles totales (especialmente en los del tipo flavonoides), lo que implicó un claro descenso en su capacidad global para secuestrar radicales libres. En los demás casos, el descenso en el contenido en flavonoides no fue tan acusado y el de fenoles totales experimentó un ligero aumento, de manera que la actividad antioxidantes medida por el método DPPH también se vio incrementada.

Para corroborar lo comentado anteriormente y profundizar en el efecto que la composición del líquido de impregnación ejerce sobre las propiedades antioxidantes analizadas, en la figura 4.5 se muestra, para cada componente, el incremento positivo o negativo que se ha producido entre el inicio y el final del almacenamiento con respecto a la cantidad presente a tiempo 0,

expresado en porcentaje. En general, la ganancia de fenoles totales resultó significativamente más elevada (p -valor $< 0,05$) y la pérdida de flavonoides significativamente menor (p -valor $< 0,05$) en el caso de las muestras impregnadas con cualquiera de los líquidos que incluían trehalosa en su composición, pero especialmente en aquellas impregnadas con el líquido que además había sido sometido a una etapa de homogenización (10%_100MPa). En consecuencia, estas muestras presentaron también variaciones positivas y significativamente más elevadas a las de las restantes muestras en el contenido en antioxidantes totales medidos por el método DPPH. Estos resultados podrían ser debidos a que, como consecuencia del efecto protector que la trehalosa ejerce sobre las estructuras biológicas, el tejido de manzana se habría visto menos dañado durante el proceso de liofilización, de manera que los compuestos antioxidantes quedarían menos expuestos a las condiciones adversas que promueven su degradación. Dicho efecto protector podría verse favorecido por la reducción en el tamaño de partícula que implica la aplicación de una etapa de homogenización, lo que facilitaría la entrada de una mayor cantidad de líquido (y de la trehalosa en él disuelta) en la estructura porosa de la manzana durante la etapa de impregnación a vacío.

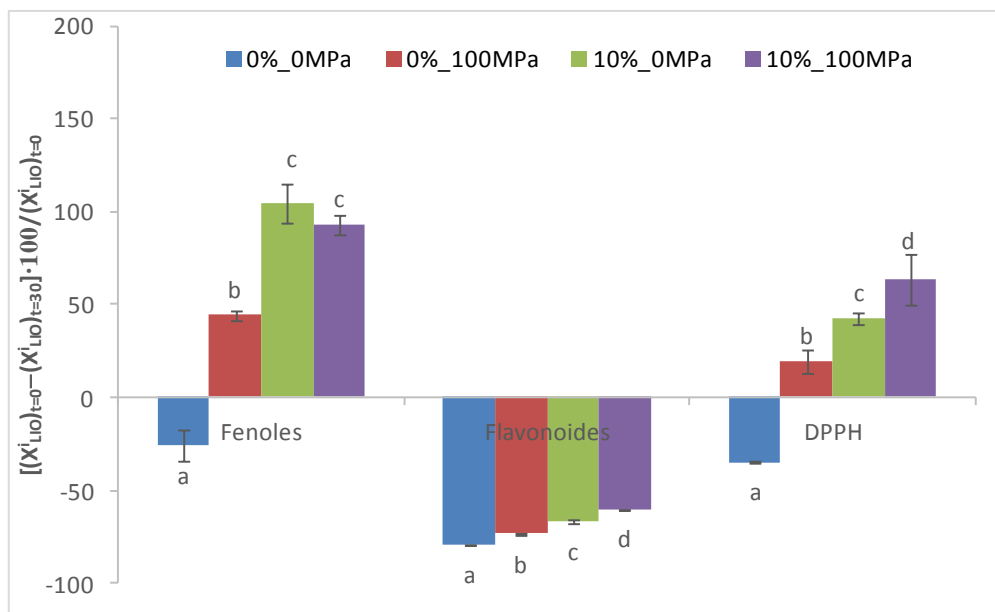


Figura 4.5. Variación neta en el contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante tras 30 días de almacenamiento de las muestras de manzana liofilizadas. Donde $(X_{i,UO})_{t=0}$ es la concentración en base seca del antioxidante i (g i/g sólido seco) en la manzana liofilizada al inicio del almacenamiento y $(X_{i,UO})_{t=30}$ es la concentración en base seca del antioxidante i (g i/g sólido seco) en la manzana liofilizada al final del almacenamiento. Para una misma serie. Letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$).

4.3. Efecto sobre las propiedades ópticas

En la figura 4.6 se muestran las coordenadas cromáticas L^* , a^* , b^* correspondientes a las muestras de manzana impregnada con los diferentes líquidos de impregnación y a las de manzana impregnada y posteriormente liofilizada.

Si tomamos como referencia el color de la manzana fresca medido experimentalmente en las mismas condiciones ($L^* = 72 \pm 2$, $a^* = -3,8 \pm 0,9$ y $b^* = 14,5 \pm 3$), se puede comprobar que el color de las muestras impregnadas resultó similar al de frescas en términos de a^* y b^* , mientras que la coordenada L^* presentó valores ligeramente más bajos. Este hecho resulta lógico teniendo en cuenta que durante la etapa de impregnación a vacío se reemplaza parte del aire ocluido en la estructura porosa del alimento por el líquido externo que lo rodea, de manera que el alimento pasa de tener un aspecto blanquecino y opaco a otro brillante y translúcido. En cuanto al líquido de impregnación se observa que las muestras impregnadas con los líquidos homogenizados a 100 MPa (0%_100MPa y 10%_100MPa) presentaron valores notablemente más elevados para las coordenadas L^* y b^* . Este hecho podría explicarse en términos de la reducción del tamaño de partícula que experimentan los zumos sometidos a un tratamiento de altas presiones (Betoret et al., 2009), lo que facilitaría su entrada en la matriz sólida durante el proceso de impregnación y potenciaría su mayor translucidez y su tonalidad ligeramente más amarillenta.

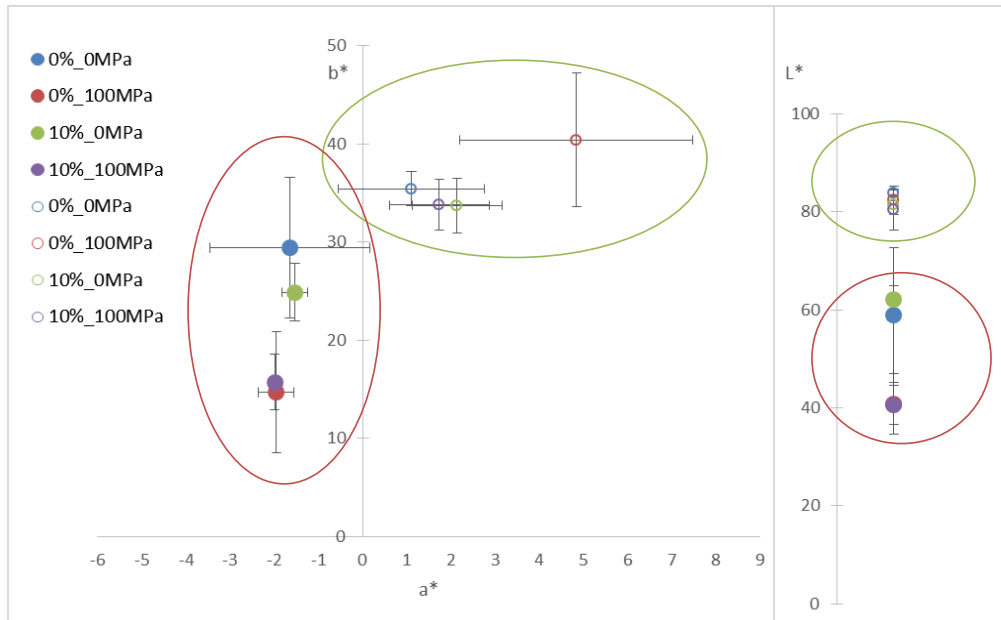


Figura 4.6. Coordenadas de color CIE L^* , a^* y b^* de las muestras de manzana impregnadas con los diferentes líquidos de impregnación (marcador con relleno) y de las muestras de manzana impregnada y posteriormente liofilizada (marcador sin relleno).

Tras la liofilización, las tres coordenadas cromáticas (L^* , a^* y b^*) experimentaron en todos los casos un notable aumento. El aumento en las coordenadas a^* y b^* , probablemente como consecuencia de la concentración de los compuestos responsables del color durante la etapa de la liofilización y las reacciones de oxidación que suceden a lo largo de todo el procesado, supuso la evolución del color de las muestras desde tonos verdosos hacía tonos rojizos. El aumento en la luminosidad (coordenada L^*) tras la liofilización se debe a que, como consecuencia de la congelación y posterior sublimación, los espacios intercelulares que estaban ocupados por líquido en las muestras impregnadas pasan a estar ocupados por aire, adquiriendo el tejido un aspecto más opaco y un color más blanquecino. Entre las muestras

liofilizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas por el hecho de emplear uno u otro líquido de impregnación.

Por otra parte, en la figura 4.7 se muestra la evolución que experimenta el color de las muestras liofilizadas durante los 30 días de almacenamiento en condiciones controladas. A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que el color de las muestras liofilizadas se mantuvo estable durante todo el almacenamiento y, debido al gran tamaño de las barras de error, que las diferencias observadas entre los diferentes tratamientos y/o tiempos de almacenamiento se deben fundamentalmente a la variabilidad de las muestras en términos de color. Los valores obtenidos de diferencia de color a lo largo del almacenamiento no son perceptibles al ojo humano.

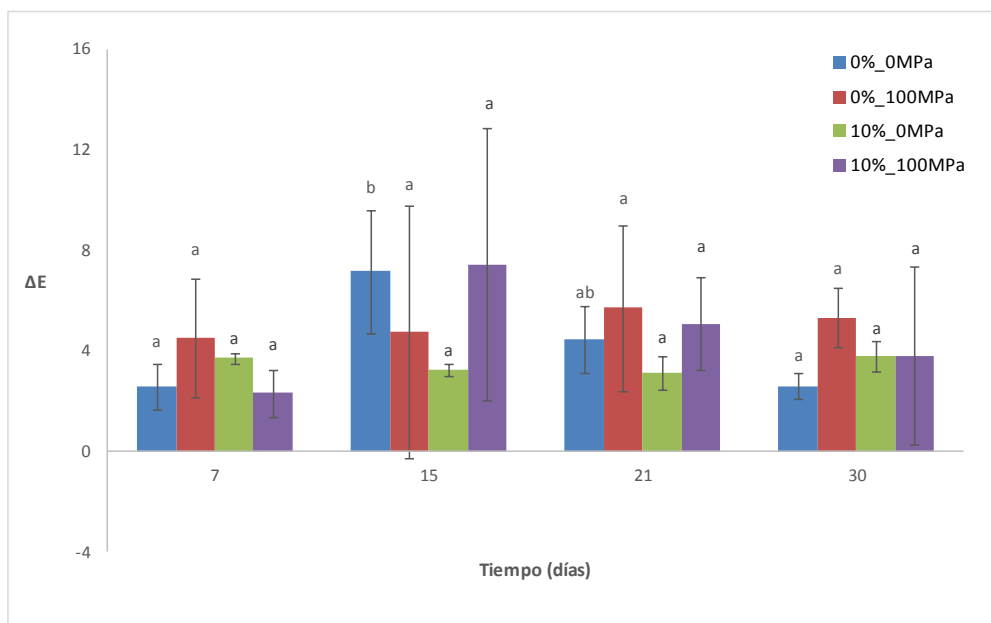


Figura 4.7. Evolución del color global de las muestras liofilizadas durante los 30 días de almacenamiento. Para un mismo líquido de impregnación, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor < 0,05).

4.4. Efecto sobre las propiedades mecánicas.

En primer lugar, en la figura 4.8 se muestra el efecto de la composición del líquido de impregnación y de la aplicación o no de una etapa de liofilización sobre las propiedades mecánicas ($F_{m\acute{a}x}$ en N y $d_{m\acute{a}x}$ en mm) de láminas de manzana.

Como se puede observar, las propiedades mecánicas de las muestras de manzana variaron de forma significativa tras su liofilización, pero de diferente forma en función de la composición del líquido empleado durante la etapa de impregnación a vacío. En general, tanto la fuerza máxima aplicada como la distancia máxima recorrida por el punzón hasta la rotura de las muestras aumentaron significativamente tras la liofilización. En el caso de las rodajas

impregnadas con el líquido 0%_100MPa, el ligero descenso observado en la fuerza máxima necesaria para comprimir la muestra podría deberse a que, como se mostrará más adelante (tabla 4.2), éstas muestras no alcanzaron tras el proceso de liofilización una humedad tan baja como cabría esperar. En cuanto a la distancia máxima recorrida por el punzón hasta la rotura de las muestras, ésta aumentó significativamente en todos los casos tras la liofilización, pero especialmente en el caso de las rodajas impregnadas con el líquido 0%_100MPa. Esto, como se ha comentado anteriormente, sería consecuencia de los valores de humedad más elevados alcanzados tras la liofilización, lo que resulta en muestras más gomosas y menos crujientes.

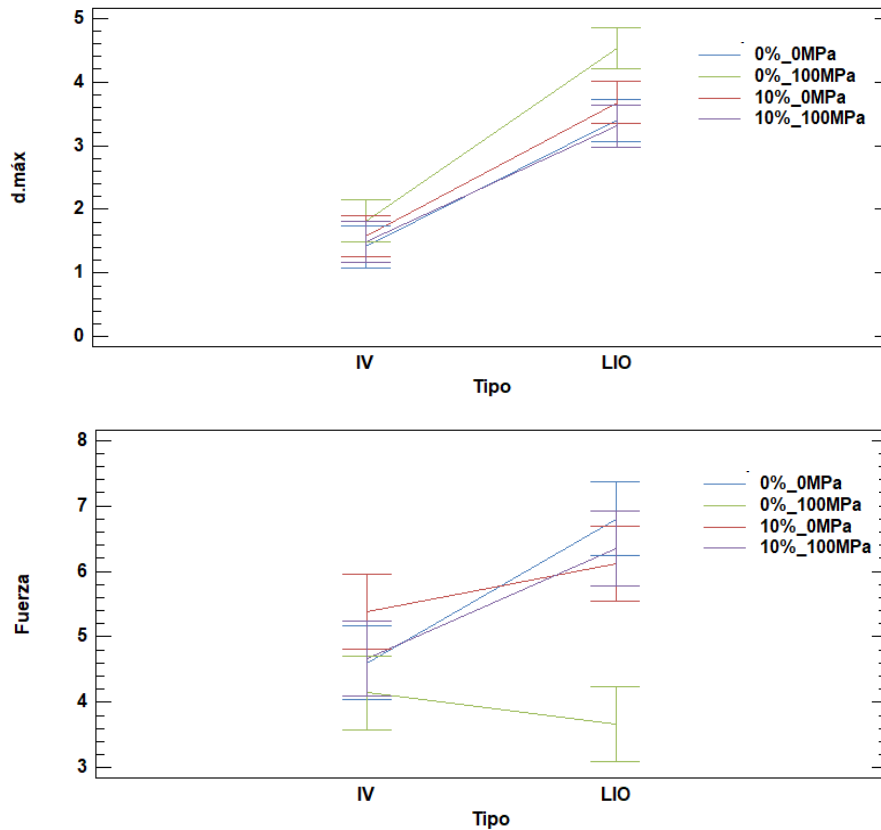


Figura 4.8. Gráfico de interacciones e intervalos LSD resultantes del análisis multifactorial de la varianza llevado a cabo para evaluar el grado de significancia de las variables de proceso (tipo de líquido de impregnación y aplicación o no de una etapa de liofilización) sobre las propiedades mecánicas de láminas de manzana.

Para tener una información más amplia acerca de las propiedades mecánicas de las muestras analizadas, en la figura 4.9 se muestra la forma típica de las curvas que se obtienen tras el ensayo de punción aplicado a láminas de manzana impregnadas con el zumo 10%_0MPa, antes y después del proceso de liofilización. Como se puede comprobar, la forma de la curva obtenida para la muestra impregnada (caracterizada por una deformación previa seguida de múltiples fracturas hasta la rotura) resultó muy similar a la propia de tejidos vegetales frescos y porosos, constituidos por células turgentes y fuertemente unidas. En cambio, en la muestra liofilizada se observa una ligera deformación previa a la fractura en el punto de fuerza máxima.

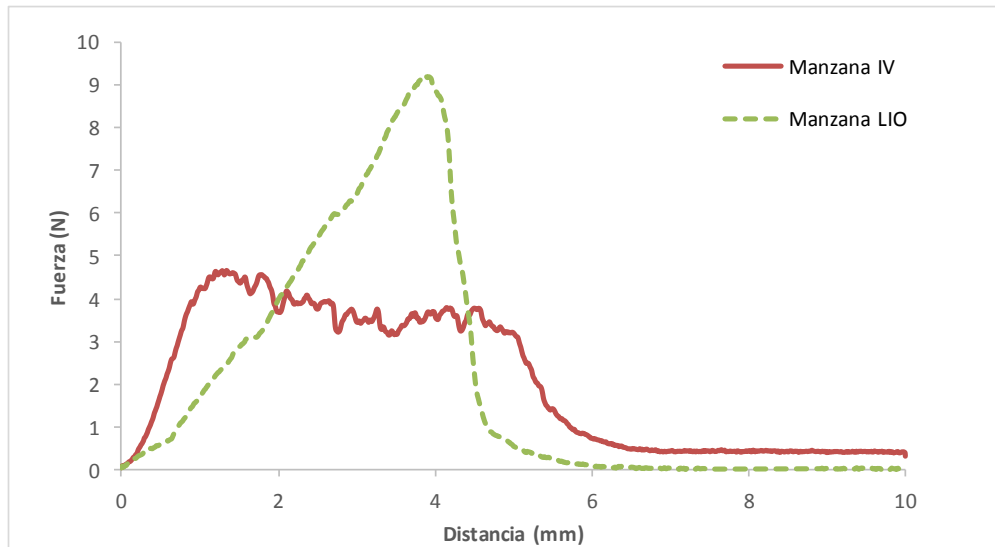


Figura 4.9. Curvas típicas del ensayo de punción de las muestras de manzana impregnadas con el líquido 10%_OMP, antes y después de la etapa de liofilización.

Finalmente en la Tabla 4.2. se muestran, para los cuatro líquidos de impregnación, cómo evolucionan la humedad (x_w), la actividad del agua (a_w) y las propiedades mecánicas ($F_{m\acute{a}x}$ y $d_{m\acute{a}x}$) a lo largo de los 30 días de almacenamiento. Como se puede observar, durante el almacenamiento las muestras experimentaron un ligero aumento tanto en su actividad de agua como en su humedad. Esta variación fue muy similar en todos los casos, con independencia del líquido de impregnación, aunque hubo algunas fluctuaciones entre las muestras debido a la heterogeneidad de las mismas. Aunque no en todos los casos fue así, el aumento en la humedad de las muestras vino acompañado por un descenso en la fuerza máxima y un aumento en la distancia máxima. El que esta tendencia no fuera general pone de manifiesto que las propiedades mecánicas no dependen exclusivamente del contenido en agua de las muestras, sino también de otros muchos factores.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.2. Evolución de la humedad, la actividad del agua y las propiedades mecánicas de las muestras de manzana impregnada y liofilizada a lo largo del almacenamiento. Valores medios \pm desviación estándar.

		0%_OMPa	10%_OMPa	0%_100MPa	10%_100MPa
IV	a_w	0,9851 \pm 0,0007 ^{d_C}	0,9816 \pm 0,0009 ^{d_A}	0,9839 \pm 0,0013 ^{e_{BC}}	0,9827 \pm 0,0002 ^{d_{AB}}
	x_w	0,8670 \pm 0,0008 ^{e_C}	0,8437 \pm 0,0012 ^{e_A}	0,8583 \pm 0,0013 ^{d_B}	0,842 \pm 0,003 ^{e_A}
	F_{máx}	4,6 \pm 1,4 ^{a_A}	5,4 \pm 0,9 ^{a_A}	4,1 \pm 0,9 ^{ab_A}	4,1 \pm 0,4 ^{a_A}
	d_{máx}	1,35 \pm 0,12 ^{a_A}	1,4 \pm 0,3 ^{a_A}	1,42 \pm 0,13 ^{a_A}	1,5 \pm 0,3 ^{a_A}
0 (días)	a_w	0,245 \pm 0,017 ^{bc_B}	0,1850 \pm 0,0013 ^{a_A}	0,265 \pm 0,002 ^{ab_{BC}}	0,266 \pm 0,003 ^{a_C}
	x_w	0,0383 \pm 0,0009 ^{a_A}	0,0460 \pm 0,0008 ^{a_B}	0,0630 \pm 0,0008 ^{a_D}	0,052 \pm 0,002 ^{a_C}
	F_{máx}	6,8 \pm 1,4 ^{b_B}	6,1 \pm 1,1 ^{ab_B}	3,5 \pm 0,5 ^{a_A}	6,3 \pm 0,7 ^{c_B}
	d_{máx}	3,4 \pm 0,6 ^{c_A}	3,7 \pm 0,6 ^{d_A}	4,5 \pm 0,7 ^{d_B}	3,5 \pm 0,3 ^{b_A}
7 (días)	a_w	0,223 \pm 0,008 ^{b_A}	0,258 \pm 0,008 ^{b_B}	0,301 \pm 0,009 ^{c_D}	0,2794 \pm 0,0013 ^{b_C}
	x_w	0,048 \pm 0,002 ^{b_A}	0,052 \pm 0,002 ^{b_A}	0,074 \pm 0,003 ^{bc_B}	0,082 \pm 0,004 ^{d_B}
	F_{máx}	6,4 \pm 0,5 ^{b_C}	6,0 \pm 0,9 ^{a_C}	3,7 \pm 0,6 ^{ab_A}	5,2 \pm 0,6 ^{b_B}
	d_{máx}	3,1 \pm 0,6 ^{bc_A}	3,2 \pm 0,3 ^{bcd_A}	4,8 \pm 1,3 ^{cd_B}	4,6 \pm 0,8 ^{c_B}
15 (días)	a_w	0,194 \pm 0,004 ^{a_A}	0,266 \pm 0,004 ^{b_B}	0,329 \pm 0,013 ^{d_D}	0,2884 \pm 0,0017 ^{bc_C}
	x_w	0,080 \pm 0,002 ^{c_B}	0,058 \pm 0,003 ^{c_A}	0,080 \pm 0,003 ^{c_B}	0,078 \pm 0,008 ^{cd_C}
	F_{máx}	5,6 \pm 0,9 ^{ab_A}	7,7 \pm 1,8 ^{c_B}	6 \pm 2 ^{b_A}	6,7 \pm 0,9 ^{c_{AB}}
	d_{máx}	2,5 \pm 0,7 ^{b_A}	3,5 \pm 0,6 ^{cd_B}	4,2 \pm 0,9 ^{cd_C}	3,6 \pm 0,6 ^{b_{BC}}
21 (días)	a_w	0,187 \pm 0,003 ^{a_A}	0,281 \pm 0,004 ^{c_C}	0,273 \pm 0,002 ^{b_B}	0,2798 \pm 0,0015 ^{b_{BC}}
	x_w	0,046 \pm 0,002 ^{b_A}	0,064 \pm 0,002 ^{d_{BC}}	0,061 \pm 0,004 ^{a_B}	0,070 \pm 0,003 ^{bc_C}
	F_{máx}	6,5 \pm 0,7 ^{b_B}	7,4 \pm 1,1 ^{bc_B}	4,9 \pm 0,9 ^{ab_A}	5,1 \pm 0,3 ^{ab_A}
	d_{máx}	2,5 \pm 0,5 ^{b_A}	2,86 \pm 0,08 ^{bc_A}	3,8 \pm 0,2 ^{bc_B}	3,5 \pm 0,3 ^{b_B}
30 (días)	a_w	0,258 \pm 0,018 ^{c_A}	0,260 \pm 0,014 ^{b_A}	0,258 \pm 0,004 ^{a_A}	0,289 \pm 0,002 ^{c_B}
	x_w	0,059 \pm 0,003 ^{c_A}	0,057 \pm 0,004 ^{bc_A}	0,073 \pm 0,002 ^{b_B}	0,062 \pm 0,003 ^{b_A}
	F_{máx}	-	6,1 \pm 1,1 ^{a_A}	6,8 \pm 1,7 ^{c_A}	7,1 \pm 1,8 ^{c_A}
	d_{máx}	-	2,8 \pm 0,8 ^{b_A}	3,6 \pm 0,3 ^{b_A}	3,6 \pm 1,1 ^{b_A}

a, b, c,... letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas con el procesado y el tiempo de almacenamiento, con un nivel de confianza del 95%.

A, B, C,... para cada uno de los parámetros analizados, letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas debidas al tipo de líquido empleado durante la etapa de impregnación a vacío, con un nivel de confianza del 95%.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. El zumo de clementina comercial rectificado con bicarbonato de sodio hasta pH 6 y enriquecido con 5 g/L de extracto de levadura es un medio óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063).
2. Para aumentar el recuento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* en los líquidos de impregnación es aconsejable añadir un 10% en peso de trehalosa o aplicar una etapa de homogeneización a 100 MPa, pero combinar los dos tratamientos.
3. La impregnación a vacío es una técnica adecuada para incorporar probióticos a la matriz estructural de la manzana, en mayor o menor medida dependiendo de los recuentos que presente el líquido de impregnación.
4. La liofilización es una técnica adecuada para la estabilización de las láminas de manzana impregnadas con el probiótico. Sin embargo, durante el almacenamiento de las muestras liofilizadas se produce una pérdida importante en la viabilidad del microorganismo, lo que se ve favorecida por la adición de un 10% de trehalosa en peso al líquido de impregnación y/o la homogeneización del mismo a 100 MPa.
5. La liofilización aumenta notablemente el contenido en compuestos con actividad antioxidante presente en las láminas de manzana. En este caso, el hecho de añadir un 10% de trehalosa en peso al líquido de impregnación y/o la homogeneización del mismo a 100 MPa sí que garantiza la estabilidad de estos compuestos e incluso aumenta su concentración durante los 30 días que duró el almacenamiento.
6. El color de las muestras de manzana impregnada resulta ligeramente diferente en función de la adición de un 10% de trehalosa en peso al líquido de impregnación y/o de la homogeneización del mismo a 100 MPa; sin embargo, estas diferencias debidas al hecho de emplear uno u otro líquido de impregnación se atenúan tras la aplicación de una etapa de liofilización.
7. Las propiedades mecánicas de las muestras analizadas se ven básicamente afectadas por la aplicación o no de una etapa de liofilización y por el contenido en agua alcanzado al final de la misma.
8. Ni las propiedades ópticas ni las mecánicas de las muestras de manzana liofilizada experimentaron cambios notables durante los 30 días que duró su almacenamiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. (1980). Association of Official Analytical Chemist Official Methods of Analysis. Washington.

ANDERSEN, L.(1998). Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: Proceedings of 44th ICoMST, 826–827.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D.(2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst Critical Review*, 125: 989-1009.

ASHEWELL, M. (2002) *Concepts of Functional Foods*. ILSI - International Life Sciences Institute, Brussels.Bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 41: 103-125.

BETORET, E. (2007). Efecto de la presión de homogeneización sobre el tamaño de partícula y las propiedades funcionales de los zumos cítricos. Tesis de máster. Universitat Politècnica de València.

BETORET, E.; BETORET, N.; ARILLA, A.; BENNÁR, M.; BARRERA, C.; CODOÑER, P.; FITO, P. (2012). No invasive methodology to produce a probiotic low humid apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. *Journal of Food Engineering*, 110(2): 289-293.

BETORET, E.; BETORET, N.; CARBONELL, J.V.; FITO, P. (2009). Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering*, 92(1): 18-23.

BETORET, E.; SENTANDREU, E.; BETORET, N.; CODOÑER-FRANCH, P.; VALLS-BELLÉS, V.; FITO, P. (2012b). Homogenization pressures applied to citrus juices manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering*, 111: 28-33.

BETORET, N.; PUENTE, L.; DÍAZ, M.J.; PAGÁN, M.J.; GARCÍA, M.J.; GRAS, M.L.. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal Food Engineering*, 56: 273–277.

BOIRIVANT, M.; STROBER, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*, 23(6): 679-692.

BORTOLI, N.; LEONARDI, G.; CIANCIA, E.; MERLO, A.; BELLINI, M.; COSTA, F.; ROSSI, M. (2007). Helicobacter pylori eradication: a randomized prospective study of triple therapy versus triple therapy plus lactoferrin and probiotics. *The American journal of gastroenterology*, 102(5): 951-956.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science Technology*, 28(1): 25-30.

CATS, A.; KUIPERS, E.; BOSSCHAERT, M.; POST, R.; VANDERBROUCKE-GRAUJLS, C.; KUSTERS J. (2003). Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17: 429.

CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. (1989). Critical reviews in food science and nutrition. *Food Science*. 28: 348–400.

CHIRALT, A.; FITO, P.; ANDRÉS, A.; BARAT, J.M.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; MARTÍNEZNAVARRETE, N. (1999). Vacuum impregnation: a tool in minimally processing of foods. *Processing of foods: quality optimization and process assessment*. CRC Press: 341-356.

CONRAD, P.B.; MILLER, D.P.; CIELENSKI, P.R.; DE PABLO, J.J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41(1): 17-24.

DAVIS, C.D.; MILNER, J.A. (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10): 743-752.

EUZEBY, J.P. (2013). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2): 590-592.

FITO, P. (1994). Modelling vacuum osmotic dehydration of food. *Journal of Food Engineering*, 22: 313-328.

FITO, P.; CHIRALT, A.; BARAT, J.M.; ANDRÉS, A.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; MARTÍNEZNAVARRETE, N. (2001a). Vacuum impregnation for development of new dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 49(4): 297-302.

FITO, P.; PASTOR, R. (1994). Non-diffusional mechanisms occurring during vacuum osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 21(4): 513-519.

FULLER, R.(1989). *Probiotics in man and animals*. *J Appl Bacteriol*, 66: 365-378.

GÓMEZ, P.L.; WELTI-CHANES, J.; ALZAMORA, S.M. (2011). Hurdle technology in fruit processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2: 447-465.

GÓMEZ, S.; NOVA, E.; MARCOS, A.(2010). Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. *Dirección General de Salud Pública y Alimentación*, 88-102.

GRAHAM, D.Y.; YAMAOKA, Y. (2000). Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter*, 5(1): S3-S9.

GUPTA, V.; GARG, R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3): 202-9.

HAMILTON-MILLER, J.M. (2003). The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 360-366.

HEKMAT,S.; SOLTANI, H.; REID, G. (2009). Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as functional food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2): 293-296.

HOLZAPPEL, WH.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD J.H.J. (1998). Overview of Innovative. *Food Science and Emerging Technologies*, 10: 293-296.

KIM, H.S.; GILLILAND, S.E. (1983): *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *Journal of Dairy Science*, 66: 959-966.

KIM, H.S.; GILLILAND, S.E. (1984): Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilisation in humans. *Journal of Dairy Science*, 67: 1-6. 54.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONNAPARTE, C.; REUTER, G. (1998). Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2): 103-125.

- KOLARS, J.C.; LEVITT, M.D.; AOUJI, M.; SAVIANO, D.A. (1984): Yogurt – an autodigesting source of lactose. *New England Journal of Medicine*, 310: 1-3.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. (1965) *Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms*. *Science*, 147: 747-748.
- LINS R.D.; PEREIRA, C.S.; HUNENBERGER, P.H. (2004). Trehalose-protein interaccion in aqueous solution. *Proteins*, 55: 177-186.
- LIONG, M. (2008). Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutricion reviews*, 66(4): 192-202.
- LOPES, D.; NUNES, C.; CRISTINA, M.; MARTINS, L.; SARMENTO, B.; REIS, S. (2014). Eradication of *Helicobacter pylori*: past, present and future. *Journal of Controlled Release*, 189: 169-186.
- LÓPEZ-BREA, M.; DOMINGO, D. (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Rev Esp Quimioterap*, 20(2): 170-181.
- LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A.; ZBARSKY, V.; DATLA, K.; DEXTER, D.; ARUOMA, O. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanicins in Muritian black teas. *Food Research International*, 38: 357-367.
- MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80: 1031-1037.
- OHTAKE, Y.; WANG, J. (2011) Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6): 2020-2053.
- OOI, L.G.; LIONG, M.T. (2010). Cholesterol-lowering effects of Probiotics and Prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6): 2499-2522.
- ORTÍN, M. (2016). Efecto de la trehalosa y la presión de homogeneización sobre las propiedades funcionales de zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. Trabajo Final de Grado, Universitat Politècnica de València.
- OUWEHAND, AC.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 279-289.
- OXMAN, T.; SHAPIRA, M.; KLEIN, R.; AVAZOV, N.; RABINOWITZ, B. (2001): Oral administration of *Lactobacillus* induces cardioprotection. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7(4): 345-354.
- PARSONNET, J. (1998). *Helicobacter pylori*. *Infecti. Dis. Clin. North Am*, 12(18): 185-197.
- PATRIGNANI, F.; VANNINI, L.; LEROY, S.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. (2009) Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 26–31.
- POKUSAeva, K.; FITZGERALD, G.F.; Y VAN SINDEREN, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6(3): 285–306.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43: 1–7.

- REID, G.; BEUERMAN, D.; HEINEMANN, C.; BRUCE, A.W. (2001b): Effect of oral probiotic *Lactobacillus* therapy on the vaginal flora and susceptibility to urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, (in press).
- SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I.; PERMAN, J.A.; YOLKEN, R.H. (1994): Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *The Lancet*, 344: 1046-9.
- SALMINEN, S., VON WRIGH, A. (1993). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker Inc., 211-254.
- SANDERS, M.E.; HUIS IN'T VELD (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 293-315.
- SANZ, Y.; COLLADO, M.C.; DALMAU, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientación para el consumo. *Acta pediatr Esp*, 61: 476-482
- SGOURAS, D.; MARAGKOUidakis, P.; PETRAKI, K.; MARTINEZ-GONZÁLEZ, B.; ERIOTOU, E.; MICHPOULOS, S.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; MENTIS, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 518-526.
- SHAH, N.P.(2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*. 55: 46–53.
- SHAH, N.P.(2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17: 1262–1277.
- SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8: 279–284.
- SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science Emerging. Technologies*, 8: 279–284.
- SHOFIAN, N.M.; HAMID, A.A.; OSMAN, A.; SAARI, N.; ANWAR, F.; DEK, M.S.P., HAIRUDDIN, R. (2011). Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Science*, 12(7): 4678-4692.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. , 16: 144-158.
- SUAREZ, JE. (2013). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (1):38-41.
- SYKORA, J.; VALECKOVA, K.; AMLEROVA, J.; SIALA, K.; DEDEK, P.; WATKINS, S.; VARVAROVSKA, J.; STOZICKY, F.; PAZDIORA, P., SCHWARZ, J. (2005). Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN- 114 001 and the eradication of *H.pylori* in children. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 39: 692-698.
- TAYLOR, D. E.; BLASER, M. (1991). The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiologic Reviews*, 13: 42-59.

TAYLOR, D. N.; PARSONNET, J. (1995). Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. In *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 551-564.

TUORILA, H.; CARDELLO, A.V. (2002). Consumer responses to an off/flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Quality and Preference*, 13: 561–569.

UCHIDA, M.; KURAKAZU, K. (2004). Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. *Journal of Pharmacology Science*, 96: 84-90.

VASCO, C.; RUALES, J., KAMAL-ELDIN, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111: 816-823.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; LASKOWSKY, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15): 6520-6530.

YANG, Y.; CHUANG, C.; YANG, H.; LU, C.; SHEU, B. (2012). *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori*-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. *BMC Microbiology*, 12-38.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. (2004). Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology*, 42: 315 – 318.