

RESUMEN

Uno de los desafíos clave que se presenta en el siglo XXI es la necesidad de alimentar a una población cada vez mayor con recursos naturales cada vez más limitados. Adicionalmente, el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 12 de la Agenda 2030 aboga por formas de producción y consumo más sostenibles. En este sentido, se favorece el aprovechamiento y desarrollo de alimentos de origen vegetal frente a los de origen animal. Por otra parte, hay estudios que demuestran que la ingesta de determinados microorganismos en cantidades adecuadas produce efectos beneficiosos para la salud de los consumidores y que la fermentación con estos microorganismos contribuye en la mejora de las propiedades nutricionales de diferentes matrices alimentarias.

Debido a esto, en los últimos años ha aumentado el interés de los científicos por desarrollar alimentos funcionales probióticos a partir de matrices vegetales, destinados a responder también a las necesidades nutricionales de los consumidores vegetarianos, con intolerancia a lactosa y con dietas restrictivas por el elevado nivel de colesterol. Entre las técnicas empleadas, la impregnación a vacío permite la incorporación de microorganismos probióticos en la matriz estructural de frutas y hortalizas sin alterar su integridad celular. Este hecho, sin embargo, se traduce en mejores recuentos tras el procesado y el almacenamiento, pero no es suficiente para garantizar la viabilidad de los microorganismos tras la estabilización mediante secado por aire caliente, lo que hace necesario recurrir a otras estrategias. Concretamente en esta tesis doctoral las técnicas que se aplican para aumentar la resistencia de los probióticos a las condiciones adversas de procesado de los alimentos son la adición de agentes protectores, como la trehalosa, y la aplicación de altas presiones de homogeneización (HPH).

Los resultados de las investigaciones se presentan por compendio de 4 artículos científicos organizados en dos capítulos. En el Capítulo I "Obtención de un líquido de impregnación a base de zumo de clementina con elevado contenido en unidades formadoras de colonias de *L. salivarius* CECT 4063 que sean resistentes al almacenamiento y a la digestión simulada in vitro se ha analizado el efecto que la concentración de trehalosa (0-20%, p/p) y la presión de homogeneización (0-150 MPa) ejercen sobre las propiedades antioxidantes y el crecimiento de la cepa de *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en zumo de clementina comercial, así como sobre la capacidad del microorganismo para inhibir al patógeno *Helicobacter pylori*, para adherirse a la mucosa intestinal y para resistir el proceso de digestión in vitro. También se ha evaluado cómo la propia fermentación con el lactobacilo afecta al contenido en compuestos con actividad antioxidante del zumo, en mayor o menor medida dependiendo de la adición o no de un 10% en peso de trehalosa al medio y/o de la homogeneización a 100 MPa del zumo fermentado y sin fermentar. Por último, se ha estudiado la evolución de las propiedades antioxidantes y microbianas de los zumos fermentados durante su almacenamiento en refrigeración, así como su habilidad para ser incorporados en la matriz estructural de láminas de manzana (var. Granny Smith) mediante la técnica de impregnación a vacío. A partir de los ensayos realizados se ha podido constatar que:

- La homogeneización a 100 MPa del zumo de clementina antes de la inoculación con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 mejoró notablemente el crecimiento microbiano, pero aceleró la degradación de los compuestos antioxidantes.
- El empleo de zumo de clementina comercial como medio para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 no mejoró significativamente su habilidad para

inhibir el crecimiento del patógeno *Helicobacter pylori*, pero sí su capacidad para adherirse a mucina, colágeno y albúmina de suero bovino.

- Una vez elaborado el líquido de impregnación, éste no debería almacenarse durante más de 15 días en refrigeración para mantener los recuentos por encima de 10⁷ UFC/mL y conservar su condición de probiótico.

Por otra parte, en el Capítulo II “Obtención de un snack de manzana (var. Granny Smith) con elevado contenido en compuestos antioxidantes y en unidades formadoras de colonias de *L. salivarius* CECT 4063” mediante impregnación a vacío y posterior liofilización o secado con aire a 40 °C se ha analizado el efecto que la adición de un 10% (p/p) de trehalosa al zumo de clementina antes de su inoculación con el microorganismo y/o la homogeneización a 100 MPa del zumo de clementina fermentado ejercen sobre la viabilidad del lactobacilo y la estabilidad de los compuestos antioxidantes frente al procesado, el almacenamiento y la digestión simulada in vitro. A partir de los ensayos realizados se ha podido constatar que:

- Tanto la liofilización como el secado con aire a 40 °C durante 12 y 24 h ejercieron un impacto negativo sobre el contenido en *Lactobacillus salivarius* CECT 4063, pero mejoraron las propiedades antioxidantes de las muestras impregnadas.
- La población microbiana en los snacks de manzana disminuyó a los 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente. De entre las muestras analizadas, las obtenidas mediante secado con aire a 40 °C hasta una actividad del agua de 0,35 fueron las que menor reducción experimentaron en la población microbiana, especialmente tras añadir trehalosa al líquido de impregnación.
- De los estudios de digestión in vitro se deduce que tanto la supervivencia de *Lactobacillus salivarius* CECT 4063 como la bioaccesibilidad de los antioxidantes se vieron afectadas por la matriz alimentaria de la que forman parte.
- La homogeneización a 100 MPa del zumo de clementina fermentado empleado como líquido de impregnación también aumentó la supervivencia del *Lactobacillus salivarius* CECT 4063 durante la digestión in vitro de las muestras de manzana liofilizadas, aunque los compuestos con actividad antioxidante alcanzaron una mayor concentración en las muestras deshidratadas que en las simplemente impregnadas.

En conclusión, se ha comprobado que la adición de trehalosa, la aplicación de HPH y la inclusión en una matriz alimentaria son estrategias adecuadas para la mejora de la calidad funcional de un snack de manzana impregnado con zumo de clementina fermentado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063. Los alimentos probióticos con matriz vegetal se presentan como el desafío industrial más novedoso, para cubrir un nicho de mercado creciente y muy prometedor que claramente exige condiciones estrictas para sus productos.