

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## **Efecto del pH y de las altas presiones de homogeneización sobre el crecimiento y resistencia a la digestión *in vitro* de una cepa de *Lactobacillus reuteri* en zumo de lulo**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Autora: María Emilia Ferrando Felix  
Tutora académica: Noelia Betoret Valls  
Cotutora académica: Lucía Seguí Gil  
Directora experimental: Leidy Indira Hinestroza Córdoba

Curso académico 2020 - 2021

VALENCIA, JULIO 2021

## RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica cuya prevalencia en la población mundial ha aumentado durante las últimas décadas. Para combatirla es esencial aumentar el consumo de frutas en la dieta, puesto que estas contienen compuestos bioactivos beneficiosos para prevenir la obesidad. La ingesta de microorganismos con efecto probiótico como *Lactobacillus reuteri* también ayuda a reducir la grasa corporal, además de modificar la microbiota intestinal.

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), también conocido como “naranjilla”, es una variedad de tomate procedente de Colombia cuya pulpa contiene aminos bioactivos con efecto potencial antihipertensivo. Debido a que el fruto contiene muchas semillas, la fruta se consume habitualmente en forma de zumo.

Las altas presiones de homogenización (HPH) constituyen un tratamiento no térmico cuya aplicación a zumos de frutas ha despertado un enorme interés sobre todo por su capacidad para alargar la vida útil sin afectar las propiedades sensoriales y aumentar la estabilidad de la nube. Al mantener la pulpa en suspensión, el zumo resultante conserva una mayor parte de la fibra y de los componentes bioactivos de la fruta fresca, resultando en un producto más saludable.

La obtención de un zumo de lulo con alto contenido en pulpa y microorganismos probióticos sería interesante para tratar tanto la hipertensión como la obesidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que produce la corrección del pH del zumo de lulo a 5,5 y 6 y la aplicación de un tratamiento HPH (100 y 150 MPa) sobre las propiedades fisicoquímicas (pH, °Brix, densidad, color, tamaño de partícula) y antioxidantes (contenido en fenoles y flavonoides totales, y capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS) del zumo. Además, se determinó la viabilidad, el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes y la resistencia a la digestión gastrointestinal *in vitro* de una cepa de *Lactobacillus reuteri* incorporada a los zumos homogeneizados y no homogeneizados a los dos pHs considerados.

Las mejores condiciones para el desarrollo del probiótico se dieron en aquellos zumos corregidos a pH 5,5 y homogeneizados a 100 MPa. Las propiedades fisicoquímicas variaron en función del crecimiento microbiano, al igual que las propiedades antioxidantes. Todos los zumos que se sometieron a la digestión gastrointestinal simulada alcanzaron una viabilidad mínima de  $10^7$  UFC/mL al final del ensayo, por lo que se garantizaron las condiciones necesarias para que el probiótico considerado pudiera ejercer efectos beneficiosos en la flora intestinal del huésped.

**Palabras clave:** zumo de lulo, *Lactobacillus reuteri*, probiótico, altas presiones de homogeneización, digestión *in vitro*

## RESUM

L'obesitat és una infermetat crònica prevalença de la qual ha augmentat en la població mundial durant les últimes dècades. Per a combatre-la és essencial augmentar el consum de fruites a la dieta, ja que estes presenten composts bioactius beneficiosos per a prevenir l'obesitat. La ingesta de microorganismes amb efecte probiòtic també ajuda a reduir la grassa corporal, a més de modificar la microbiota intestinal.

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), també coneguda com "naranjilla", és una varietat de tomaca procedent de Colòmbia, la polpa de la qual conté amines bioactives amb efecte potencial antihipertensiu. Degut a que la fruita conté moltes llavors, es consumeix habitualment en forma de suc.

Les altes pressions d'homogeneïtzació (HPH) constitueixen un tractament no tèrmic i la seua aplicació en suc de fruites ha despertat un enorme interès, sobretot per la seua capacitat d'allargar la vida útil sense alterar les propietats sensorials i augmentar l'estabilitat del núvol. Al mantindre la polpa en suspensió, el suc conserva una major part de la fibra i els components bioactius de la fruita fresca, resultant en un producte més saludable.

L'obtenció d'un suc de lulo amb un alt contingut en polpa i microorganismes probiòtics seria interessant per a tractar tant l'obesitat com la hipertensió. L'objectiu d'este treball va ser avaluar l'efecte que produeix la correcció del pH del suc de lulo a 5,5 i 6 i l'aplicació d'un tractament HPH (100 i 150 MPa) sobre les propietats fisicoquímiques (pH, °Brix, densitat, color, tamany de partícula) i antioxidants (contingut total de fenols i flavonoides i capacitat antioxidant per DPPH i ABTS) del suc. A més, es va determinar la viabilitat, l'efecte sobre les propietats fisicoquímiques i antioxidants i la resistència a la digestió gastrointestinal *in vitro* d'una soca de *Lactobacillus reuteri* incorporada als suc homogeneïtzats i no homogeneïtzats als dos pHs considerats. Les millors condicions per al desenvolupament del probiòtic es van donar en aquells suc corregits a pH 5,5 i homogeneïtzats a 100 MPa. Les propietats fisicoquímiques variaren en funció del creixement microbià, a l'igual que les propietats antioxidants. Tots els suc que es van sotmetre a la digestió gastrointestinal simulada aconseguiren una viabilitat mínima de  $10^7$  UFC/mL al final de l'assaig, pel que es garantiren les condicions necessàries perquè el probiòtic considerat pogués exercir efectes beneficiosos a la flora intestinal de l'hoste.

**Paraules clau:** suc de lulo, *Lactobacillus reuteri*, probiòtic, altes pressions d'homogeneïtzació, digestió *in vitro*

## ABSTRACT

Obesity is a chronic disease whose prevalence in the world's population has increased in recent decades. To combat it, it is essential to increase the consumption of fruits in the diet, as they contain bioactive compounds that are beneficial in preventing obesity. The intake of microorganisms with a probiotic effect such as *Lactobacillus reuteri* also helps to reduce body fat, as well as modifying the intestinal microbiota.

Lulo (*Solanum quitoense* Lam.), also known as "naranjilla", is a variety of tomato from Colombia whose pulp contains bioactive amines with antihypertensive potential. Because the fruit contains many seeds, the fruit is commonly consumed in juice form.

High homogenization pressure (HPH) is a non-thermal treatment whose application to fruit juices has attracted considerable interest mainly because of its ability to extend shelf life without affecting sensory properties and to increase cloud stability. By keeping the pulp in suspension, the resulting juice retains more of the fiber and bioactive components of the fresh fruit, resulting in a healthier product.

Obtaining a lulo juice with high pulp content and probiotic microorganisms would be interesting for treating both hypertension and obesity. The aim of this work was to evaluate the effect of pH correction of lulo juice to p5.5 and 6 and the application of a HPH treatment (100 and 150 MPa) on the physicochemical properties (pH, °Brix, density, color, particle size) and antioxidant properties (total phenol and flavonoid content and antioxidant capacity by DPPH and ABTS) of the juice. In addition, the viability, the effect on physicochemical and antioxidant properties and the resistance to gastrointestinal digestion *in vitro* of a *Lactobacillus reuteri* strain incorporated into homogenized and non-homogenized juices at the two pHs considered were determined.

The best conditions for probiotic development were found in those juices corrected to pH 5.5 and homogenized at 100 MPa. Physicochemical properties varied as a function of microbial growth, as did the antioxidant properties. All juices that underwent simulated gastrointestinal digestion reached a minimum viability of  $10^7$  CFU/mL at the end of the trial, thus ensuring the necessary conditions for the probiotic under consideration to exert beneficial effects on the host's intestinal flora.

**Key words:** lulo juice, *Lactobacillus reuteri*, probiotic, high pressure homogenization, *in vitro* digestion

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1 Materias primas y obtención del zumo de lulo</b> .....	<b>6</b>
<b>3.2 Preparación del zumo probiótico</b> .....	<b>6</b>
<b>3.3 Determinaciones analíticas de los zumos</b> .....	<b>6</b>
3.3.1 Determinación del pH .....	6
3.3.2 Determinación de los sólidos solubles .....	6
3.3.3 Determinación de la densidad .....	7
3.3.4 Determinación de las propiedades ópticas .....	7
3.3.5 Determinación del tamaño de partícula.....	7
3.3.6 Determinación de la pulpa suspendida y la turbidez.....	8
3.3.7 Determinación de las propiedades antioxidantes .....	8
<b>3.4 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i></b> .....	<b>10</b>
<b>3.5 Recuento de viables</b> .....	<b>12</b>
<b>3.6 Análisis estadístico</b> .....	<b>12</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>13</b>
<b>4.1 Efecto del pH y de las presiones de homogeneización sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del zumo de lulo</b> .....	<b>13</b>
4.1.1 pH, °Brix, densidad y pulpa suspendida y turbidez .....	13
4.1.2 Tamaño de partícula.....	15
4.1.3 Propiedades ópticas: color .....	16
4.1.4 Propiedades antioxidantes .....	18
<b>4.2 Crecimiento de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925 en los zumos de lulo a diferentes pH y presiones de homogeneización. Efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes.</b> .....	<b>20</b>
4.2.1 Crecimiento de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925 .....	20
4.2.2 pH, °Brix, densidad y pulpa suspendida y turbidez.....	20
4.2.3 Tamaño de partícula.....	21
4.2.4 Propiedades ópticas: color .....	23
4.2.5 Propiedades antioxidantes .....	24
<b>4.3 Efecto de la digestión gastrointestinal sobre el contenido en células vivas en el zumo de lulo a diferentes pH sin homogeneizar y homogeneizado a diferentes presiones.</b> .....	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fruto del lulo ( <i>Solanum quitoense</i> Lam.) .....	1
<b>Figura 2.</b> Diagrama de flujo del ensayo de digestión <i>in vitro</i> realizado .....	11
<b>Figura 3.</b> Efecto del pH y de las presiones de homogeneización sobre las curvas de distribución del tamaño de partícula en zumo de lulo .....	16
<b>Figura 4.</b> Contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante medida por DPPH y ABTS en zumos de lulo sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 .....	18
<b>Figura 5.</b> Viabilidad de <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925 después de 24 horas de fermentación en zumos de lulo no homogeneizados y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 .....	20
<b>Figura 6.</b> Efecto del pH y de las presiones de homogeneización sobre las curvas de distribución del tamaño de partícula en zumo de lulo tras 24 horas de fermentación ...	22
<b>Figura 7.</b> Contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante medida por DPPH y ABTS en zumos de lulo tras 24h de fermentación sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 .....	25
<b>Figura 8.</b> Contenido en células vivas de los zumos de lulo probióticos a pH 5,5 y pH 6 sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa al inicio, durante y al final de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentración de las sales utilizadas en las disoluciones madre de los fluidos simulados para las diferentes fases. Además, esta tabla también incluye la cantidad necesaria en mL que se deben incorporar para obtener 500mL de los fluidos simulados (Minekus <i>et al.</i> ,2014) .....	11
<b>Tabla 2.</b> pH, °Brix, densidad, pulpa suspendida y turbidez del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH 5,5 y 6 .....	13
<b>Tabla 3.</b> Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH 5,5 y 6 .....	15
<b>Tabla 4.</b> Propiedades ópticas del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 .....	17
<b>Tabla 5.</b> pH, °Brix, densidad, pulpa suspendida y turbidez del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 e inoculado con <i>Lactobacillus reuteri</i> CECT 925 .....	21
<b>Tabla 6.</b> Tamaño de partícula en $\mu\text{m}$ después de 24 horas de fermentación de los zumos de lulo sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 .....	22
<b>Tabla 7.</b> Propiedades ópticas después de 24 horas de fermentación de los zumos de lulo no homogeneizados y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 .....	23
<b>Tabla 8.</b> Diferencia de color entre los zumos de lulo a pH 5,5 y 6 no homogeneizados y homogeneizados a 100 y 150 MPa antes de inocular y después de la fermentación ...	24

# 1. Introducción

La obesidad se ha convertido, en la actualidad, en una patología crónica cuya prevalencia es elevada en muchos países del mundo (WHO, 2021). Esta enfermedad se caracteriza por el aumento y la acumulación de grasa corporal debido al desequilibrio producido entre las calorías consumidas y las calorías gastadas, suponiendo un riesgo para la salud y limitando la calidad de vida de aquellos que la padecen (Moreno, 2012). En el año 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó la obesidad como un gran problema de salud pública y como una epidemia global, puesto que esta patología presenta efectos adversos sobre la presión arterial, el colesterol, los triglicéridos y la resistencia a la insulina, pudiendo generar enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 e incluso síndrome metabólico (Mahmood *et al.*, 2020).

De acuerdo con la OMS, la prevalencia de la obesidad se suele medir mediante el Índice de Masa Corporal (IMC), definido como el peso en kilogramos dividido entre la altura en metros al cuadrado ( $\text{kg/m}^2$ ). La prevalencia de la enfermedad empezó a aumentar en la población mundial a partir de los años 80 con el marketing e introducción al mercado de alimentos con alto contenido en azúcares y grasas saturadas, junto con la disminución de la actividad física (Moreno, 2012; Martí *et al.*, 2021). A día de hoy, la prevalencia de la obesidad se ha triplicado con respecto a las cifras de los años 80. Esto supone que la población ha aumentado por década 1  $\text{kg/m}^2$  (Aguilera *et al.*, 2019).

Una de las recomendaciones que la OMS propone para la prevención de la obesidad es aumentar el consumo de frutas y verduras frescas. Esto se debe a que su consumo contribuye al descenso de triglicéridos en sangre, además de aumentar la ingesta de fibra y la sensación de saciedad (Parra *et al.*, 2015). Las frutas, en concreto, son alimentos que contienen fibra, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos. Muchos de estos compuestos, agrupados bajo el término de fitoquímicos, contribuyen a que la incidencia de enfermedades no transmisibles disminuya (Kurkoski *et al.*, 2005; Vasco *et al.*, 2008). Recientemente, se ha prestado mucha atención al efecto de los flavonoides sobre la obesidad y los trastornos metabólicos asociados. Se ha revelado que pueden inducir la hidrólisis de lípidos neutrales de los depósitos de lípidos en los tejidos adiposo y el hígado. También, inhiben el transporte intestinal de glucosa y fructosa. De hecho, las catequinas y antocianinas reducen significativamente el peso de los tejidos adiposos; el ácido gálico reduce la proliferación de preadipocitos mediante inducción de la apoptosis celular; el ácido cafeico y el ácido clorogénico pueden controlar la adipogénesis al promover la lipólisis y la apoptosis de los adipocitos (Prashar & Patel, 2020). La quercetina se considera inhibidor de enzimas productoras de inflamación como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), de interleuquinas proinflamatorias como la IL-1, -6 y -8 y de la peroxidación de lípidos (Shatylo *et al.*, 2021; Ghaffari & Roshanravan, 2020).

Además, el consumo de fibra retarda y/o disminuye la liberación de energía en una dieta excesiva mediante diferentes mecanismos: ralentiza el proceso de digestión, inhibe la absorción de macronutrientes en la superficie intestinal debido a que establece interacciones con algunos componentes y los insolubiliza, tiene una elevada capacidad para retener agua aumentando la sensación de saciedad. Otros estudios muestran los

beneficios de la fermentación de la fibra insoluble en el colon. Esta fermentación origina, entre otros metabolitos, ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), cada uno de los cuales ejerce efectos fisiológicos favorables y únicos (Yacyshyn & Yacyshyn, 2019).

Algunas especies de microorganismos son otro de los ingredientes que se ha demostrado que pueden tener un efecto positivo en la prevención de enfermedades no transmisibles. Se ha comprobado que el consumo de bacterias lácticas puede disminuir la grasa corporal debido a un efecto sobre la microbiota y sobre los procesos de digestión y disponibilidad de nutrientes (Wang *et al.*, 2018). Los microorganismos que son administrados en las cantidades adecuadas y ejercen efectos beneficiosos en la salud del huésped se denominan microorganismos probióticos (Hill *et al.*, 2014). Una de las bacterias lácticas con carácter probiótico es *Lactobacillus reuteri*. Esta bacteria se halla de manera natural en el cuerpo humano: en el tracto gastrointestinal, el tracto urinario, la piel e incluso la leche materna. *L. reuteri* es capaz de sintetizar moléculas antimicrobianas, como ácidos orgánicos, etanol y reuterina. Gracias a estos compuestos antimicrobianos, se inhibe la colonización de microorganismos patógenos y se mejora la microbiota del huésped (Mu *et al.*, 2018). Está comprobado que *Lactobacillus reuteri* presenta un efecto potencial para combatir la obesidad (Fåk *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2015; Mu *et al.*, 2018). Las bacterias lácticas, en general, se suelen emplear en matrices lácteas para que lleven a cabo la fermentación láctica, pero estos productos pueden no resultar adecuados para personas que padezcan obesidad porque los lácteos presentan un alto contenido en colesterol o para colectivos intolerantes a la lactosa o a las proteínas de la leche (Jordá, 2019). Como alternativa, se ha estudiado en gran medida en los últimos años, su incorporación a zumos de frutas (Szutowska, 2020). En el desarrollo de estos productos es necesario asegurar que poseen un contenido suficiente de células viables en el momento de su consumo y que estas llegan al intestino en una cantidad superior a  $10^6$  UFC, resistiendo el proceso de digestión gastrointestinal.

Estos hechos han aumentado el interés de la industria alimentaria por producir alimentos más saludables a partir de frutas y hortalizas. Se han puesto en marcha diferentes estrategias dirigidas a la reducción del contenido en azúcar en los zumos envasados, la sustitución del azúcar blanco por otros menos refinados o por edulcorantes naturales, el desarrollo de nuevos productos a partir de frutas y hortalizas y también, la aplicación de tecnologías que mejoren las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos procesados.

En la actualidad, el consumidor exige que los productos procesados a partir de alimentos de origen vegetal mantengan o consigan una calidad similar a los productos frescos, además de que estos sean seguros. Los tratamientos térmicos tradicionales aplicados a los zumos de frutas, como la pasteurización, provocan la pérdida de ciertos compuestos bioactivos y alteran la calidad sensorial del producto. Por ello, está aumentando el interés en la aplicación de tecnologías no térmicas de conservación como los ultrasonidos, los pulsos eléctricos, las presiones hidrostáticas altas o las altas presiones de homogenización (HPH). Se trata de técnicas capaces de conservar e incluso alargar la vida útil de los alimentos a la vez que se mantiene la calidad nutricional y sensorial (Kubo *et al.*, 2021). En la técnica HPH, se fuerza al alimento líquido a que pase a través de un hueco o pequeña abertura, causando tensiones mecánicas

(cizallamientos) y aumentando levemente la temperatura a medida que se aplica mayor presión. Como consecuencia, la estructura y las propiedades del fluido se modifican: disminuye el tamaño de partícula y se alcanza una mayor estabilidad de las partículas suspendidas, facilitando así operaciones como la mezcla y la emulsión (Mesa *et al.*, 2020).

Además, esta técnica se aplica ampliamente en zumos de frutas por su capacidad de alargar la vida útil y producir zumos de alta calidad mediante la alteración de la microestructura del alimento, disminuyendo el tamaño de partícula para que la pulpa del zumo de fruta permanezca en suspensión y rompiendo las paredes celulares para ayudar a liberar compuestos fenólicos al medio (Quan *et al.*, 2020). Al mantener la pulpa en suspensión, el zumo resultante conserva una mayor parte de la fibra y de los componentes bioactivos de la fruta fresca, resultando en un producto más saludable.

Por otra parte, diferentes investigaciones han permitido evaluar las potencialidades de algunas frutas tropicales, muchas de ellas con una elevada producción en América Latina. En torno a estas frutas y a nivel regional, se han desarrollado diferentes procesos tecnológicos y una gran variedad de productos útiles para la industria alimentaria. No obstante, hoy en día es poca la información sobre muchas especies tropicales que podrían incluirse como nuevas alternativas para el desarrollo de alimentos saludables con propiedades funcionales. Sin embargo, su consumo en el mercado internacional ha aumentado a raíz de conocer sus valores terapéuticos y nutricionales, además del sabor y aromas característicos que presentan (Forero *et al.*, 2015). Son diversos los países productores de frutas tropicales, entre ellos se encuentra Colombia. Actualmente, este país es considerado como uno de los principales productores de frutas tropicales el mundo (Baquero *et al.*, 2016).

Una de las frutas tropicales más producidas en Colombia es el lulo (*Solanum quitoense* Lam). También denominada “naranjilla”, es una variedad de tomate altamente consumida en el país debido a su valor nutritivo y a la calidad de los zumos elaborados a partir del fruto (Pulido *et al.*, 2008). Es una fruta climatérica que se puede encontrar en el sur de Colombia y Ecuador, en áreas húmedas de los bosques de los Andes (Forero *et al.*, 2015). El lulo presenta un sabor ácido y un aroma agradable, su piel (exocarpio) adquiere una coloración anaranjada cuando alcanza el punto óptimo de maduración y normalmente se encuentra cubierta de pequeñas vellosidades que se desprenden fácilmente. La estructura interna del lulo (mesocarpio y endocarpio) es muy similar a la estructura que presenta el tomate: forma 4 compartimentos separados por tabiques membranosos y su pulpa es de color amarillo-verde pálido (Figura 1), muy jugosa y ácida (Gancel *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2018). Contiene muchas semillas en su interior y, debido a esto, raramente se consume en fresco, con lo que, como alternativa de consumo, se elaboran bebidas y jaleas (Forero *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Fruto del lulo (*Solanum quitoense* Lam)

El lulo, además de ser una fruta rica en fibra, vitaminas (B1, B2, B3, A y C), minerales (P, Ca, Fe) y en ácidos orgánicos (especialmente ácido cítrico) (Gancel *et al.*, 2008; Forero *et al.*, 2015), presenta en su pulpa dos compuestos amargos; la espermidina N1,N4,N8-tris(dihidrocafeílo) y la espermidina N1,N8-bis(dihidrocafeílo), que actúan como aminas bioactivas, dotando a la pulpa del lulo propiedades funcionales para tratar la hipertensión, por lo que se puede proponer esta fruta como alimento funcional (Forero *et al.*, 2016).

## 2. Objetivos

En base a todo lo expuesto anteriormente, resulta interesante desarrollar un zumo de lulo con alto contenido en pulpa y microorganismos probióticos que tenga efecto potencial contra la hipertensión y la obesidad. El presente trabajo forma parte de la investigación que se está desarrollando en ese sentido, y se ha planteado con los siguientes objetivos:

- ❖ Determinar el efecto de las altas presiones de homogenización (100 y 150 MPa) sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de un zumo de lulo con pH rectificado a 5,5 y 6 que pueda ser utilizado como materia prima en el desarrollo de un zumo con probióticos.
- ❖ Estudiar la viabilidad y los niveles de crecimiento de *Lactobacillus reuteri* en los zumos sin homogenizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa y en las dos condiciones de pH consideradas.
- ❖ Determinar las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de los zumos con *Lactobacillus reuteri*, y la resistencia del microorganismo a las diferentes etapas del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Materias primas y obtención del zumo de lulo

El zumo se obtuvo a partir de lulo fresco (*Solanum quitoense*) en el punto óptimo de maduración adquirido del “Mercat Central de Valencia”. Los frutos enteros se lavaron con agua corriente, se licuaron en una licuadora (Phillips Advance Collection Standmixer 800W, 2L) y se filtraron con un tamiz de acero inoxidable de 500 µm. Después del tamizado, los zumos se sometieron a un tratamiento de altas presiones de homogeneización (HPH) a 100 y 150 MPa, empleando un homogeneizador de alta presión a escala de laboratorio (Gea Niro Soavi-Panda Plus 2000, Parma, Italia). A continuación, tanto el zumo no homogeneizado como los homogeneizados a 100 y 150 MPa se pasteurizaron durante 3 minutos a 72 °C. Una vez finalizado el tratamiento térmico, los zumos se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su posterior inoculación o análisis.

Como cepa probiótica se utilizó *Lactobacillus reuteri* CECT 925 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Parc Científic de la Universitat de València). La cepa liofilizada se incubó en medio MRS estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) durante 24 h a 37 °C y se mantuvo en refrigeración.

### 3.2 Preparación del zumo probiótico

Con el fin de asegurar un crecimiento adecuado de *Lactobacillus reuteri* CECT 925 en zumo de lulo y de acuerdo con estudios previos, se rectificó el pH del zumo hasta pH 5,5 y 6 utilizando bicarbonato sódico. Además, se añadió extracto de levadura (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) en una cantidad de 5 g/L. La cepa fue transferida del caldo MRS a los zumos (zumo no homogeneizado, homogeneizado a 100 MPa y homogeneizado a 150 MPa) en una cantidad de 4 mL/L. Posteriormente, los zumos se incubaron en estufa a 37 °C durante 24 h.

### 3.3 Determinaciones analíticas de los zumos

Los zumos de lulo homogeneizados y no homogeneizados se analizaron antes de ser inoculados y después de la fermentación. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 3.3.1 Determinación del pH

Los valores de pH se obtuvieron utilizando un pH-metro digital (Mettler Toledo Inlab, Schwerzenbach, Suiza), calibrando el equipo previamente a los análisis mediante disoluciones tampón a pHs 7 y 4. Los resultados se obtuvieron mediante una lectura directa.

#### 3.3.2 Determinación de los sólidos solubles

Los sólidos solubles de los zumos se determinaron con un refractómetro (Abbe Atago BT, Nar T3, Tokio, Japón), previamente calibrado con agua destilada y con el termostato a 20 °C, mediante la lectura directa de sus índices de refracción en °Brix.

### 3.3.3 Determinación de la densidad

Se determinó la densidad de los zumos con el método del picnómetro, utilizando un picnómetro de líquidos a temperatura ambiente y empleando agua destilada como líquido de referencia.

### 3.3.4 Determinación de las propiedades ópticas

Las propiedades ópticas se determinaron con un espectrocolorímetro (MINOLTA, CM-3600D, Osaka, Japón), empleando como referencia el iluminante D65, el observador 10° y, finalmente, excluyendo el brillo natural que pueda emitir la cubeta. El equipo, antes de los análisis, se calibró sobre un fondo de color negro y otro de color blanco. Las muestras se introdujeron en cubetas de plástico con una capacidad de 25 mL y de 2 cm de espesor. Se trabajó en el espacio de color CIE L\*a\*b\* con el fin de obtener las coordenadas correspondientes al color, donde L\* es la luminosidad, a\* es la cromaticidad en el eje del rojo (+) al verde (-) y b\* es la cromaticidad en el eje del amarillo (+) al azul (-). A partir de estas 3 coordenadas, se puede hallar el valor de la tonalidad ( $h^*_{ab}$ ) (ecuación 1) y el Croma ( $C^*_{ab}$ ) (ecuación 2). Por último, se calculó la diferencia de color ( $\Delta E^*$ ) (ecuación 3) entre las muestras fermentadas y no fermentadas.

$$h^*_{ab} = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (1)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2)$$

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

### 3.3.5 Determinación del tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo con el equipo Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK). Dicho equipo está provisto de una fuente de luz azul con una longitud de onda de unos 470 nm y de rango de medida entre 0,02 y 200  $\mu\text{m}$ .

Las muestras se diluyen con agua desionizada bajo agitación hasta alcanzar una obscuración del 8% aproximadamente. Los índices de refracción del zumo (nube) y del dispersante (agua) fueron, respectivamente, 1,5 y 1,33. Cada dilución se analizó 10 veces y se tomó la absorbancia de las partículas de la nube como 0,01.

Para la caracterización de la distribución del tamaño de partícula de todos los zumos basamos en los siguientes parámetros: los diámetros medios basados en el volumen ( $D[4,3]$ , ecuación 4) y el área ( $D[3,2]$ , ecuación 5) y en los percentiles  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$ . Estos percentiles representan los diámetros por debajo de los cuales el 10%, el 50% y el 90% de las partículas se encuentran dentro de la distribución.

$$D[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (4)$$

$$D[3,2] = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (5)$$

Donde:

ni: número de partículas y di: diámetro de dichas partículas

### 3.3.6 Determinación de la pulpa suspendida y la turbidez

Se siguió la metodología descrita por Betoret (2011), según la cual la pulpa suspendida de un zumo equivale al volumen del precipitado que se obtiene después de centrifugar 10 mL de muestra a 366 g (para la pulpa inestable) o 3000 g (para la pulpa estable) a 25 °C durante 10 minutos. Para ello, utilizamos una centrífuga (Selecta “Medifriger BL-S”). Por otro lado, la turbidez de las muestras corresponde a la transmitancia del sobrenadante obtenido después de la centrifugación, medida a 650 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Zeta U/Vis, Loughborough, UK).

### 3.3.7 Determinación de las propiedades antioxidantes

Para la determinación de las propiedades antioxidantes del zumo de lulo, en primer lugar, se realizó una extracción previa de los antioxidantes. Esta extracción es común para todas las determinaciones antioxidantes específicas.

Para llevar a cabo la extracción de los antioxidantes, se añadieron 2 g de zumo a 20 mL de una disolución de metanol-agua 80:20 (v/v) y se dejó en agitación durante 1 hora en oscuridad. Luego, la mezcla resultante se centrifugó (Selecta “Medifriger BL-S”) durante 5 minutos a una temperatura de 20 °C y a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante resultante. Todas las determinaciones se llevaron a cabo empleando dicho sobrenadante como extracto.

#### 3.3.7.1 Fenoles totales

La determinación de los fenoles totales se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 2003). Este método se basa en la medida de la intensidad del color azul que adquiere el reactivo de Folin-Ciocalteu tras reducirse al entrar en contacto con los compuestos fenólicos de las muestras, a una longitud de onda de 760 nm.

Para ello, se introdujeron en una cubeta, con una capacidad de 3 mL, 0,125 mL de extracto, 0,125 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y 0,5 mL de agua bidestilada. La mezcla resultante se dejó reaccionar en oscuridad durante 6 minutos. Una vez transcurrido este breve período de tiempo, se añadieron 1,25 mL de una disolución de carbonato de sodio concentrado al 7% (v/v) y 1 mL de agua bidestilada. La mezcla resultante se dejó reaccionando en oscuridad y, 90 minutos después, se midió su absorbancia a 760 nm. El equipo empleado para la medida fue un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Zeta U/Vis, Loughborough, UK).

Como referencia se empleó un blanco, en el que se sustituyó el extracto por la misma cantidad de agua bidestilada.

Los resultados obtenidos se compararon con una recta patrón de ácido gálico (pureza  $\geq$  98%, Sigma Aldrich) obtenida empleando concentraciones de entre 0 y 500 ppm. Estos resultados, finalmente, se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG/g).

### 3.3.7.2 Flavonoides totales

Para hallar el contenido en flavonoides totales en los zumos se aplicó el método colorimétrico del cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) descrito por Lamaison & Carnet (1990) pero adaptado por Luximon-Ramma *et al.* (2005). La finalidad de este método es medir la intensidad del color amarillo que se forma cuando el cloruro de aluminio reacciona con los compuestos fenólicos presentes en las muestras, a una absorbancia de 368 nm.

En una cubeta de 3 mL de capacidad, se adicionaron 1,5 mL tanto de extracto como de una disolución de cloruro de aluminio en metanol concentrado al 2% (m/v). La mezcla resultante se dejó reaccionar en oscuridad durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia resultante a una longitud de onda de 368 nm empleando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Zeta U/Vis, Loughborough, UK).

Como referencia se utilizó un blanco, en el que se sustituyó el extracto por la misma cantidad de agua bidestilada.

Una vez obtenidos los resultados, estos se compararon con una recta patrón de quercetina (pureza  $\geq 95\%$ , Sigma Aldrich) obtenida empleando concentraciones entre 0 y 400 ppm. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de muestra (mg EQ/g).

### 3.3.7.3 DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante por DPPH se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Kuskoski *et al.* (2005) y Stratil *et al.* (2006), con algunas modificaciones. Este método se basa en la reducción del radical DPPH<sup>+</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) debido a los antioxidantes que se encuentran presentes en la muestra. Dicha reducción provoca que este radical, originalmente de color morado, cambie a amarillo claro (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Previamente a los análisis, se preparó en oscuridad una disolución de DPPH (pureza  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich) en metanol hasta alcanzar unos valores de absorbancia de 0,70 a una longitud de onda de 517 nm. Luego, en una cubeta con una capacidad de 3 mL, se mezclaron 0,1 mL de extracto, 0,9 mL de metanol y 2 mL de la disolución DPPH/metanol. La medida de la absorbancia de las muestras se llevó a cabo en 3 tres ocasiones distintas: a los 0, 30 y 60 minutos de reacción, a una longitud de onda de 517 nm, utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Zeta U/Vis, Loughborough, UK).

Como referencia se utilizó un blanco, en el que se sustituyó el extracto por la misma cantidad de agua bidestilada.

Todos los resultados obtenidos se compararon con una recta patrón de trólox (pureza  $\geq 97\%$ , Sigma Aldrich) obtenida utilizando concentraciones de 0 a 400 ppm. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trólox por gramo de muestra (mg ET/g).

#### 3.3.7.4 ABTS

Para determinar la capacidad antioxidante mediante ABTS se siguió la metodología propuesta por Re *et al.* (1999). El catión ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfúrico), al secuestrar los antioxidantes presentes en la muestra, se decolora: cambia de un color turquesa a un tono incoloro.

Antes de llevar a cabo la prueba, fue necesario generar el catión ABTS<sup>+</sup>. Se preparó una disolución de este ácido (7 mM, pureza ≥ 99%) con persulfato potásico (2,45 mM, pureza ≈ 99,99%) en agua bidestilada. La disolución resultante se dejó en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 16 horas. Una vez este catión se liberó, se diluyó en tampón fosfato preparado a partir de fosfato sódico monobásico 0,2 M y fosfato sódico dibásico (pureza ≈ 99,99%, Sigma Aldrich) hasta que alcanzó una absorbancia de 0,70 leída a una longitud de onda de 734 nm. Alcanzada la absorbancia deseada, inmediatamente, se mezclaron en una cubeta con capacidad para 3 mL, 0,1 mL de extracto y 2,9 mL de la mezcla ABTS<sup>+</sup> diluida y se midió la absorbancia a los 0, 3 y 7 minutos de reacción a una longitud de onda de 734 nm, utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Helios Zeta U/Vis, Loughborough, UK).

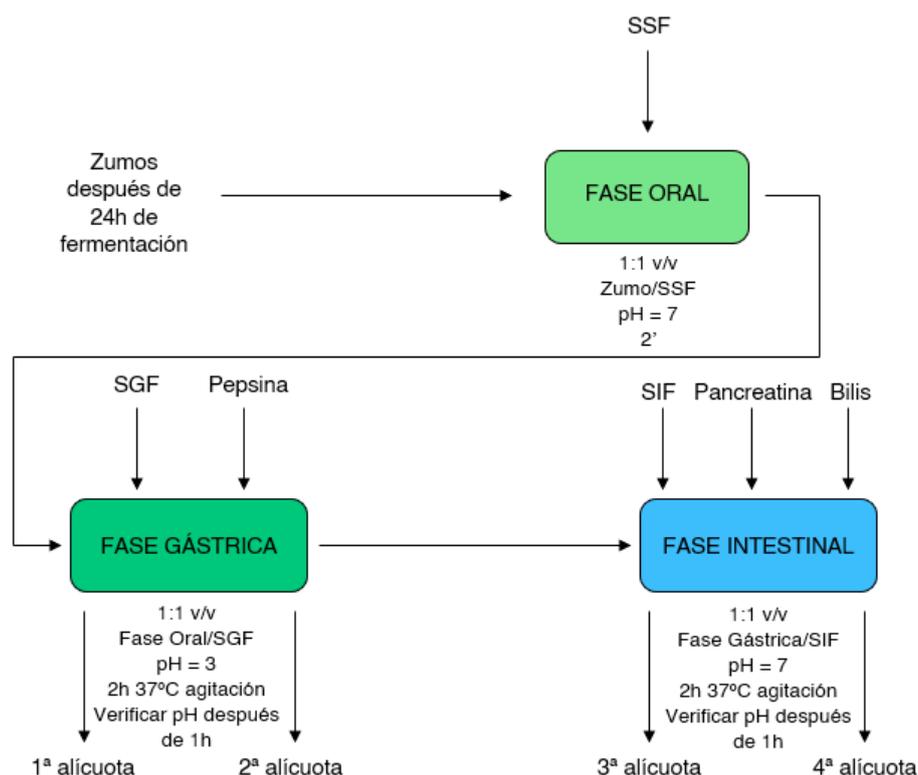
Como referencia se utilizó un blanco, en el que se sustituyó el extracto por la misma cantidad de agua bidestilada.

Los resultados obtenidos se compararon con una recta patrón de trólox (pureza ≥ 97%, Sigma Aldrich), obtenida utilizando concentraciones de 0 a 400 ppm. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de trólox por gramo de muestra (mg ET/g).

#### **3.4 Digestión gastrointestinal *in vitro***

Con el objetivo de estudiar la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* CECT 925 a lo largo de la digestión, los zumos de lulo probióticos se sometieron a una digestión gastrointestinal *in vitro*, siguiendo el protocolo estandarizado propuesto por Minekus *et al.* (2014).

A continuación, en la Figura 2, se muestra el diagrama de flujo seguido en este ensayo:



**Figura 2.** Diagrama de flujo del ensayo de digestión *in vitro* realizado para este estudio

Donde SSF: *Simulated Salivary Fluid*; SGF: *Simulated Gastric Fluid*; SIF: *Simulated Intestinal Fluid*.

En la Tabla 1 se muestran las sales empleadas y los volúmenes necesarios de estas para preparar todas las disoluciones madre de los fluidos simulados.

**Tabla 1.** Concentración de las sales utilizadas en las disoluciones madre de los fluidos simulados para las diferentes fases. Además, esta tabla también incluye la cantidad necesaria en mL que se deben incorporar para obtener 500mL de los fluidos simulados (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

Las enzimas utilizadas en la digestión *in vitro* fueron pepsina porcina en la fase gástrica y pancreatina porcina en la fase intestinal. La cantidad empleada de estas enzimas para las diferentes etapas fue calculada en función de la actividad enzimática que presentaban ambas. La fase intestinal, además, cuenta con bilis porcina.

Para el ajuste del pH en las diferentes fases y para la verificación y corrección entre etapas, se empleó NaOH (1 M) y HCl (6 M).

Tal y como se indica en la Figura 2, para estudiar con detalle la viabilidad de *Lactobacillus reuteri*, se tomaron un total de 4 alícuotas a lo largo de la digestión simulada: la primera, al inicio de la fase gástrica; la segunda, al final de la fase gástrica; la tercera, al inicio de la fase intestinal y, por último, la cuarta alícuota, al final de la fase intestinal.

### **3.5 Recuento de viables**

Para el recuento de *Lactobacillus reuteri* en cada uno de los zumos de lulo después de fermentar y durante las digestiones *in vitro*, se utilizó el método de la dilución seriada en agua peptonada (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) y posteriormente una siembra en placas de Petri con agar MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España). Las placas se incubaron en una estufa durante 24 horas a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Transcurrido ese tiempo, se contó el número de colonias y se estimó, aproximadamente, las unidades formadoras de colonia (UFC) por mL de muestra.

### **3.6 Análisis estadístico**

Para analizar estadísticamente los resultados obtenidos se utilizó el *software* Statgraphics Centurion XVIII. Se realizaron estudios de las varianzas (ANOVA) simples y multifactoriales para apreciar diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, empleando un nivel de confianza del 95%.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1 Efecto del pH y de las presiones de homogeneización sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del zumo de lulo

#### 4.1.1 pH, °Brix, densidad y pulpa suspendida y turbidez

En la Tabla 2 se muestran los valores de Brix, densidad, pulpa suspendida y turbidez tanto a 366 g como a 3000 g de los zumos de lulo a diferentes pH, no homogenizados y homogenizados a las diferentes presiones.

**Tabla 2.** pH, Brix, densidad, pulpa suspendida y turbidez del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH 5,5 y 6.

	Sin HPH		100 MPa		150 MPa	
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
<b>pH</b>	5,53 (0,01)	6,04 (0,01)	5,52 (0,01)	6,12 (0,01)	5,51 (0,01)	6,21 (0,01)
<b>°Brix</b>	8,33 (0,12) <sup>bc</sup>	8,97 (0,06) <sup>e</sup>	8,43 (0,12) <sup>c</sup>	8,67 (0,15) <sup>d</sup>	8,07 (0,06) <sup>a</sup>	8,17 (0,06) <sup>ab</sup>
<b>ρ (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,048 (0,011) <sup>a</sup>	1,055 (0,007) <sup>a</sup>	1,071 (0,015) <sup>a</sup>	1,062 (0,011) <sup>a</sup>	1,061 (0,017) <sup>a</sup>	1,05 (0,03) <sup>a</sup>
<b>% Pulpa 366g</b>	2,79 (0,17) <sup>b</sup>	3,3 (0,3) <sup>c</sup>	2,8 (0,3) <sup>b</sup>	2,28 (0,14) <sup>a</sup>	2,34 (0,08) <sup>a</sup>	2,24 (0,03) <sup>a</sup>
<b>Transmitancia 366g</b>	14 (2) <sup>ab</sup>	14 (3) <sup>ab</sup>	14 (2) <sup>b</sup>	12,66 (0,12) <sup>ab</sup>	12 (2) <sup>a</sup>	23 (2) <sup>c</sup>
<b>% Pulpa 3000g</b>	1,13 (0,03) <sup>b</sup>	1,35 (0,11) <sup>c</sup>	1,41 (0,07) <sup>c</sup>	1,34 (0,10) <sup>c</sup>	1,07 (0,06) <sup>b</sup>	0,82 (0,06) <sup>a</sup>
<b>Transmitancia 3000g</b>	51,3 (0,6) <sup>b</sup>	49,2 (0,5) <sup>a</sup>	64 (2) <sup>d</sup>	54,7 (0,5) <sup>c</sup>	54,6 (0,6) <sup>c</sup>	74 (2) <sup>e</sup>

Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de tres medidas. Superíndices diferentes (<sup>a,b,c,d,...</sup>) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

El zumo de lulo presenta un pH de 3, así que fue necesario aumentarlo con bicarbonato sódico para que el microorganismo pudiera crecer. La adición de este componente provocó una mayor cantidad de sólidos solubles totales en las muestras. Además, se puede apreciar que aquellos zumos cuyo pH se ajustó a 6, presentaron una cantidad ligeramente mayor en sólidos solubles totales respecto a aquellos zumos que se ajustaron a pH 5,5 debido a que se empleó mayor cantidad de bicarbonato sódico.

El contenido en sólidos solubles totales, además, varió en función del tratamiento de homogeneización que las muestras habían recibido previamente. Los zumos tratados a 150 MPa presentaron un menor contenido en sólidos solubles que los zumos homogeneizados a 100 MPa, y estos presentaron menos sólidos solubles que los zumos no homogeneizados.

Cabe destacar que el contenido en azúcares en los zumos de lulo puede variar en función del fruto del que se parte. Además, durante el tamizado, se elimina una parte considerable del fruto, y con ella, muchos sólidos solubles se pierden (Martínez, 2017; Hinestroza-Córdoba *et al.*, 2021).

Respecto a la densidad de los zumos, la rectificación del pH no afectó de manera significativa a los resultados obtenidos, aunque sí que se observa un ligero aumento tras aplicar tratamientos de homogeneización. Aun así, la variabilidad de los valores de densidad entre todas las muestras es tan baja que no se ha apreciado ninguna significación estadística.

En relación con el contenido en pulpa y la transmitancia a las dos velocidades de centrifugación, puede observarse un mayor porcentaje de pulpa a 366 g y una mayor transmitancia a 3000 g. La menor velocidad de centrifugación permite sedimentar las partículas de mayor tamaño y menor estabilidad dejando en suspensión las partículas de menor tamaño. Estas sedimentan a 3000 g aumentando considerablemente la transmitancia del sobrenadante.

Tanto el pH como la presión de homogeneización tienen un efecto significativo sobre la pulpa suspendida y la turbidez a las dos velocidades de centrifugación. Sin embargo, la forma en la que las HPH afectan ambas variables depende del pH del zumo. A pH 5,5 la velocidad de centrifugación de 366 g no permite detectar los cambios que la aplicación de 100 MPa provoca en la pulpa suspendida y la turbidez. Sin embargo, al aumentar la velocidad de centrifugación sí que se detecta un aumento en el porcentaje de pulpa sedimentada y en la transmitancia del sobrenadante. La aplicación de una HPH de 150 MPa sí que induce cambios que ya son detectados a las dos velocidades de centrifugación. Estos cambios implican tanto una disminución del porcentaje de pulpa como de la transmitancia. Parece ser que los cambios inducidos por la presión de 100 MPa se producen sobre la pulpa más estable y por ello requieren de una mayor velocidad de centrifugación para ser detectados. El hecho de que estos cambios provoquen un aumento en el porcentaje de pulpa recuperado a 3000 g nos hace pensar que están relacionados con una disminución en la estabilidad de la nube del zumo. Sin embargo, cuando se aplica la presión de 150 MPa el porcentaje de pulpa disminuye y la transmitancia del sobrenadante también, reflejando un aumento en la estabilidad de la nube del zumo.

A pH 6 el efecto del tratamiento de HPH es más acusado siguiendo la misma tendencia que a pH 5,5 cuando la presión es de 100 MPa pero disminuyendo el porcentaje de pulpa y aumentando la transmitancia cuando la presión es de 150 MPa, si bien, también en ese caso, los cambios pueden asociarse con un aumento en la estabilidad de la nube del zumo. Las partículas que permanecen en suspensión pueden ser lo suficientemente pequeñas como para permitir un mayor paso de luz, confirmando así el aumento de la transmitancia.

Una de las principales aplicaciones de las altas presiones de homogeneización en zumos de frutas es conseguir la estabilización de la pulpa y que esta permanezca en suspensión en vez de sedimentar (Quan *et al.*, 2020). En un estudio realizado por Betoret *et al.* (2009) analizando la transmitancia en zumos de mandarina, se observó que, a medida que aumenta la presión del tratamiento de homogeneización, aumenta también la turbidez de los zumos. Welti-Chanes *et al.* (2009) observaron el mismo efecto en zumo de naranja. En otros casos, y como consecuencia de cambios químicos y de la mayor superficie de contacto entre las partículas de menor tamaño que

se generan con la aplicación de las altas presiones de homogenización, cabe la posibilidad de que estas se agreguen y precipiten con mayor facilidad, disminuyendo la estabilidad de la nube del zumo (Kubo *et al.*, 2013; Augusto *et al.*, 2012b). La disminución del porcentaje de pulpa que se observa a la presión de 150 MPa en el zumo de lulo permite descartar este fenómeno.

#### 4.1.2 Tamaño de partícula

En la Tabla 3 se muestran los resultados del tamaño de partícula de los zumos en función del pH y del tratamiento de homogeneización que se les ha aplicado.

**Tabla 3.** Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH 5,5 y 6.

	Sin HPH		HPH: 100 MPa		HPH: 150 MPa	
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
<b>D[4,3]</b>	234 (10) <sup>e</sup>	220 (8) <sup>d</sup>	83 (2) <sup>c</sup>	80,1 (0,9) <sup>c</sup>	69,68 (1,15) <sup>b</sup>	56,80 (1,12) <sup>a</sup>
<b>D[3,2]</b>	76,5 (1,3) <sup>e</sup>	76,3 (1,1) <sup>e</sup>	31,4 (1,1) <sup>d</sup>	29,58 (0,12) <sup>c</sup>	27,6 (0,5) <sup>b</sup>	20,8 (0,2) <sup>a</sup>
<b>d<sub>10</sub></b>	62,71 (0,95) <sup>e</sup>	64,1 (0,9) <sup>d</sup>	14,4 (0,8) <sup>c</sup>	13,83 (0,15) <sup>c</sup>	12,0 (0,3) <sup>b</sup>	8,86 (0,14) <sup>a</sup>
<b>d<sub>50</sub></b>	176 (3) <sup>d</sup>	169 (2) <sup>d</sup>	69 (2) <sup>c</sup>	65,1 (0,8) <sup>c</sup>	59,0 (1,1) <sup>b</sup>	41,4 (0,5) <sup>a</sup>
<b>d<sub>90</sub></b>	465 (27) <sup>d</sup>	420 (28) <sup>c</sup>	172 (3) <sup>b</sup>	170 (2) <sup>b</sup>	144 (2) <sup>a</sup>	128 (3) <sup>a</sup>

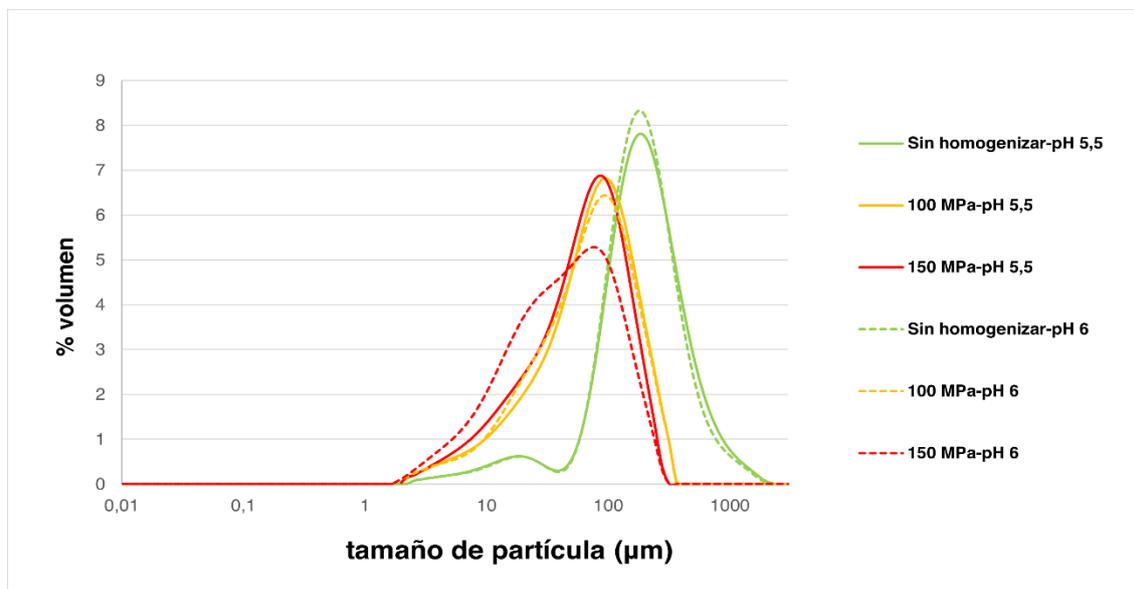
Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de cinco medidas. Superíndices diferentes (<sup>a,b,c,d,...</sup>) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor < 0,05).

Tal y como se observa en la tabla, los valores del diámetro medio de las partículas en función del volumen (D[4,3]) y en función del área (D[3,2]) van disminuyendo a medida que aumenta la presión de homogeneización aplicada: las muestras no homogeneizadas presentan un mayor tamaño de partícula que las muestras homogeneizadas a 100 MPa y estas presentan un tamaño de partícula superior al de los zumos en los que se aplicó una presión de homogeneización de 150 MPa.

Los percentiles  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$  presentan un comportamiento similar a los diámetros D[4,3] y D[3,2]. A mayor presión de homogeneización, mayor descenso de los diámetros característicos.

El pH al cual se ajustaron los zumos para el estudio también resultó ser un factor significativo a la hora de la determinación del tamaño de partícula de las muestras fundamentalmente en las muestras homogeneizadas a 150 MPa. Los zumos ajustados a pH 5,5 presentaron un mayor tamaño de partícula que las muestras ajustadas a pH 6. Podría ocurrir que a pH 6 la aplicación del tratamiento de homogenización favoreciera reacciones de hidrólisis en los compuestos glucosídicos de naturaleza ácida presentes en el zumo. Estos resultados son similares a los obtenidos por Martínez (2017) y por Hinestroza-Córdoba *et al.* (2021).

Los efectos comentados y sobre todo el efecto del pH a la presión de 150 MPa se pueden observar mejor en las curvas de distribución (Figura 3).



**Figura 3.** Efecto del pH y de las presiones de homogeneización sobre las curvas de distribución del tamaño de partícula en zumo de lulo.

Cabe destacar que las curvas de distribución son monomodales con un único pico y una distribución similar y estrecha (bajo SPAN). No obstante, en el zumo sin homogenizar se observa un pequeño pico entre 10 y 50  $\mu\text{m}$  que desaparece al aplicar el tratamiento de homogeneización. Resultados similares se mostraron en los trabajos publicados por Martínez (2017) e Hinestroza-Córdoba *et al.* (2021) al obtener las curvas de distribución del tamaño de partícula del zumo de lulo fresco.

Cuando se incrementó la presión de homogeneización de 100 MPa a 150 MPa, se observó una clara diferencia entre la curva de distribución del zumo ajustado a pH 5,5 y la curva del zumo con pH 6. La primera presentó un pico perfectamente delimitado, pero, en cambio, la segunda curva mostró una clara irregularidad a partir de los 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente, resultando así en una curva de mayor amplitud (mayor SPAN). La formación de agregados entre las partículas de menor tamaño y la permanencia de estos agregados en suspensión permitiría explicar este cambio de distribución, resultando coherente con los resultados de pulpa suspendida y turbidez presentados en el apartado anterior.

#### 4.1.3 Propiedades ópticas: color

En la Tabla 4 se muestran los resultados de las coordenadas CIE-L\*a\*b\* y las coordenadas psicrométricas  $h^*_{ab}$  y  $C^*_{ab}$  de los zumos de lulo en función del tratamiento de homogeneización y el pH.

**Tabla 4.** Propiedades ópticas del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6.

	Sin HPH		HPH: 100 MPa		HPH: 150 MPa		Zumo de lulo fresco (Hinestroza-Córdoba <i>et al.</i> , 2021)
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	
<b>L*</b>	5,91 (0,06) <sup>e</sup>	5,37 (0,02) <sup>c</sup>	5,23 (0,02) <sup>b</sup>	6,15 (0,03) <sup>f</sup>	5,70 (0,10) <sup>d</sup>	3,89 (0,02) <sup>a</sup>	40,4 (0,4)
<b>a*</b>	25,8 (0,3) <sup>d</sup>	23,12 (0,14) <sup>b</sup>	24,7 (0,3) <sup>c</sup>	24,8 (0,3) <sup>c</sup>	25,8 (0,8) <sup>d</sup>	19,46 (0,05) <sup>a</sup>	9,5 (0,2)
<b>b*</b>	26,5 (0,3) <sup>d</sup>	23,73 (0,13) <sup>b</sup>	25,3 (0,3) <sup>c</sup>	25,3 (0,3) <sup>c</sup>	26,4 (0,8) <sup>d</sup>	19,85 (0,06) <sup>a</sup>	34,9 (1,4)
<b>h<sub>ab</sub>*</b>	44,27 (0,02) <sup>b</sup>	44,25 (0,01) <sup>b</sup>	44,37 (0,02) <sup>d</sup>	44,15 (0,01) <sup>a</sup>	44,32 (0,02) <sup>c</sup>	44,44 (0,01) <sup>e</sup>	36,2 (1,3)
<b>C<sub>ab</sub>*</b>	36,9 (0,5) <sup>d</sup>	33,13 (0,19) <sup>b</sup>	35,4 (0,4) <sup>c</sup>	35,6 (0,4) <sup>c</sup>	36,9 (1,2) <sup>d</sup>	27,80 (0,07) <sup>a</sup>	74,7 (0,2)

Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de tres medidas. Superíndices diferentes (<sup>a,b,c,d,...</sup>) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

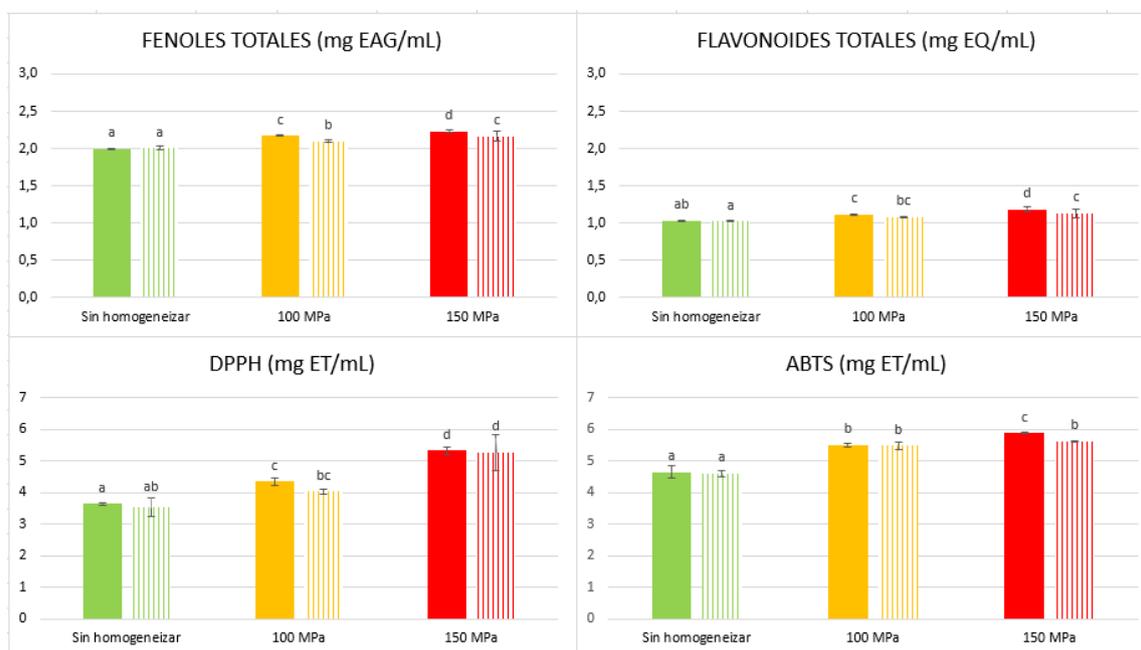
Para poder comparar los valores de las coordenadas de color obtenidas en este estudio, se han incorporado a la tabla los valores correspondientes al zumo de lulo fresco publicados por Hinestroza-Córdoba *et al.* (2021). Puede observarse que la luminosidad de los zumos desciende drásticamente cuando se añade bicarbonato sódico para rectificar el pH. Además, la coordenada de color a\* experimenta un ascenso notorio aumentando la intensidad de color hacia el rojo. En cambio, la coordenada de color b\* experimenta una leve bajada reflejando una pérdida de la intensidad del color amarillo. En relación con el valor de h\*<sub>ab</sub> puede observarse que es inferior al del zumo de lulo antes de ajustar el pH, lo que significa que el ángulo formado se acerca al origen, hacia tonalidades más rojas que amarillas.

Finalmente, la coordenada psicrométrica que hace referencia a la cromaticidad (C\*<sub>ab</sub>) y que mide la pureza y saturación del color, puede observarse que no experimentó cambios importantes con la rectificación del pH.

El principal efecto sobre el color se observa en el zumo con pH 6 tratado a 150 MPa. Esta muestra ha resultado ser más oscura, con menos intensidad de color y menos saturada respecto a las demás muestras, aunque la tonalidad se haya mantenido. Un análisis de la varianza multifactorial muestra un efecto significativo del pH sobre las coordenadas a\* y b\* pero no de la presión de homogeneización. Los zumos ajustados a pH de 5,5 presentan valores ligeramente más elevados respecto a los zumos cuyo pH es de 6. En cambio, las coordenadas L\* y C\*<sub>ab</sub> solo se han visto afectadas de manera significativa por la presión de homogeneización que se ha aplicado y no por el pH de las muestras.

#### 4.1.4 Propiedades antioxidantes

A continuación, en la Figura 4 se encuentran los resultados de las cuatro determinaciones específicas relacionadas con las propiedades antioxidantes.



**Figura 4.** Contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante medida por DPPH y ABTS en zumos de lulo sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 (barras sólidas) y 6 (barras rayadas). Superíndices diferentes (a,b,c,d,...) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

El contenido en fenoles totales aumenta a medida que lo hace la presión de homogeneización. Esto se debe a que, cuando aplicamos altas presiones de homogeneización se ejerce un efecto mecánico sobre las partículas suspendidas que resulta, en muchos casos, en la rotura de estructura celulares y la consiguiente liberación de compuestos químicos, entre ellos compuestos fenólicos, al medio líquido (Quan *et al.*, 2020). Además, los zumos con pH 5,5 presentaron ligeramente un mayor contenido en fenoles totales respecto a aquellos cuyo pH es 6, aunque la diferencia no es muy importante.

Se puede llegar a la misma conclusión si se observa el contenido en flavonoides totales de los zumos de lulo (Yu *et al.*, 2021). A medida que se aumentó la presión de homogeneización, también aumentó el contenido de flavonoides totales en las muestras. Los resultados obtenidos entre ambos pH de estudio fueron muy similares.

El contenido total en fenoles y flavonoides obtenido en este estudio, en comparación a los resultados obtenidos por Martínez (2017), Jordá (2019) e Hinestroza-Córdoba *et al.* (2021), resultó ser hasta 1 mg EAG/mL más elevado en el caso de los fenoles y 0,5 mg EQ/mL para los flavonoides, aproximadamente. Estas diferencias de resultados pueden deberse a factores como la propia materia prima y a las condiciones de conservación de los zumos.

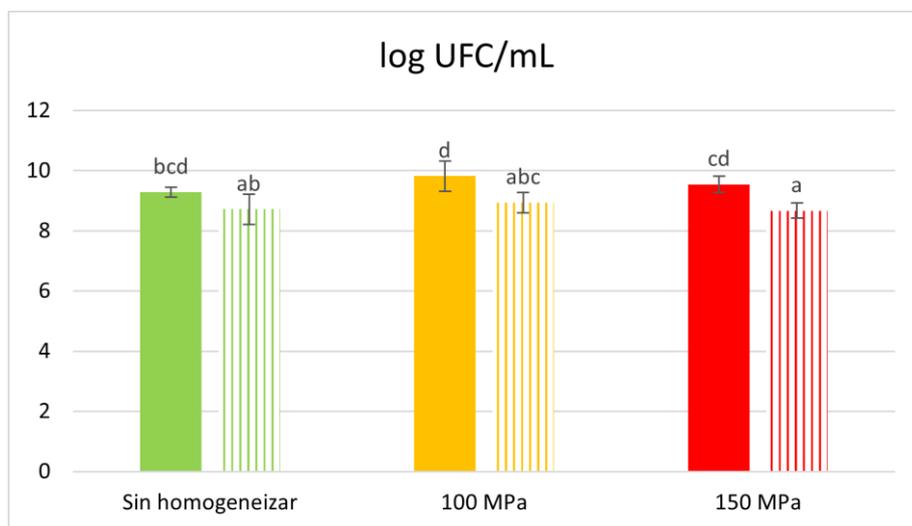
Los resultados de capacidad antioxidante (métodos DPPH y ABTS) siguieron una tendencia similar a la de fenoles y flavonoides. Los métodos ABTS y DPPH determinan la capacidad antirradical de componentes con diferente naturaleza hidrofílica: el radical ABTS reacciona con compuestos de naturaleza más hidrofílica que el radical DPPH. Sin embargo, la gran diversidad de componentes de diferente naturaleza con capacidad antirradical existentes en el zumo de lulo nos proporciona valores elevados en los dos casos. Además, Hinestroza-Córdoba *et al.* (2021) determinaron el perfil de componentes fenólicos por cromatografía líquida acoplada con espectroscopía de masas y pusieron de manifiesto un aumento considerable en la diversidad de componentes fenólicos al aplicar un tratamiento de homogenización en zumo de lulo. Teniendo en cuenta que la capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, ya que los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios, podríamos pensar que el aumento en la diversidad de compuestos fenólicos está asociado, en zumo de lulo, con un aumento en la capacidad antirradical de los zumos al aplicar el tratamiento HPH.

Castagnini (2014) observó un comportamiento similar en la determinación de la capacidad antirradical en zumos de arándano homogeneizados a diferentes presiones (932±29 ppm trólox equivalente en zumos tratados a 100 MPa, 988±12 ppm trólox equivalente en zumos homogeneizados a 150 MPa mediante el método DPPH; 2962±120 ppm y 3315±134 ppm trólox equivalente mediante el método ABTS para zumos homogeneizados, respectivamente, a 100 y 150 MPa). Lo mismo le sucedió a Ortiz (2015) estudiando la capacidad antioxidante de un zumo comercial de mandarina al que se le adicionó diferentes cantidades de trehalosa (0,2 ppm trólox equivalente mediante DPPH, 1,1 ppm trólox equivalente mediante ABTS, en zumos con un 30% trehalosa).

## 4.2 Crecimiento de *Lactobacillus reuteri* CECT 925 en los zumos de lulo a diferentes pH y presiones de homogeneización. Efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes.

### 4.2.1 Crecimiento de *Lactobacillus reuteri* CECT 925

En la Figura 5 se ha representado el contenido de células vivas de *Lactobacillus reuteri* después de 24 horas de la fermentación.



**Figura 5.** Viabilidad de *Lactobacillus reuteri* CECT 925 después de 24 horas de fermentación en zumos de lulo no homogeneizados y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 (barras sólidas) y 6 (barras rayadas).

Superíndices diferentes (a,b,c,d,...) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

El recuento de células viables en los zumos muestra valores superiores a 8 (log UFC/mL) en todas las muestras y superiores a 9,5 en los zumos a pH 5,5. El *Lactobacillus reuteri* CECT 925 presentó mayor crecimiento en los zumos homogeneizados que en los zumos sin homogeneizar y fue mayor en los zumos en los que se aplicó una presión de homogeneización de 100 MPa que en los zumos tratados a 150 MPa, aunque las diferencias no resultaron significativas. El efecto positivo de la presión de homogeneización puede explicarse si tenemos en cuenta que la disminución del tamaño de partícula permitió la liberación de componentes bioactivos, algunos de ellos útiles para la cepa probiótica considerada (Quan *et al.*, 2020). A 150 MPa la formación de agregados entre las partículas de menor tamaño y con mayor superficie puede arrastrar algunos de estos compuestos disminuyendo su disponibilidad.

### 4.2.2 pH, °Brix, densidad y pulpa suspendida y turbidez

En la Tabla 5 se muestran los valores finales de pH, Brix, densidad, pulpa suspendida y turbidez tanto a 366 g como a 3000 g de los zumos de lulo fermentados a diferentes pH y presiones de homogeneización.

**Tabla 5.** pH, °Brix, densidad, pulpa suspendida y turbidez del zumo de lulo sin homogeneizar y homogeneizado a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6 e inoculado con *Lactobacillus reuteri* CECT 925.

	Sin HPH		100 MPa		150 MPa	
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
<b>pH</b>	4,81 (0,01) <sup>a</sup>	5,19 (0,01) <sup>d</sup>	4,86 (0,01) <sup>b</sup>	5,23 (0,01) <sup>e</sup>	4,96 (0,01) <sup>c</sup>	5,24 (0,01) <sup>e</sup>
<b>°Brix</b>	7,93 (0,12) <sup>cd</sup>	8,33 (0,15) <sup>e</sup>	8 (0) <sup>bc</sup>	8,03 (0,06) <sup>d</sup>	7,6 (0,1) <sup>a</sup>	7,7 (0,1) <sup>ab</sup>
<b>ρ (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,074 (0,001) <sup>a</sup>	1,08 (0,04) <sup>a</sup>	1,069 (0,012) <sup>a</sup>	1,073 (0,009) <sup>a</sup>	1,072 (0,016) <sup>a</sup>	1,063 (0,004) <sup>a</sup>
<b>% Pulpa 366g</b>	3,0 (0,3) <sup>b</sup>	2,42 (0,13) <sup>c</sup>	3,16 (0,01) <sup>b</sup>	2,54 (0,18) <sup>a</sup>	2,75 (0,01) <sup>a</sup>	1,28 (0,11) <sup>a</sup>
<b>Transmitancia 366g</b>	20 (5) <sup>ab</sup>	14,2 (0,6) <sup>ab</sup>	21 (2) <sup>b</sup>	14,2 (0,2) <sup>ab</sup>	22,6 (0,4) <sup>a</sup>	33 (2) <sup>c</sup>
<b>% Pulpa 3000g</b>	1,11 (0,07) <sup>b</sup>	1,16 (0,05) <sup>c</sup>	1,56 (0,02) <sup>c</sup>	1,39 (0,07) <sup>c</sup>	1,27 (0,07) <sup>b</sup>	0,67 (0,02) <sup>a</sup>
<b>Transmitancia 3000g</b>	72,5 (1,1) <sup>b</sup>	65 (0,95) <sup>a</sup>	80,8 (0,97) <sup>d</sup>	38 (2) <sup>c</sup>	69,2 (1,4) <sup>c</sup>	83,8 (1,1) <sup>e</sup>

Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de tres medidas. Superíndices diferentes (<sup>a,b,c,d,...</sup>) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Los valores finales de pH obtenidos tras la inoculación de *Lactobacillus reuteri* confirman la acción fermentativa del microorganismo en el zumo de lulo. Las bacterias lácticas, para realizar la fermentación ácido-láctica, consumen azúcares presentes en el medio y liberan ácido láctico, entre otros metabolitos. Como consecuencia, se produce un descenso en el pH. Los azúcares consumidos en cuestión son los sólidos solubles presentes en las muestras y reflejados en los Brix. Si comparamos estos resultados con los obtenidos anteriormente en la Tabla 2, se puede observar un descenso en todas las muestras de aproximadamente un grado Brix. Tanto la disminución del pH como del contenido en sólidos solubles es mayor en los zumos a pH 5,5 en los que se obtuvo un mayor recuento de viables. De forma análoga, el zumo tratado a 100 MPa, con mayor recuento de viables, también sufrió un descenso de pH y Brix ligeramente superior a los otros dos zumos.

Si comparamos los resultados de pulpa suspendida obtenidos tras la fermentación ácido-láctica (Tabla 4) con los de los zumos sin fermentar (Tabla 2), resultaron ser ligeramente mayores. Esto puede deberse a que, además de los sólidos en suspensión ya naturalmente presentes en los zumos, las células microbianas también sedimentan en la operación de centrifugación. En general, los zumos con pH 5,5 presentaron una cantidad mayor de pulpa suspendida, tanto a 366 g como a 3000 g, que los zumos a pH 6. En relación con los valores de transmitancia, diferentes autores comprobaron que tras la fermentación de bebidas a base de sorgo, lulo y tomate, aumenta la turbidez y, por tanto, disminuye la medida de transmitancia (Vicente, 2013; Jordá, 2019; Lu *et al.*, 2020). Sin embargo, en este estudio, la obtención de valores de transmitancia más elevados tras la fermentación puede deberse a la posibilidad de la formación de agregados que puedan terminar sedimentando y recogiendo en el precipitando tras la centrifugación de las muestras (Kubo *et al.*, 2013; Augusto *et al.*, 2012b).

#### 4.2.3 Tamaño de partícula

En la Tabla 6 se muestran los resultados del tamaño de partícula de los zumos de lulo fermentados en función del pH y del tratamiento de homogeneización recibido.

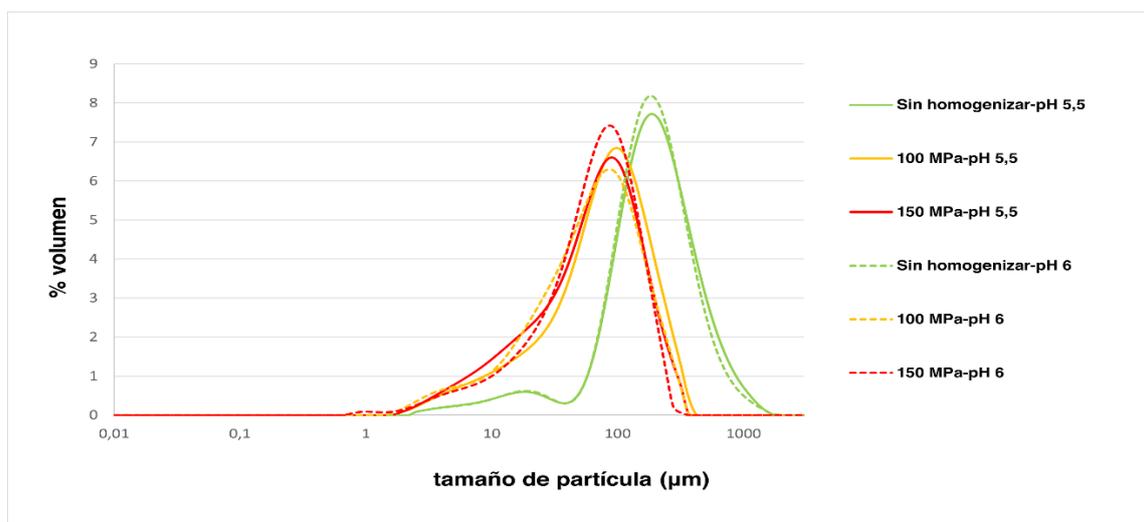
**Tabla 6.** Tamaño de partícula en  $\mu\text{m}$  después de 24 horas de fermentación de los zumos de lulo sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6.

	Sin HPH		HPH: 100 MPa		HPH: 150 MPa	
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
<b>D[4,3]</b>	220 (6) <sup>d</sup>	214 (7) <sup>c</sup>	88 (2) <sup>b</sup>	74,8 (1,3) <sup>a</sup>	75,4 (1,3) <sup>a</sup>	72 (2) <sup>a</sup>
<b>D[3,2]</b>	73,4 (0,9) <sup>d</sup>	72,7 (0,8) <sup>d</sup>	30,3 (1,1) <sup>c</sup>	25,5 (0,3) <sup>a</sup>	26,4 (0,5) <sup>b</sup>	25,5 (0,9) <sup>a</sup>
<b>d<sub>10</sub></b>	61,7 (0,6) <sup>d</sup>	61,2 (0,7) <sup>d</sup>	13,2 (0,7) <sup>c</sup>	11,9 (0,2) <sup>c</sup>	10,96 (0,20) <sup>a</sup>	13,2 (0,5) <sup>c</sup>
<b>d<sub>50</sub></b>	177 (2) <sup>e</sup>	170 (2) <sup>d</sup>	73 (2) <sup>c</sup>	59,7 (0,8) <sup>a</sup>	62,0 (1,2) <sup>b</sup>	63 (2) <sup>b</sup>
<b>d<sub>90</sub></b>	460 (13) <sup>e</sup>	412 (15) <sup>d</sup>	184 (3) <sup>c</sup>	160 (3) <sup>b</sup>	160 (3) <sup>b</sup>	144 (4) <sup>a</sup>

Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de cinco medidas. Superíndices diferentes (a,b,c,d,...) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor < 0,05).

Los zumos de lulo homogeneizados a 150 MPa e inoculados presentaron unos diámetros medios en función del volumen (D[4,3]) y del área (D[3,2]) ligeramente más elevados que los correspondientes zumos sin fermentar. El zumo homogeneizado a 100 MPa con pH 6 junto con los zumos sin homogeneizar, presentaron tamaños ligeramente menores. Además, también se puede observar que aquellos zumos cuyo pH inicial era de 5,5 resultaron presentar un mayor tamaño de D[4,3] y de D[3,2] que los zumos con pH 6. Los percentiles  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  y  $d_{90}$  presentaron tendencias similares a las de ambos diámetros.

Los resultados de las curvas de distribución del tamaño de partícula de los zumos de lulo inoculados se presentan en la Figura 6.



**Figura 6.** Efecto del pH y de las presiones de homogeneización sobre las curvas de distribución del tamaño de partícula en zumo de lulo tras 24 horas de fermentación.

Las curvas de distribución son muy similares a las obtenidas para los zumos sin inocular. Se trata de curvas monomodales con un único pico alrededor de las 200  $\mu\text{m}$  en los zumos sin homogeneizar y un pico inferior a las 100  $\mu\text{m}$  en los zumos homogeneizados.

El pequeño montículo que presentaban los zumos sin homogenizar entre las 10 y las 50  $\mu\text{m}$  sigue observándose en los zumos inoculados. Las células de *L. reuteri* presentes en los zumos inoculados y cuyo tamaño puede oscilar de las 1,6 hasta las 2,8  $\mu\text{m}$  de longitud (Rajab *et al.*, 2020) no modifican la distribución en torno a estos valores.

Los cambios más importantes se observan en el zumo homogeneizado a 150 MPa y pH 6. La curva de mayor amplitud obtenida en el zumo sin inocular se reduce y adquiere una amplitud similar a la de los otros zumos. Esto puede deberse a la sedimentación de las partículas de tamaño medio formadas por agregación de las partículas más pequeñas.

#### 4.2.4 Propiedades ópticas: color

A continuación, en la Tabla 7, se muestran los valores de las coordenadas de color de todos los zumos tras 24 horas de fermentación con *L. reuteri*.

**Tabla 7.** Propiedades ópticas después de 24 horas de fermentación de los zumos de lulo no homogeneizados y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 y 6.

	Sin HPH		HPH: 100 MPa		HPH: 150 MPa	
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
<b>L*</b>	7,16 (0,04) <sup>e</sup>	7,12 (0,09) <sup>d</sup>	6,827 (0,006) <sup>c</sup>	7,63 (0,03) <sup>f</sup>	6,45 (0,06) <sup>b</sup>	5,51 (0,02) <sup>a</sup>
<b>a*</b>	31,23 (0,11) <sup>e</sup>	30,4 (0,2) <sup>c</sup>	30,76 (0,03) <sup>d</sup>	31,75 (0,09) <sup>f</sup>	29,36 (0,02) <sup>b</sup>	26,70 (0,17) <sup>a</sup>
<b>b*</b>	32,08 (0,10) <sup>e</sup>	31,2 (0,3) <sup>c</sup>	31,51 (0,03) <sup>d</sup>	32,65 (0,09) <sup>c</sup>	30,065 (0,006) <sup>b</sup>	27,26 (0,17) <sup>a</sup>
<b>h<sub>ab</sub>*</b>	44,233 (0,013) <sup>b</sup>	44,236 (0,008) <sup>b</sup>	44,311 (0,002) <sup>c</sup>	44,196 (0,007) <sup>a</sup>	44,325 (0,014) <sup>c</sup>	44,402 (0,006) <sup>d</sup>
<b>C<sub>ab</sub>*</b>	44,77 (0,15) <sup>e</sup>	43,6 (0,4) <sup>c</sup>	44,04 (0,04) <sup>d</sup>	45,54 (0,12) <sup>f</sup>	42,02 (0,02) <sup>d</sup>	38,2 (0,2) <sup>a</sup>

Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de tres medidas. Superíndices diferentes (<sup>a,b,c,d,...</sup>) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor < 0,05).

Comparando estos nuevos valores de las coordenadas de color con los obtenidas en los zumos sin inocular, pueden observarse algunas diferencias.

En primer lugar, la luminosidad ( $L^*$ ) de todos los zumos inoculados experimentó un ligero aumento. Jordá (2019) también observó en sus muestras un leve ascenso de la luminosidad un día después de que empezara la fermentación. Los parámetros correspondientes a la cromaticidad en el eje del rojo al verde ( $a^*$ ) y la cromaticidad en el eje del amarillo al azul ( $b^*$ ) también ascendieron durante la fermentación ácido-láctica. Dicha subida supondría que los zumos fermentados experimentan una subida en la intensidad tanto del color rojo como del color amarillo, obteniendo como producto final unos zumos más anaranjados.

Analizando otros trabajos de investigación en donde se estudian los efectos de la fermentación ácido-láctica sobre el color de diferentes zumos de fruta, se observa que la luminosidad ( $L^*$ ) de un zumo de mora, tras la fermentación, disminuyó (Kwaw *et al.*, 2018).

En otro estudio realizado por Wu *et al.* (2020) con zumo de manzana probiótico, se observó que la luminosidad aumentó, y los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  disminuyeron. Además, se afirmó que el color de los productos hortofrutícolas fermentados se modifica en

función del contenido fenólico y los perfiles de estos fenoles. Lu *et al.* (2020), analizaron zumo de tomate probiótico y concluyeron que los cambios de color tras la fermentación podían deberse a las alteraciones en la estructura del tejido del tomate (dispersando la luz) y al contenido de licopeno libre (absorbiendo la luz). En nuestro caso, el aumento en la luminosidad y en los valores de  $a^*$  y  $b^*$  podría relacionarse con las variaciones en la turbidez y con los cambios observados en los componentes con capacidad antioxidante.

Respecto a las coordenadas psicrométricas, tonalidad ( $h_{ab}^*$ ) y cromaticidad ( $C_{ab}^*$ ), cabe destacar que la primera coordenada apenas se vio modificada tras la inoculación de los zumos. La cromaticidad, a diferencia de la tonalidad, sí cambió. Los nuevos valores resultaron ser mayores que la cromaticidad en los zumos de lulo sin inocular. Este hecho supone que los nuevos zumos presentan una mayor saturación del color en comparación a los anteriores. Las variaciones en las coordenadas de color y las coordenadas psicrométricas, durante la fermentación, solo se vieron influenciadas de manera significativa por el tratamiento de homogeneización al que los zumos habían sido sometidos previamente. Los zumos probióticos homogeneizados a 150 MPa resultaron ser menos luminosos, menos intensos y saturados que los zumos no homogeneizados y aquellos tratados a 100 MPa.

A partir de las coordenadas de color, se calculó, la diferencia de color entre los zumos de lulo probióticos y no probióticos en función del pH ajustado y el tratamiento de homogeneización recibido. Los datos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Diferencia de color entre los zumos de lulo a pH 5,5 y 6 no homogeneizados y homogeneizados a 100 y 150 MPa antes de inocular y después de la fermentación.

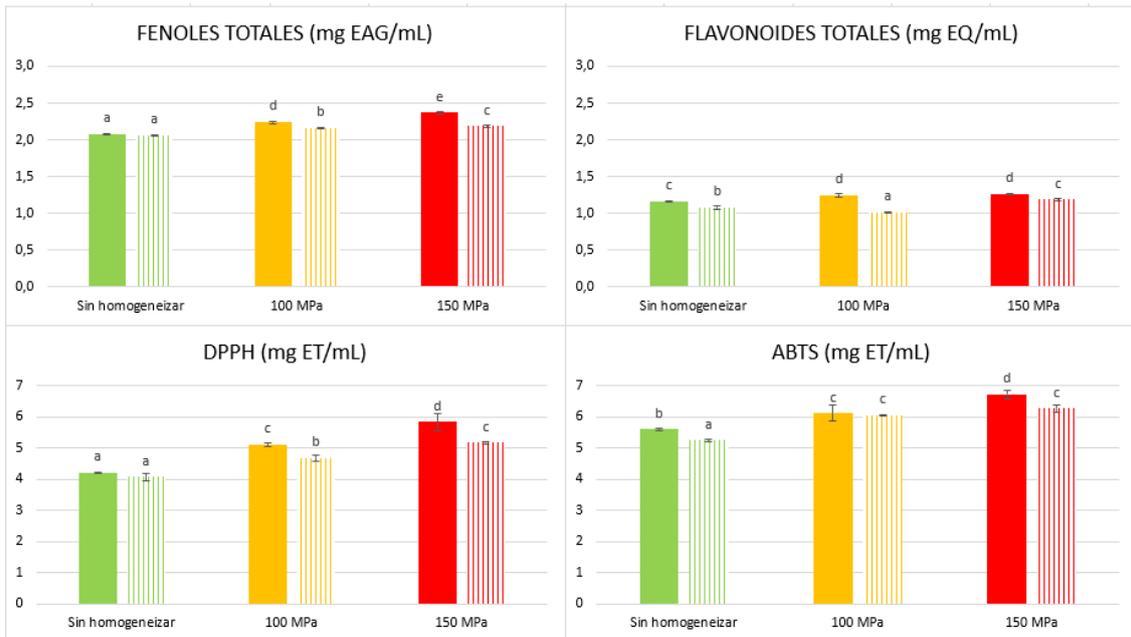
	Sin HPH		HPH: 100 MPa		HPH: 150 MPa	
	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6	pH 5,5	pH 6
$\Delta E^*$	7,96	10,6	8,82	10,0	5,2	10,48
	(0,51) <sup>b</sup>	(0,4) <sup>c</sup>	(0,4) <sup>b</sup>	(0,4) <sup>c</sup>	(1,2) <sup>b</sup>	(0,16) <sup>a</sup>

Entre paréntesis se encuentra la desviación estándar de tres medidas. Superíndices diferentes (<sup>a,b,c,d,...</sup>) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor < 0,05).

Puede observarse que los zumos ajustados inicialmente a pH 6 experimentaron un mayor cambio de color después de la fermentación ácido-láctica que los zumos que se ajustaron a pH 5,5. El pH de los zumos y la presión de homogenización resultaron ser factores con un efecto significativo ( $p$ -valor < 0,05) en la diferencia del color. Entre los zumos con pH 5,5, experimentaron una mayor diferencia de color las muestras tratadas a 100 MPa, seguido de los zumos no homogeneizados y, finalmente, aquellos a los que se les aplicó una presión de homogeneización de 150 MPa.

#### 4.2.5 Propiedades antioxidantes

En la Figura 7 se muestran los resultados de las propiedades antioxidantes de los zumos de lulo fermentados.



**Figura 7.** Contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante medida por DPPH y ABTS en zumos de lulo tras 24h de fermentación sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa, a pH de 5,5 (barras sólidas) y 6 (barras rayadas). Superíndices diferentes (a,b,c,d,...) para una misma propiedad indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Tras la fermentación de las muestras, se observa de manera general, una mejoría de las propiedades antioxidantes de los zumos, si se comparan estos resultados con los del zumo no inoculado con *L. reuteri*.

En primer lugar, el contenido en fenoles totales mejoró tras la acción fermentativa de las bacterias lácticas en los zumos. Resultados similares se obtuvieron por Balli *et al.* (2020), que comprobaron que las bacterias del género *Lactobacillus* aumentaron en un 30% el contenido en fenoles totales presentes en cereales. Estos resultados se atribuyeron a la liberación de fenoles que se encontraban atrapados física o químicamente en la fibra soluble y fermentable del alimento. Este mismo comportamiento también se observó en los resultados obtenidos por Jordá (2019) después de fermentar los zumos de lulo durante 24 h.

La cantidad de fenoles totales en el zumo fermentado se vio afectada de forma significativa (p-valor < 0,05) tanto por el pH inicial de los zumos como por la presión a la que se homogeneizaron. A mayor presión empleada, mayor es el contenido final en fenoles totales. Por otro lado, aquellas muestras cuyo pH antes de la fermentación era de 5,5 presentaron una mayor cantidad de fenoles totales respecto a aquellos zumos cuyo pH se ajustó a 6, dado que los zumos ajustados a pH 5,5 favorecieron más el crecimiento microbiano y, como consecuencia, se produjeron mayores modificaciones en el contenido en compuestos fenólicos.

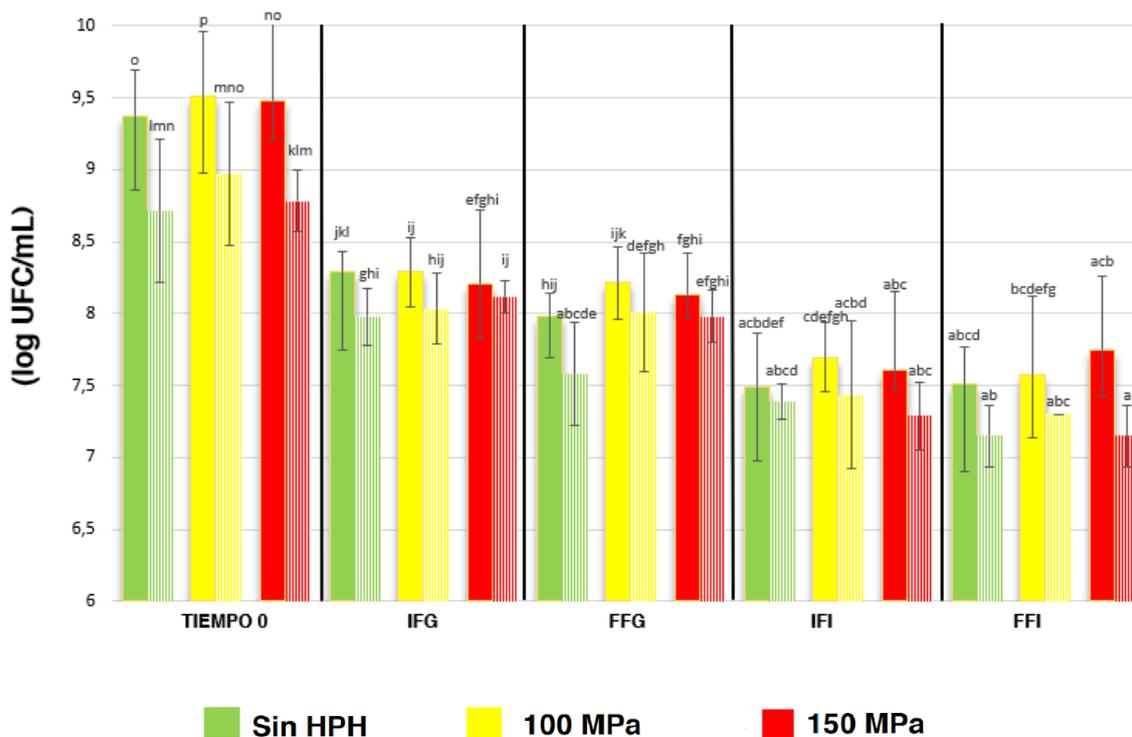
Como era de esperar, los flavonoides experimentaron una tendencia similar al contenido en fenoles totales tras 24 h de fermentación. El pH del medio y las presiones de homogeneización a las que se sometieron las muestras afectaron significativamente del mismo modo sobre el contenido final en flavonoides totales.

La capacidad antioxidante determinada tanto por el método DPPH como por el método ABTS, de los zumos de lulo después de inocular, experimentó una subida elevada, observándose un mayor incremento en los resultados obtenidos por ABTS. La tendencia y los factores significativos fueron iguales que en la determinación de fenoles y

flavonoides totales. El aumento de la capacidad antioxidante resultó ser positiva con la presión de homogeneización aplicada: a mayor presión, mayor actividad antioxidante, y más acusada a pH 5,5 que a pH 6.

### 4.3 Efecto de la digestión gastrointestinal sobre el contenido en células vivas en el zumo de lulo a diferentes pH sin homogeneizar y homogeneizado a diferentes presiones.

En la Figura 8 se muestra la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* CECT 925 después de 24 horas de fermentación y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*.



**Figura 8.** Contenido en células vivas de los zumos de lulo probióticos a pH 5,5 (barras sólidas) y pH 6 (barras rayadas) sin homogeneizar y homogeneizados a 100 y 150 MPa al inicio, durante y al final de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Tiempo 0: zumos probióticos antes de someterse a la digestión *in vitro*; IFG: Inicio Fase Gástrica; FFG: Final Fase Gástrica; IFI: Inicio Fase Intestinal; FFI: Final Fase Intestinal.

Superíndices diferentes (a,b,c,d,...) indican diferencias estadísticamente significativas empleando un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Se puede apreciar, en primer lugar, que el contenido en células viables en los zumos inoculados (Tiempo 0), tal y como se ha dicho en el apartado anterior, sobrepasa el valor de 8 (log UFC/mL) en todas las muestras, siendo mayor en los zumos a pH 5,5 y tras el tratamiento de HPH a 150 MPa.

Al someter todos los zumos a una digestión gastrointestinal *in vitro*, al inicio de la fase gástrica, el contenido en células vivas desciende hasta 1,5 unidades logarítmicas debido a las condiciones desfavorables del medio: en la fase gástrica, el pH del medio baja hasta 3. Además, es esencial tener en cuenta la acción de la pepsina durante esta etapa. Sin embargo, al final de la fase gástrica, 2 h después de iniciada, el contenido en células viables no varía demasiado en los zumos que han sido sometidos a una presión de homogeneización, pero sí que se observa una bajada mayor en los zumos que no fueron homogeneizados.

Al entrar en la fase intestinal de la digestión se volvieron a modificar las condiciones del medio (pH = 7) lo que provocó de nuevo un descenso en el contenido de células viables. No obstante, incluso teniendo en cuenta la acción de la pancreatina y la bilis en esta etapa, al final de la digestión *in vitro*, el contenido en células vivas superó en todos los casos el nivel de  $10^7$  UFC/mL.

En todas las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*, el pH y la presión de homogeneización ejercieron un efecto significativo sobre (p-valor < 0,05) los recuentos de células viables. Los zumos con pH 5,5 presentaron mayor tolerancia a las condiciones drásticas de la digestión simulada que los zumos ajustados a pH 6, y aquellos zumos que se sometieron a una presión de homogeneización de 150 MPa son aquellos en lo que se consiguió un mayor número de células vivas final.

Los recuentos de células viables de *L. reuteri* a lo largo del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* muestran que es posible en todos los casos alcanzar niveles superiores a 7 unidades logarítmicas por mL de zumo, se trata de niveles superiores al mínimo necesario para que un alimento pueda ejercer efecto probiótico (Koirala & Anal, 2021).

Existen estudios similares en donde se estudió la resistencia de microorganismos de la familia *Lactobacillus* a las condiciones de la digestión gastrointestinal. Li *et al.* (2019) analizaron la viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus*, previamente cultivado con oligosacáridos que provienen de la mora. Montanari *et al.* (2020) sometieron bebidas de soja, cacahuete, guayaba y remolacha a la fermentación con *L. rhamnosus*. En ambos estudios se observó que el número de células viables de *L. rhamnosus* tras el ensayo sobrepasaban las  $10^6$  UFC/mL pero alcanzaron niveles inferiores a los alcanzados en este estudio con el tratamiento de HPH.

Tras la obtención de estos resultados, sería interesante realizar posteriormente estudios sobre la vida útil del zumo de lulo durante el almacenamiento para observar la evolución de la viabilidad del probiótico. Si el contenido en células viables disminuyera considerablemente, se podría plantear el encapsulamiento microbiano, dado que este tipo de técnicas garantizan una mayor capacidad de carga celular y supervivencia (Rathore *et al.*, 2013).

## 5. Conclusiones

Las propiedades fisicoquímicas del zumo de lulo se vieron afectadas en función del pH y de las HPH aplicadas. Las muestras que se trataron a mayor presión de homogeneización presentaron mayor actividad antioxidante debido a la reducción del tamaño de partícula y el aumento de la estabilidad de la nube.

El zumo de lulo es una matriz adecuada para que *Lactobacillus reuteri* CECT 925 pueda llevar a cabo la fermentación dando lugar a un zumo con potenciales propiedades probióticas. Las condiciones más favorables para la obtención de un mayor contenido en células vivas se dieron en aquellos zumos que se sometieron a presiones de homogeneización de 100 MPa y con el pH del medio rectificado a 5,5.

Las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de los zumos se vieron modificadas después de 24 horas de fermentación con *Lactobacillus reuteri* CECT 925. A mayor crecimiento microbiano, mayor tamaño de partícula y mejores propiedades antioxidantes de los zumos.

*Lactobacillus reuteri* CECT 925 demostró ser un microorganismo con buena capacidad de resistencia a las condiciones desfavorables de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Su resistencia se vio condicionada fundamentalmente por el contenido de células viables en los zumos iniciales. Aunque los niveles de viabilidad fueron mayores en los zumos homogeneizados a 100 MPa y pH 5,5, en todas las muestras se logró una concentración mínima de  $10^7$  UFC/mL al final del ensayo, concentración suficiente para que el microorganismo pueda ejercer sus efectos beneficiosos para la salud en el tracto intestinal del huésped.

## 6. Bibliografía

Aguilera, C., Labbé, T., Busquets, J., Venegas, P., Neira, C., & Valenzuela, Á. (2019). Obesidad: ¿Factor de riesgo o enfermedad?. *Revista médica de Chile*, 147(4), 470-474.

Altendorf, S. (2017). Perspectivas mundiales de las principales frutas tropicales. *Perspectivas, retos y oportunidades a corto plazo en un mercado pujante*, [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Tropical\\_Fruits/Documents/Tropical\\_Fruits\\_Spanish2017.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tropical_Fruits/Documents/Tropical_Fruits_Spanish2017.pdf).

Augusto, P. E., Ibarz, A., & Cristianini, M. (2012). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the rheological properties of tomato juice: Time-dependent and steady-state shear. *Journal of Food Engineering*, 111(4), 570-579.

Balli, D., Bellumori, M., Pucci, L., Gabriele, M., Longo, V., Paoli, P., ... & Innocenti, M. (2020). Does Fermentation Really Increase the Phenolic Content in Cereals? A Study on Millet. *Foods*, 9(3),303.

Baquero, G. D. C., Paternina, G. A., & Cadavid, M. V. (2016). Frutas tropicales: fuente de compuestos bioactivos naturales en la industria de alimentos-Tropical Fruits: Source of Natural Compounds Bioactives Food Industry. *Ingenium Revista de la facultad de ingeniería*, 17(33), 29-40.

Betoret Valls, M. E. (2011). Efecto de la presión de homogeneización sobre el tamaño de partícula y las propiedades funcionales de los zumos.

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, 18-23.

Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N. & Fito, P. (2012). Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *Journal of Food Engineering* 111, 28–33.

Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., & Fito, P. (2012). Homogenization pressures applied to citrus juice manufacturing. Functional properties and application. *Journal of food engineering*, 111(1), 28-33.

Betoret, N., Hinestroza, L.I., Seguí, L. & Barrera, C. (2019). Probiotics and Other Bioactive Compounds with Proven Effect Against Obesity and Hypertension: Food Design Opportunities from Lulo Fruit (*Solanum quitoense*). In: *Nutraceuticals: Past, Present and Future*. IntechOpen.

Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: the case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.

Bornhorst, G. M., Gouseti, O., Wickham, M. S., & Bakalis, S. (2016). Engineering digestion: multiscale processes of food digestion. *Journal of food science*, 81(3), R534-R543.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology* 28(1), 25-30.

Castagnini, J. M. (2014). *Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío* (Doctoral dissertation, Editorial Universitat Politècnica de València).

Fâk, F., & Bäckhed, F. (2012). Lactobacillus reuteri prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *PLoS one*, 7(10), e46837.

Ghaffari, S., & Roshanravan, N. (2020). The role of nutraceuticals in prevention and treatment of hypertension: An updated review of the literature. *Food Research International*, 128, 108749.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., . . . hepatology. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *11*(8), 506.

Hinestroza-Córdoba, L. I., Barrera, C., Seguí, L., & Betoret, N. (2021). Potential Use of Vacuum Impregnation and High-Pressure Homogenization to Obtain Functional Products from Lulo Fruit (*Solanum quitoense* Lam.). *Foods*, 10(4), 817.

Jordá Marín, S. (2019). Efecto del pH y la presión de homogeneización sobre el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* en zumo de lulo (*Solanum quitoense*). <http://hdl.handle.net/10251/127716>

Koirala, S., & Anal, A. K. (2021). Probiotics-based foods and beverages as future foods and their overall safety and regulatory claims. *Future Foods*, 100013.

Kubo, M. T. K., Augusto, P. E., & Cristianini, M. (2013). Effect of high pressure homogenization (HPH) on the physical stability of tomato juice. *Food Research International*, 51(1), 170-179.

Kubo, M. T., Tribst, A. A., & Augusto, P. E. (2021). High Pressure Homogenization in Fruit and Vegetable Juice and Puree Processing: Effects on Quality, Stability and Phytochemical Profile.

Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)* 25(4):726-732.

Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., ... & Tahir, H. E. (2018). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food chemistry*, 250, 148-154.

Lamaison, J.L.C., Carnet, A. (1990). Teneurs en principaux flavonoids de fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret DC) en fonction de la vegetation. *Plant Médicinales et Phytothérapies XXV*, pp. 12-16.

Lee, P., Yacyshyn, B. R., & Yacyshyn, M. B. (2019). Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT). *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 21(3), 479-490.

Li, E., Yang, H., Zou, Y., Wang, H., Hu, T., Li, Q., & Liao, S. (2019). In-vitro digestion by simulated gastrointestinal juices of *Lactobacillus rhamnosus* cultured with mulberry oligosaccharides and subsequent fermentation with human fecal inocula. *Lwt*, 101, 61-68.

Lu, Y., Mu, K., McClements, D. J., Liang, X., Liu, X., & Liu, F. (2020). Fermentation of tomato juice improves in vitro bioaccessibility of lycopene. *Journal of Functional Foods*, 71, 104020.

Luximon-Ramma, A., Baborun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K., Dexter, D. & Aruoma, O. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanicins in Mauritian black teas. *Food Research International* 38, 357-367.

- Mahmood, T. A., Arulkumaran, S., & Chervenak, F. A. (Eds.). (2020). *Obesity and Obstetrics*. Elsevier.
- Marti, A., Calvo, C., & Martínez, A. (2021). Consumo de alimentos ultraprocesados y obesidad: una revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*, 38(1), 177-185.
- Martínez Andrade, AL. (2017). Caracterización del fruto de lulo (*Solanum quitoense* Lam) y efecto de las altas presiones de homogenización sobre las propiedades del zumo. Posibilidades de utilización en el desarrollo de alimentos funcionales de interés en el departamento del Chocó (Colombia). <http://hdl.handle.net/10251/89412>
- Mesa J., Hinestroza-Córdoba L.I., Barrera C., Seguí L., Betoret E., Betoret N. 2020. High homogenization pressures to improve food quality, functionality and sustainability. *Molecules*, vol. 25, no. 14. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules25143305.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Montanari, S. R., Júnior, B. R. D. C. L., Martins, M. L., Ramos, A. M., Binoti, M. L., Campos, R. C. D. A. B., ... & Martins, E. M. F. (2020). In vitro gastrointestinal digestion of a peanut, soybean, guava and beet beverage supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Bioscience*, 36, 100623.
- Moreno, G. M. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(2), 124-128.
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in microbiology*, 9, 757.
- Ortiz Herrero, A. (2015). EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE TREHALOSA Y LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE ZUMO DE MANDARINA COMERCIAL INOCULADO CON *LACTOBACILLUS SALIVARIUS* spp. *SALIVARIUS*.
- Parra, B., Manjarrés, L., Velásquez, C., Agudelo, G., Estrada, A., Uscátegui, R., Patiño, F., Bedoya, G. & Parra, M. (2015) Perfil lipídico y consumo de frutas y verduras en un grupo de jóvenes de 10 a 19 años, según el índice de masa corporal. *Revista Colombiana de Cardiología*, 22(2), 72-80.
- Prashar, Y., & Patel, N. J. (2020). High-performance thin-layer chromatography analysis of gallic acid and other phytoconstituents of methanolic extracts of *Myrica nagi* fruit. *Pharmacognosy Research*, 12(2), 95.
- Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Li, L., Li, Y., Wang, P., ... & Le, G. (2015). Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*, 14, 424-434.
- Quan, W., Tao, Y., Qie, X., Zeng, M., Qin, F., Chen, J., & He, Z. (2020). Effects of high-pressure homogenization, thermal processing, and milk matrix on the in vitro bioaccessibility of phenolic compounds in pomelo and kiwi juices. *Journal of Functional Foods*, 64, 103633.
- Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M. K., & Alahyaribeik, S. (2020). The effect of *Lactobacillus* cell size on its probiotic characteristics. *Anaerobe*, 62, 102103.

- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-381.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Roobab, U., Inam-Ur-Raheem, M., Khan, A. W., Arshad, R. N., Zeng, X. A., & Aadil, R. M. (2021). Innovations in High-pressure Technologies for the Development of Clean Label Dairy Products: A Review.
- Shatylo, V., Antoniuk-Shcheglova, I., Naskalova, S., Bondarenko, O., Havalko, A., Krasnienkov, D., ... & Vaiserman, A. (2021). Cardio-metabolic benefits of quercetin in elderly patients with metabolic syndrome. *PharmaNutrition*, 15, 100250.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.
- Stratil, P., Klejdus, B. & Kubán, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 607-616.
- Szutowska, J. (2020). Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review. *European Food Research and Technology*, 246(3), 357-372.
- Talens Oliag, P. (2017). Evaluación del color y tolerancia de color en alimentos a través del espacio CIELAB. <http://hdl.handle.net/10251/83392>
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111(4), 816–823.
- Vicente, F. (2013). Bebida fermentada a base de sorgo. *Buenos Aires*.
- Wang, L. C., Pan, T. M., & Tsai, T. Y. (2018). Lactic acid bacteria-fermented product of green tea and *Houttuynia cordata* leaves exerts anti-adipogenic and anti-obesity effects. *journal of food and drug analysis*, 26(3), 973-984.
- Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C. E., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2009). High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 457-462.
- WHO, 2021. <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity> (consultado el 2 de julio de 2021).
- Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of Apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 609-614.
- Wu, C., Li, T., Qi, J., Jiang, T., Xu, H., & Lei, H. (2020). Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *Lwt*, 122, 109064.
- Yu, X., Yang, T., Qi, Q., Du, Y., Shi, J., Liu, X., ... & Yan, N. (2021). Comparison of the contents of phenolic compounds including flavonoids and antioxidant activity of rice (*Oryza sativa*) and Chinese wild rice (*Zizania latifolia*). *Food Chemistry*, 344, 128600.