

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS



**Efecto de la trehalosa y la homogenización sobre la actividad antioxidante
y el efecto probiótico de manzana impregnada y secada por aire caliente
durante su almacenamiento**

ALUMNO: JACOBO MARTIN LAJARA

TUTORA: Dra. CRISTINA BARRERA PUIGDOLLERS

COTUTORA: Dra. LUCÍA SEGUÍ GIL

TUTORA EXPERIMENTAL: CRISTINA GABRIELA BURCA

Curso académico 2016-2017

Valencia, junio de 2017

Efecto de la trehalosa y la homogenización sobre la actividad antioxidante y el efecto probiótico de manzana impregnada y Secada por aire caliente durante su almacenamiento

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria patógena que causa graves problemas gástricos a gran parte de la población mundial, especialmente en el tercer mundo. Los tratamientos tradicionales con antibióticos en ocasiones no son efectivos, debido a la creación de resistencias por parte del patógeno, o presentan efectos secundarios adversos. Estudios recientes demuestran que algunas cepas del género *Lactobacillus* son efectivas en el tratamiento contra *Helicobacter pylori* reduciendo la colonización en el intestino del patógeno, lo que ha promovido su incorporación en la formulación de determinados alimentos. Sin embargo, la supervivencia de los microorganismos en alimentos de origen no lácteo es generalmente bastante limitada.

En este Trabajo de Final de Grado nos hemos propuesto desarrollar un snack probiótico mediante impregnación a vacío con diferentes zumos de clementina inoculados con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* y posterior secado con aire caliente hasta dos niveles de actividad del agua: 0,45 y 0,35. Para favorecer el crecimiento microbiano y la resistencia del probiótico a las condiciones de procesado y posterior almacenamiento se han ensayado técnicas sencillas de ingeniería de procesos como son la adición de trehalosa y la aplicación de altas presiones de homogeneización.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el secado con aire a 40 °C no es una técnica adecuada para la estabilización del producto impregnado con el microorganismo probiótico, ya que reduce hasta valores por debajo de 10^7 UFC/g el contenido microbiano del mismo. Ni la adición de trehalosa a la formulación del líquido de impregnación ni la homogeneización del mismo a 100 MPa mejoraron los recuentos en el producto deshidratado o redujeron de forma significativa la pérdida de viabilidad durante los 30 días de almacenamiento del snack. En cambio, la actividad del agua de las muestras al final del secado sí que resultó un factor decisivo en la estabilidad del probiótico durante el almacenamiento, siendo aconsejable en estos casos alcanzar valores en torno a 0,35. Resultados similares se obtuvieron para las propiedades antioxidantes, que en este caso sí que se vieron significativamente mejoradas como consecuencia de la eliminación de agua durante el proceso de secado.

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

Efecte de la trehalosa i l'homogeneïtzació sobre l'activitat antioxidant i l'efecte probiòtic de poma impregnada i Assecada per aire calent durant el seu emmagatzematge

RESUM

Helicobacter pylori és un bacteri patògen que causa greus problemes gàstrics a gran part de la població mundial, especialment en el tercer món. Els tractaments tradicionals amb antibiòtics en ocasions no són efectius, a causa de la creació de resistències per part del patògen, o presenten efectes secundaris adversos. Estudis recents demostren que algunes soques del gènere *Lactobacillus* són efectives en el tractament contra *Helicobacter pylori* reduint la colonització a l'intestí del patògen, el que ha promogut la seva incorporació en la formulació de determinats aliments. No obstant això, la supervivència dels microorganismes en aliments d'origen no làctic és generalment força limitada.

En aquest Treball de Fi de Grau ens hem proposat desenvolupar un Snack probiòtic a base de la tècnica d'impregnació al buit amb diferents suc de clementina inoculats amb el bacteri *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* amb efecte anti *Helicobacter pylori* demostrat i posteriorment assecada amb aire calent. Per a promoure el creixement microbià i la resistència al llarg del emmagatzematge del probiòtic s'han assajat tècniques senzilles com són l'addició de trehalosa i l'aplicació de altes pressions d'homogeneïtzació.

D'acord amb els resultats obtinguts, l'assecat amb aire a 40 ° C no és una tècnica adequada per a l'estabilització del producte impregnat amb el microorganisme probiòtic, ja que redueix fins a valors per sota de 10⁷ UFC / g el contingut microbià del mateix. Ni l'addició de trehalosa a la formulació del líquid d'impregnació ni l'homogeneïtzació del mateix a 100 MPa van millorar els recomptes en el producte deshidratat o van reduir de manera significativa la pèrdua de viabilitat durant els 30 dies d'emmagatzematge del snack. En canvi, l'activitat de l'aigua de les mostres al final de l'assecat sí que va resultar un factor decisiu en l'estabilitat del probiòtic durant l'emmagatzematge, sent aconsellable en aquests casos assolir valors al voltant de 0,35. Resultats similars es van obtenir per a les propietats antioxidants, que en aquest cas sí que es van veure significativament millorades com a conseqüència de l'eliminació d'aigua durant el procés d'assecat.

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

Effect of trehalose and homogenization on antioxidant activity and the probiotic effect of impregnated apple and drying by hot air during storage

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterial pathogen, which causes severe gastric problems to a major part of the world population, being these problems more pronounced in the third world. Traditional treatments with antibiotics are sometimes not effective due either to the appearance of antibiotic-resistant pathogens or to their side effects. Recent studies have shown that some strains of *Lactobacillus* genus are effective in the treatment against *Helicobacter pylori* reducing its gut colonization. The beneficial properties of this probiotic against the pathogen have fostered its incorporation in certain foodstuff. Nevertheless, the survival of microorganisms in non-lactic origin foodstuffs is quite limited.

In this Final Degree Project, we have proposed to develop a probiotic snack by vacuum impregnation with different clementine juices inoculated with *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius* and subsequent drying with hot air up to two levels of water activity: 0.45 and 0.35. To promote microbial growth and resistance of the probiotic to the conditions of processing and subsequent storage, simple techniques of process engineering have been tried, such as the addition of trehalose and the application of high homogenization pressures.

According to the results obtained, drying with air at 40 °C is not a suitable technique for the stabilization of the product impregnated with the probiotic microorganism, since it reduces to values below of 10^7 CFU / g the microbial content of the same. Neither the addition of trehalose to the impregnation liquid formulation nor the homogenization of the same at 100 MPa improved the counts in the dehydrated product or significantly reduced the viability loss during the 30 days of snack storage. On the other hand, the water activity of the samples at the end of drying was a decisive factor in the stability of the probiotic during storage, it being advisable in these cases to reach values around 0.35. Similar results were obtained for the antioxidant properties, which in this case were significantly improved as a result of the removal of water during the drying process.

Key words: trehalose, homogenization, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, vacuum impregnation, antioxidants.

Alumno: Jacobo Martin Lajara
Tutora: Cristina Barrera Puigdollers
Cotutora: Lucía Seguí Gil
Tutora experimental: Cristina Gabriela Burca

VALENCIA, Junio de 2017

DEDICATORIA

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas las personas que me han ayudado a realizar mi Trabajo de Final de Grado.

A Cristina Burca por ayudarme en la parte de microbiología de mi parte experimental y aportarme nuevos conocimientos microbiológicos.

A Laura Calabuig por solventarme cualquier duda que me surgiera en la realización de mi experimento.

Y en especial a Cristina Barrera, por orientarme como es debido en el Trabajo de Final de Grado.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Infección por <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1. Descripción general	1
1.1.2. Tratamiento tradicional de la infección	1
1.1.3. Tratamiento alternativo con probióticos	2
1.2. Probióticos	3
1.2.1. Definición, beneficios y valor terapéutico	3
1.2.2. Principales alimentos probióticos	5
1.2.2.1. Productos lácteos	5
1.2.2.2. Carne y productos cárnicos	7
1.2.2.3. Productos de origen vegetal	7
1.3. La ingeniería de procesos alimentarios para el desarrollo de alimentos probióticos	10
1.3.1. Aplicación de altas presiones de homogeneización	10
1.3.2. Microencapsulación	10
1.3.3. Técnicas de formulación	11
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	12
3. MATERIAL Y METODOS	13
3.1. Materias primas	13
3.2. Preparación de los líquidos de impregnación	13
3.3. Operaciones unitarias	13
3.3.1. Impregnación a vacío	14
3.3.2. Secado por aire caliente	14
3.3.3. Almacenamiento	14
3.4. Determinaciones analíticas	14
3.4.1. Humedad	15
3.4.2. Actividad del agua	15
3.4.3. Propiedades mecánicas	15
3.4.4. Propiedades ópticas	15
3.4.5. Propiedades antioxidantes	16
3.4.6. Propiedades microbiológicas	17
3.5. Análisis estadístico	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Efecto de las variables de proceso sobre el contenido en <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i>	18
4.2. Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades antioxidantes	21
4.3. Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades ópticas	23
4.4. Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades mecánicas	25
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Líquidos de impregnación empleados en este estudio.	13
Tabla 4.1. Resultados obtenidos tras el ajuste lineal de los datos experimentales con un nivel de confianza del 99%.	20
Tabla 4.2. Evolución de la humedad, la actividad del agua y las propiedades mecánicas de las muestras de manzana deshidratadas durante el almacenamiento. Media (desviación típica).	26

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* según la región de nacimiento. **1**
- Figura 2.** Principales microorganismos utilizados como probióticos. **4**
- Figura 3.1.** Diagrama de flujo empleado en el presente estudio para obtener snacks de manzana y manzana mínimamente procesada con efecto probiótico. **14**
- Figura 4.1.** Efecto de la adición de trehalosa y/o de la homogeneización sobre la concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en zumo de clementina y en manzana impregnada. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). **18**
- Figura 4.2.** Efecto de la adición de trehalosa y/o de la homogeneización sobre la concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en manzana secada con aire a 40 °C hasta un determinado valor de actividad del agua. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). **19**
- Figura 4.3.** Evolución durante el almacenamiento del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en muestras secas en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). **20**
- Figura 4.4.** Contenido en fenoles totales en manzana impregnada y deshidratada, antes y después de 30 días de almacenamiento, en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). **21**
- Figura 4.5.** Contenido en flavonoides totales en manzana impregnada y deshidratada, antes y después de 30 días de almacenamiento, en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). **21**
- Figura 4.6.** Actividad antioxidante de manzana impregnada y deshidratada, antes y después de 30 días de almacenamiento, en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05). **22**
- Figura 4.7.** Coordenadas L^* , a^* y b^* de las muestras de manzana impregnada y secada por aire caliente hasta niveles de actividad del agua de 0,35 y 0,45. **23**
- Figura 4.8.** Evolución de las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* de las muestras deshidratadas hasta diferentes niveles de actividad del agua durante su almacenamiento. **24**

Figura 4.9. Variaciones de color experimentadas por las muestras deshidratadas hasta diferentes niveles de actividad del agua durante su almacenamiento. Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$). **25**

Figura 4.10. Variación de la Fuerza máxima y la distancia en la muestra 0%_0MPa recién impregnada, al inicio del almacenamiento y al final del almacenamiento en sus dos niveles de actividad del agua de 0,35 y 0,45. **25**

Figura 4.11. Valores de fuerza máxima necesaria para romper las muestras impregnadas y deshidratadas durante su almacenamiento en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$). **27**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Infección por *Helicobacter pylori*

1.1.1. Descripción general

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, curva, que mide aproximadamente 3,5 x 0,5 micras y posee múltiples flagelos en uno de sus polos. Es activamente móvil, microaerófila y coloniza la capa de mucosa del epitelio gástrico (Blaser, 1992; 1991; Doing et al., 1994).

Desde que fuera identificada por primera vez a partir de biopsias gástricas por Marshall y Warren en 1984, *Helicobacter pylori* es considerada agente etiológico causal de enfermedades gastrointestinales tales como gastritis crónica activa, úlcera péptica y carcinoma gástrico (Piccolomini et al., 1999). Estudios epidemiológicos muestran que la infección ocasionada por *Helicobacter pylori* es la segunda causa de morbilidad en todo el mundo. En países desarrollados, la incidencia de la infección es menor en la población infantil (de 0,5 a 1% por año) que en la adulta (entorno al 50% a la edad de 60 años), mientras que en países en vías de desarrollo la mayoría de las personas están infectadas con *Helicobacter pylori* a la edad promedio de 10 años (Figura 1), lo que parece estar relacionado con el hacinamiento y las prácticas pobres de higiene (Blaser, 1992; 1991; Doing et al., 1994).

Se desconoce la existencia de un reservorio no humano y, aunque se ha descrito que las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de gatos y perros son idénticas a las de humanos, se requieren más estudios que establezcan la posible zoonosis. Tampoco se conoce exactamente la vía de transmisión de persona a persona aunque, dada la elevada tasa de morbilidad, ésta debe ser bastante común (por vía oral-oral o fecal-oral) (Harris et al., 1996). En general, la identificación de los reservorios y las rutas de infección se ha visto obstaculizada por la dificultad de aislar el patógeno del ambiente (Jiang et al., 2000).

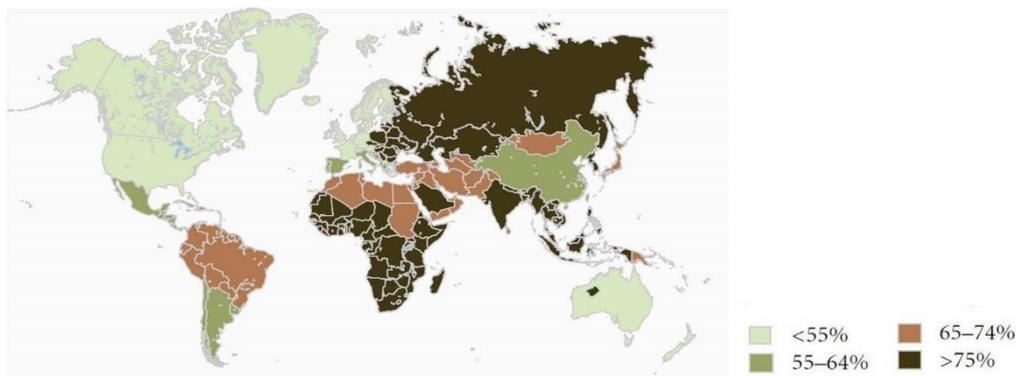


Figura 1. Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* según la región de nacimiento.

1.1.2. Tratamiento tradicional de la infección

El tratamiento más recomendado es la terapia triple con claritromicina, amoxicilina y un inhibidor de la bomba de protones (terapia de primera línea). En sujetos con alergia a la penicilina, el metronidazol puede reemplazar a la amoxicilina. Sin embargo, la eficacia de esta terapia ha disminuido en los últimos años debido a la creciente resistencia bacteriana, por lo que no se recomienda su empleo en poblaciones con tasas de resistencia a la claritromicina superiores al 15-20% y al metronidazol por encima del 40%. Como alternativa a este

tratamiento, la Academia Americana de Gastroenterología recomienda la terapia cuádruple con bismuto, metronidazol, tetraciclina y un inhibidor de la bomba de protones durante un periodo de 7 a 14 días (Chey et al., 2007). Su principal inconveniente es su complejidad y la gran cantidad de efectos adversos asociados (Chey et al., 2007; Malfertheiner et al., 2007). Los inhibidores de la bomba de protones causan cefalea y diarrea en un 10% de los pacientes. La claritromicina produce malestar gástrico, diarrea y alteración del sentido del gusto. La amoxicilina se asocia con malestar gástrico, cefalea y diarrea. El metronidazol causa sabor metálico en boca, dispepsia y efecto antabus en el caso de la ingesta de alcohol. La tetraciclina se asocia con malestar gástrico y fotosensibilidad y no se debe utilizar en niños menores de 8 años, al causarles decoloración en los dientes. Por último, los compuestos con bismuto ocasionan náuseas, malestar gástrico y oscurecimiento de lengua y heces.

En aquellos pacientes que no respondan a la terapia de primera y segunda línea se recomienda realizar un estudio de sensibilidad antibiótica, pero el coste del cultivo es elevado, además del tiempo que implica (Chey et al., 2007; Gisbert et al., 2006; Gisbert et al., 2008; Malfertheiner et al., 2007; Saad et al., 2006). En estos casos, el tratamiento con rifabutina, levofloxacina y furazolidona ha proporcionado buenos resultados (Chey et al., 2007). La levofloxacina ha mostrado índices de erradicación elevados, desde el 63 al 94%, además de una excelente adherencia (Chey et al., 2007; Gisbert et al., 2006; Gisbert et al., 2008; Saad et al., 2006). La terapia con rifabutina también presenta índices de erradicación que varían desde el 38% hasta el 91%, pero su elevado coste y su asociación con toxicidad severa a nivel medular y ocular condicionan mucho su empleo. Como alternativa a la claritromicina, el metronidazol y la amoxicilina en la terapia triple, la furazolidona presenta índices de erradicación que van desde el 52% hasta el 90%, por lo que ha reemplazado al metronidazol en países en los cuales la resistencia a este mismo es elevada y el coste de las con claritromicina es prohibitivo (Chey et al., 2007; Ramírez et al., 2004; Ramírez, 2006).

1.1.3. Tratamiento alternativo con probióticos

Como alternativa al tratamiento tradicional con antibióticos, diversos estudios clínicos y modelos *in vitro* demuestran que la asociación de bacterias probióticas (de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces*) con antibióticos para el tratamiento de *Helicobacter pylori* ejerce un efecto antagonista frente a este microorganismo y reduce los síntomas de intolerancia digestiva debidos a los antibióticos (Boltin, 2016). El mecanismo de acción de los probióticos es bastante complejo y diverso, ejerciendo acción directa e indirecta sobre la bacteria *Helicobacter pylori*, la flora intestinal, así como sobre la mucosa y la respuesta inmunológica del huésped (Boirivant et al., 2007; Bortoli et al., 2007).

A nivel de laboratorio se ha demostrado que *Lactobacillus acidophilus* es capaz de amortiguar las reacciones metabólicas desencadenadas por este patógeno y que estimulan la formación de precursores de la respuesta pro-inflamatoria (Yang et al., 2012). Por otra parte, mediante la secreción de ácido láctico, los lactobacilos pueden atenuar la hipoclorhidria asociada a la infección con *Helicobacter pylori*. De esta forma, no solo se restaura el pH luminal como mecanismo gástrico de defensa, sino que también, en respuesta a la elevada concentración de ácido láctico en el estómago, se induce la producción de prostaglandinas endógenas protectoras de la mucosa gástrica (Cats et al., 2003; Sgouras et al., 2004; Sykora et al., 2005; Uchida et al., 2004). Además del ácido láctico, los probióticos secretan otros metabolitos con actividad bacteriostática o bactericida (De Keersmaecker et al., 2006). A modo de ejemplo, *Lactobacillus reuteri* secreta reuterina, activa frente a diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas,

hongos, protozoos y levaduras (Spinler et al., 2008). Finalmente, se ha observado que ciertos lactobacilos (en especial, *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* y *Lactobacillus acidophilus*) son resistentes al pH gástrico, pudiendo residir en el estómago humano de manera transitoria (Marteau et al., 1997), compitiendo por los sitios de unión al huésped e inhibiendo la colonización por *Helicobacter pylori*. Estudios publicados recientemente muestran todavía mejores tasas de erradicación de *Helicobacter pylori* cuando los probióticos se administran junto a otros compuestos con actividad antimicrobiana, como es el caso de la lactoferrina bovina (Boirivant et al., 2007; Bortoli et al., 2007), lo que conlleva un todavía mayor incremento del coste del tratamiento.

1.2. Probióticos

1.2.1. Definición, beneficios y valor terapéutico

El término probióticos fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell. En 1989, Roy Fuller subrayó el hecho de que, para que un microorganismo se considerara probiótico, debía estar vivo y ejercer un efecto beneficioso (Guarner et al., 2011). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor” (FAO/OMS, 2001; Suárez, 2015). Según algunos autores, es necesario ingerir diariamente una cantidad 10^9 UFC para que ejerzan su función ya que, si se toman de forma alterna (2-3 días a la semana), su acción es menor o casi imperceptible (Pardo et al., 2013). Entre los efectos beneficiosos asociados a la ingesta de probióticos cabe destacar:

- Reducción de los síntomas asociados a la intolerancia a la lactosa: por una parte, mediante la liberación de β -galactosidasa en el intestino delgado, determinados probióticos (*Sacharomyces thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*) mejoran la digestión de la lactosa; por otra parte, mediante fermentación láctica, los probióticos disminuyen la concentración de lactosa presente en determinados alimentos de forma natural (De Brese et al., 2001; Kolars et al., 1984).
- Estimulación de la respuesta inmune: algunos probióticos (*Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus rhamnosus*) aumentan la actividad de las células “natural killers” (NK) y la fagocitosis, produciendo cambios en los perfiles de citoquina y aumentando los niveles de inmunoglobulinas (Perdigón et al., 2000 & 2002).
- Efecto gastro-protector: los probióticos resultan efectivos para el tratamiento de diversos trastornos relacionados con el aparato digestivo, tales como el estreñimiento, la diarrea aguda (especialmente la de origen vírico y la causada por la ingesta de antibióticos), los cólicos en lactantes y el síndrome del intestino irritable, además de la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*, ya comentada anteriormente. Destacan *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces boulardii* por su efectividad en reducir la duración de la diarrea aguda asociada a la infección por rotavirus (Alam et al., 2003; Gaon et al., 2003; Rosenfeldt et al., 2002). También está muy extendido el uso de bifidobacterias probióticas que promueven la producción de ácido acético y otros ácidos orgánicos que estimulan la peristalsis y regulan el tránsito intestinal (Marteau et al., 2002; Meance et al., 2001;2003).
- Prevención de reacciones alérgicas: aunque está demostrado que los individuos que padecen algún tipo de alergia poseen una micro flora caracterizada por un desequilibrio entre las células Th1 y Th2 a favor de las Th2 y que los probióticos son capaces de modular el sistema inmune y restablecer el equilibrio, los ensayos llevados a cabo en

humanos no permiten concluir que los probióticos sean efectivos en todos los casos para el tratamiento o la prevención de la dermatitis atópica, la rinitis alérgica o el asma bronquial (Michail, 2009).

- **Efecto hipocolesterolémico:** aunque algunos estudios *in vivo* ponen de manifiesto que la ingesta de ciertos probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*) contribuye en la mejora del perfil lipídico, incluida la reducción de los niveles totales de colesterol, triglicéridos y colesterol de baja densidad o LDL, y el aumento en los niveles de colesterol de alta densidad o HDL, se necesitan más evidencias clínicas para poder utilizar este efecto como reclamo comercial (Ooi y Liong, 2010).
- **Tratamiento de trastornos del desarrollo neurológico:** recientes estudios avalan la idea de que existe una conexión entre la microbiota del intestino y el cerebro, de manera que enfermedades tales como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, el trastorno de espectro autista o la depresión podrían diagnosticarse a partir de la cantidad y el tipo de bacterias presentes en el intestino o tratarse actuando sobre la composición de la microbiota (Gilbert et al., 2013).
- **Prevención de infecciones del tracto urinario:** estudios clínicos confirman que los lactobacilos dominan la flora urogenital de mujeres pre menopáusicas sanas y que la restauración de la flora urogenital dominada por uropatógenos con lactobacilos (especialmente *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus reuteri*), reduce de forma notable la incidencia de estas infecciones (Falagas et al., 2006).

En principio, cualquier microorganismo de la microbiota puede ser un probiótico, pero en la práctica la mayoría son bacterias Gram positivas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (figura 2). Esto se debe a que son los únicos géneros inocuos en casi cualquier circunstancia y han sido reconocidos como ingredientes GRAS (Generally Recognized As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la FDA (Food and Drug Administration) y la EFSA (European Food Safety Authority), respectivamente (Suárez, 2015).

Lactobacillus L. acidophilus L. brevis L. buchneri L. bulgaricus L. casei L. cellobiosus L. crispatus L. curvatus L. fermentum L. gasseri L. johnsonii L. kéfir L. lactis L. plantarum L. reuteri L. rhamnosus GG L. sakei L. salivarius	Bifidobacterium B. adolescentes B. bifidum B. breve B. infantis B. lactis B. longum Enterococcus E. faecalis E. faecium Streptococcus S. salivarius S. thermophilus	Sacharomyces S. boulardii S. cerevisiae Otros Lactococcus L. lactis L. cremoris L. diacetulactis Bacillus B. subtilis B. coagulans Escherichia coli Leuconostoc spp. Pediococcus acidilactici
---	--	--

Figura 2. Principales microorganismos utilizados como probióticos.

Se las conoce como bacterias ácido lácticas (BAL) por su capacidad de convertir los hidratos de carbono en ácido láctico y pueden ser homofermentativas (si solo producen ácido láctico) o

heterofermentativas (si además producen cantidades importantes de dióxido de carbono, ácido acético y/o etanol). Son microorganismos anaerobios facultativos y/o microaerófilos, que requieren de un aporte externo de nutrientes que no pueden sintetizar ellos mismos (auxótrofos), capaces de crecer en el rango de pH entre 4,5 y 6,4 y entre 35 y 40 °C (entre mesófilos y termófilos). Las tres especies más utilizadas y estudiadas son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium* spp. (Ortega et al., 2002).

1.2.2. Principales alimentos probióticos

La mayoría de los probióticos se comercializan en forma de alimentos o suplementos alimentarios. Es por esto que, además de ser seguros para su consumo y tener una eficiencia científicamente probada, los probióticos, para ejercer su efecto beneficioso, han de ser resistentes a los procesos de producción y almacenamiento industrial, así como a las condiciones ácidas del estómago y a los enzimas digestivos del tracto (Mattila-Sandholm et al., 2002). Adicionalmente, en el caso de los probióticos incorporados en la formulación de alimentos, será necesario que no produzcan cambios desagradables en las propiedades organolépticas (textura, sabor, aroma, etc.) de los mismos.

Respecto a la ingesta de probióticos en forma de suplementos alimentarios, la principal ventaja que presenta es que permite combinar en una sola píldora hasta 50 billones de UFC pertenecientes a más de 30 especies diferentes. Sin embargo, los microorganismos presentes en estos productos no suelen encontrarse en forma activa, no son tan resistentes a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y necesitan mucho más tiempo para colonizar el intestino del huésped, por no hablar de su menor eficacia funcional debido a la exclusión del potencial efecto sinérgico con otros compuestos. Es por esto que suele ser más recomendable la ingesta de probióticos en forma de alimentos fermentados (BodyEcology, 2010).

El pH de los alimentos, su contenido en grasa, la concentración y el tipo de proteínas y azúcares son, junto a las condiciones de procesado y almacenamiento, algunos de los principales factores que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los probióticos en las diferentes matrices alimentarias (Ranadheera et al., 2010). Los productos lácteos, especialmente el yogur y las leches fermentadas, han sido los más utilizados hasta el momento como sustrato para el crecimiento y transporte de los microorganismos probióticos, ya que aportan un elevado número de bacterias vivas y de nutrientes altamente biodisponibles. Sin embargo, la elevada prevalencia de la hiperlipidemia y la intolerancia a la lactosa, unido al crecimiento del vegetarianismo y a la necesidad de un almacenamiento en refrigeración, han promovido el empleo de matrices alimentarias alternativas, tales como las frutas y los vegetales o los productos a base de cereales y legumbres (Granato et al., 2010; Martins et al., 2013; Peres et al., 2012). A continuación, se detallan las principales características de algunos de ellos.

1.2.2.1. Productos lácteos

a) Leches fermentadas

El término genérico de leche fermentada incluye una gran variedad de productos obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche por fermentación láctica, mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Para su mayor eficacia, esta operación unitaria se suele llevar a cabo a temperaturas no superiores a la óptima para el crecimiento de la mayoría de los probióticos y que oscilan entre 37 y 43 °C.

Dentro de las leches fermentadas, la normativa actual diferencia dos tipos: el yogur, considerado como aquel cuya fermentación se lleva a cabo mediante la incorporación de los cultivos iniciadores tradicionales (*Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) y las leches fermentadas, que incluyen al resto de productos en cuya elaboración intervienen otros cultivos iniciadores (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, etc.). No obstante, el término genérico «yogur» incluye actualmente el yogur tradicional y los pasteurizados tras la fermentación. En el etiquetado se debe diferenciar entre ambos (RD 179/2003) ya que, aunque posean una composición química prácticamente idéntica, la pasteurización destruye la flora láctica y los efectos beneficiosos a ella atribuidos. En el caso de los yogures tradicionales, su formulación con leche desnatada en lugar de entera, así como la inclusión de pulpas de determinadas frutas (mango y fresa) o concentraciones adecuadas de ciertos prebióticos (inulina, FOS, etc.) permite obtener mayores recuentos al final de la vida útil (Ranadheera et al., 2010).

Como portador de microorganismos probióticos, el queso presenta ciertas ventajas respecto a otros productos lácteos, debido a su menor acidez. Hay diferentes tipos de quesos probióticos en el mercado que incorporan bifidobacterias y/o lactobacilos de origen humano en su composición, los cuales son añadidos al queso natural rayado, a los cultivos iniciadores del queso o directamente a la leche o al cuajo (Songisepp et al., 2004). Suelen ser quesos frescos o untables que no han sido sometidos a una etapa de curado, puesto que las altas temperaturas empleadas en la misma, junto a la bajada de pH y al aumento en la concentración de sal en el producto, causan una pérdida importante en la viabilidad de cualquier microorganismo (Ranadheera et al., 2010).

b) Helados y postres congelados

En el proceso de fabricación de helados y postres congelados se suceden distintas operaciones unitarias con un impacto negativo sobre la supervivencia de los microorganismos con efecto probiótico. Por un lado, en las etapas de mezclado y batido (necesarias para mezclar todos los ingredientes y garantizar la cremosidad del producto final) se incorpora oxígeno a la mezcla y se rompen estructuras por estrés mecánico. Por otro lado, durante la etapa de congelación se forman cristales de hielo, de mayor o menor tamaño, que provocan la concentración de solutos en determinadas zonas y la rotura de las membranas biológicas. Cuanto más lenta sea la congelación, más grandes serán los cristales de hielo formados, causando un mayor daño a las células y un mayor descenso en su actividad metabólica. Por tanto, un congelado rápido resulta en una mayor viabilidad de los microorganismos incorporados en el producto (Tripathi y Giri, 2014). Adicionalmente, mediante la incorporación de ingredientes con efecto prebiótico y/o crioprotector a la formulación del helado, es posible aumentar el recuento de viables, no solo al final de su vida útil, sino también al final de su paso por el tracto gastrointestinal (Ranadheera et al., 2010).

c) Leche en polvo y fórmulas infantiles

El secado por atomización es el método más empleado para la deshidratación de alimentos líquidos, permitiendo obtener polvos estables y con un tamaño de partícula adecuado para su posterior rehidratación. Sin embargo, por exposición a elevadas temperaturas, cizallamiento mecánico, deshidratación y presión osmótica, ejerce un impacto negativo sobre la viabilidad de cualquier microorganismo, incluidos los probióticos. Como alternativa, la liofilización o secado por congelación y posterior sublimación del agua congelada, garantiza la supervivencia de los

probióticos, pero debido a su elevado coste solo se aplica a productos con un alto valor añadido (Tripathi y Giri, 2014). Lo que se suele hacer en estos casos es microencapsular los microorganismos con efecto beneficioso para la salud mediante el empleo de recubrimientos comestibles que además aumentan su resistencia al proceso de digestión y permiten su liberación controlada en determinados puntos del tracto gastrointestinal (Mattila-Sandholm et al., 2002). La microencapsulación también contribuye en la mayor resistencia de los probióticos presentes en las fórmulas infantiles a la rehidratación con agua a temperatura por encima de 70 °C que recomienda la Organización Mundial de la Salud para minimizar el riesgo de contraer alguna infección mortal (Collier, 2009).

1.2.2.2. Carne y productos cárnicos

La conservación de la carne mediante fermentación a través de microorganismos se ha utilizado durante miles de años. Durante la transformación se forman numerosas sustancias en los productos, tales como ácido láctico, ácido pirúvico, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos, que dan estabilidad y calidad al producto final.

Hoy en día es una práctica bastante común en la fabricación de productos curados crudos la aplicación de cultivos iniciadores de la fermentación, es decir, preparaciones que contienen microorganismos vivos o adormecidos que desarrollan su actividad metabólica durante la fermentación del sustrato. La selección de cada microorganismo es esencial en función de las propiedades que se persigan en el producto final. Los microorganismos iniciadores de la fermentación más empleados en la industria cárnica son: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*, la mayoría con potencial efecto probiótico (Kołożyn-Krajewska et al., 2012). Además, con la finalidad de obtener un alimento probiótico, la selección del cultivo iniciador estará condicionada por su mayor o menor resistencia a las condiciones elevado contenido en sal y baja actividad del agua que se alcanzan en el producto fermentado al final del procesado. En general, por su elevado pH en comparación con otros alimentos, los productos cárnicos confieren mayor protección a las bacterias ácido-lácticas frente a la acción letal de la bilis (Khan et al., 2011).

1.2.2.3. Productos de origen vegetal

El tejido vegetal está formado por un sistema multifase, con una microestructura constituida por células internas, espacios intercelulares, poros y capilares. La pared celular, cuando está intacta, es una eficiente barrera que frena la entrada de microorganismos (Bracket y Splittstoesser, 2001), ya que el tamaño de sus poros es lo suficientemente pequeño (entre 0,1 y 5,0 µm) como para permitir el acceso de las bacterias (Alzamora et al., 2005). Sin embargo, una vez peladas y cortadas, las frutas y hortalizas resultan una matriz excelente para el crecimiento de microorganismos con efecto probiótico, debido a su elevado contenido en minerales, vitaminas, antioxidantes y fibra (Soccol et al., 2010), que también confieren cierta protección a su paso a través del tracto gastrointestinal. Cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* son las más empleadas en la formulación de alimentos probióticos de origen vegetal.

a) Encurtidos vegetales

Según estudios recientes (Peres et al., 2012), algunas cepas del género *Lactobacillus* empleadas en la fabricación de encurtidos vegetales (olivas de mesa, pepinillos, col agria, alcachofas, etc.) por su tolerancia a las condiciones de acidez relativa y elevada salinidad propias de este tipo de productos, podrían ser consideradas como cepas probióticas debido a su elevada supervivencia en condiciones que simulan el proceso gastrointestinal, su capacidad para adherirse a la mucosa intestinal y vaginal del huésped y su comportamiento defensivo frente al ataque de diferentes patógenos. Como resultado de la fermentación, no solo se producen los cambios deseados en las propiedades organolépticas y los cambios necesarios para extender la vida útil del producto final (Martins et al., 2013), sino que se obtienen recuentos microbianos similares o incluso superiores a los obtenidos en productos lácteos (Ranadheera et al., 2010).

b) Zumos y bebidas

Los zumos y batidos de frutas (“smoothies”) han cobrado gran importancia en los últimos años como alternativa a los productos lácteos para la formulación de alimentos probióticos. El principal inconveniente que presentan estos productos es que, debido a su bajo pH y su elevado contenido en compuestos fenólicos con efecto antimicrobiano, el crecimiento de microorganismos con efecto beneficioso para la salud se puede ver limitado. A pesar de ello, ha sido posible obtener zumos fermentados a partir de tomate, remolacha, naranja o melón con concentraciones superiores a 10^7 UFC/mL al final de su vida útil (Martins et al., 2013). Como era de esperar, la adición en estos casos de alguna fuente de proteína, ya sea de origen lácteo o no, y/o de probióticos tiene efecto positivo directo sobre el recuento de viables, tanto en el propio producto como al final de la digestión (Thakur et al., 2015).

Otro aspecto a tener en cuenta en la elaboración de zumos fermentados con microorganismos probióticos es que el tratamiento térmico necesario para inactivar enzimas y destruir otros microorganismos responsables de deterioro se ha de aplicar al zumo antes de su inoculación. La pasteurización implica la exposición del producto a altas temperaturas (≈ 70 °C) durante un periodo de tiempo breve (15 segundos), lo que podría afectar negativamente a la viabilidad de cualquier microorganismo que no sea termorresistente. En estos casos, es aconsejable añadir el/los probiótico/s durante el periodo de bajada de temperatura (Tripathi y Giri, 2014).

c) Vegetales mínimamente procesados

Existen técnicas de ingeniería de matrices, tales como la impregnación a vacío, que ha sido patentada por su efectividad en la incorporación de compuestos con actividad funcional (incluidos los probióticos) en la matriz estructural de tejidos celulares sin causar grandes cambios en las propiedades organolépticas de los mismos (Patente P99 02730-5: Procedimiento de impregnación de alimentos naturales con productos nutraceuticos y dispositivo para su puesta en práctica). El espacio intercelular de los tejidos vegetales juega un papel muy importante en este proceso, pudiendo albergar (debido a su gran tamaño) bacterias en su interior. La manzana, en la que los poros representan entre el 22 y el 25% del volumen total del tejido parenquimático, resulta uno de los mejores sustratos para la incorporación de probióticos mediante la técnica de impregnación a vacío (Alzamora et al., 2005). En un estudio llevado a cabo con manzanas de la variedad Granny Smith, Betoret et al. (2012) alcanzaron recuentos del orden de 10^8 UFC por gramo de manzana impregnada, utilizando zumo de mandarina rectificado e inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* como líquido de impregnación. Aunque

el posterior secado de las muestras de manzana impregnadas con aire a 40 °C durante 24 horas redujo ligeramente el contenido microbiano de las mismas, éste resultó lo suficientemente elevado como para poder atribuir al snack el calificativo de probiótico. Sin embargo, tras 15 días de almacenamiento en condiciones adecuadas se registraron recuentos por debajo de 10³ UFC/g, lo que podría deberse a la actividad del agua alcanzada por las muestras al final del secado, la cual resultó no ser lo suficientemente baja como para evitar las reacciones de oxidación lipídica (Nualkaekul et al., 2011).

Otros estudios muestran el potencial que presentan frutas distintas a la manzana (guayaba, banana, melón) como portadoras de bacterias probióticas (Martins et al., 2013). En estos casos, las observaciones microscópicas de los tejidos impregnados pusieron de manifiesto que las bacterias estaban fuertemente adheridas al tejido vegetal, lo que podría estar favorecido por la presencia de elevadas concentraciones de celulosa. Este polisacárido que no puede ser digerido por el sistema gastrointestinal humano, sería también el responsable de mantener la integridad celular de las bacterias probióticas, permitiendo que llegaran intactas al colon y ejercieran su efecto beneficioso.

d) Cereales

Las bebidas fermentadas a base de cereales son probablemente los alimentos probióticos más antiguos que se conocen. Los cereales, desde el grano integral hasta la harina, contienen de origen sustancias prebióticas (fibra soluble, oligosacáridos y almidón resistente) capaces de proteger a los microorganismos probióticos frente a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y de estimular su crecimiento a nivel del colon. Los granos enteros son además una fuente importante de compuestos fitoquímicos, incluidos fitoestrógenos, compuestos fenólicos, antioxidantes, ácido fítico y esteroides, aunque resultan deficientes en proteínas y aminoácidos esenciales (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Cereales como el maíz y el arroz consiguen mediante la fermentación aumentar su digestibilidad y la biodisponibilidad de sus nutrientes, lo que resulta especialmente interesante teniendo en cuenta que son la base de la alimentación en Latinoamérica y Asia respectivamente (Soccol et al., 2010).

Otros productos a base de cereales (pan, galletas, barritas de cereales, cereales de desayuno, etc.) han sido evaluados como soportes potenciales de probióticos (Lamsal y Faubion, 2009). Debido a la elevada temperatura necesaria durante el horneado de este tipo de productos, se recomienda emplear en su formulación cepas probióticas que sean resistentes al calor, tales como *Bacillus subtilis* (Côté et al., 2013). Aunque la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* sea sensible al calor, se mantiene estable tras rociarse sobre la superficie del producto horneado, por lo que también resulta adecuada para la fabricación de productos horneados con efecto probiótico.

Por sus propiedades, los cereales también son empleados como ingredientes para encapsular probióticos y mantener la viabilidad y funcionalidad de los mismos en condiciones adversas como las que se dan durante el procesado, la conservación o la digestión.

e) Legumbres (soja)

La soja y los productos derivados de ella se caracterizan por su elevado contenido en proteínas de alta calidad y otros compuestos con efecto probado en la prevención de la arterosclerosis, el cáncer, la osteoporosis y los síntomas adversos propios de la menopausia (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Aunque presentan un sabor desagradable y contienen rafinosa y

estaquiosa que causan flatulencia, su fermentación con bacterias probióticas es una buena alternativa para aumentar su digestibilidad y mejorar sus propiedades organolépticas. Diversos estudios ponen de manifiesto que la leche de soja es un buen sustrato para el crecimiento de diversos lactobacilos (*L. casei*, *L. helveticus*, *L. fermenti*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* y *L. reuteri*) y que sus propiedades antioxidantes se ven mejoradas tras la fermentación. También se han fabricado postres congelados que contienen leche de soja y probióticos, en los que el daño causado a las células durante el proceso de congelación resultó ser dependiente de la cepa empleada. Por otra parte, se ha logrado elaborar queso con buenos atributos sensoriales y recuento de probióticos superior a 10^7 UFC/g a partir de leche de soja fermentada con cultivos iniciadores y *Lactobacillus rhamnosus*. En la fabricación de yogures de soja se ha podido comprobar que determinadas cepas probióticas (*L. rhamnosus* y *L. johnsonii*) crecían mejor que en la leche de vaca utilizada tradicionalmente. Finalmente, aunque en la fermentación de los granos de soja para la fabricación de tempeh se emplea un hongo del género *Rhizopus* como cultivo iniciador, algunos estudios ponen de manifiesto que estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas presentes en el tracto gastrointestinal, en mayor o menor proporción dependiendo de si se ingiere cocinado o no (Kuligowski et al., 2013).

1.3. La ingeniería de procesos alimentarios para el desarrollo de alimentos probióticos

1.3.1. Aplicación de altas presiones de homogeneización

Es sabido que el procesado a altas temperaturas (escaldado, cocción, pasteurización, esterilización, etc.) produce efectos indeseados en los alimentos, tales como el pardeamiento no enzimático, la aparición de sabores extraños o la pérdida de nutrientes, principalmente vitaminas y compuestos con actividad antioxidante (Patrignani et al., 2013). Como alternativa para la producción de alimentos libres de conservantes y que experimenten un cambio mínimo en sus propiedades organolépticas, fisicoquímicas y nutricionales, surge la aplicación de altas presiones de homogeneización. Se trata de una técnica que, sin aplicar calor, garantiza la inactivación microbiana de alimentos líquidos, aunque la temperatura de los mismos se eleva ligeramente (< 1 °C/MPa) por fricción durante su paso por la válvula de homogeneización. Por otro lado, la aplicación de altas presiones de homogeneización produce importantes cambios físicos, tales como la reducción en el tamaño de los sólidos suspendidos, con un efecto directo sobre la estabilidad y la biodisponibilidad de los compuestos con actividad antioxidante a ellos unidos.

Por lo que respecta a su aplicación en la elaboración de alimentos enriquecidos en probióticos, algunos estudios ponen de manifiesto un aumento en la supervivencia de algunas cepas con efecto probiótico, así como una mejora en sus propiedades funcionales tras la homogeneización a presiones sub-letales (< 150 MPa) (Patrignani et al., 2009). En ensayos llevados a cabo con cepas del género *Lactobacillus*, la aplicación de altas presiones aumentó su hidrofobicidad, directamente relacionada con su capacidad de adhesión a las células intestinales y su resistencia al proceso de digestión (Betoret et al., In Press; Tabanelli et al., 2012).

1.3.2. Microencapsulación

La microencapsulación es una tecnología de empaquetamiento en miniatura de materiales sólidos, líquidos y gaseosos, de cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a tiempos controlados bajo la influencia de condiciones específicas (Anal y Stevens, 2005; Anal, et al., 2006; Kailasapathy y Masondole, 2005). Una microcápsula consiste en una membrana semipermeable,

delgada, fuerte y esférica que envuelve un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que varía de pocas micras a 1 milímetro.

La encapsulación puede tener muchos usos en la industria alimentaria, incluyendo la de estabilizar el material del núcleo, controlar las reacciones de oxidación, proporcionar una liberación controlada y sostenida, enmascarar sabores, olores y colores, extender la vida útil o proteger componentes de la pérdida nutricional. Los polímeros de uso alimentario tales como alginato, quitosano, y carboxymetil celulosa, carragenatos, gelatinas y pectinas son los principalmente usados para la formación de las cápsulas por diferentes métodos. Su aplicación para encapsular microorganismos con efecto probiótico persigue aumentar su supervivencia frente a condiciones adversas como las que se dan durante el procesado o su paso a través del tracto gastrointestinal.

Como se ha comentado anteriormente, las microcápsulas y microesferas pueden ser diseñadas para una liberación gradual de ingredientes activos. Una microcápsula puede liberar su contenido por diferentes medios, incluyendo fractura por calor, solvatación, difusión y presión (Brannon-Peppas, 1997). El revestimiento debe ser diseñado para abrirse en áreas específicas del cuerpo. Si la microcápsula contiene materiales ácido-lábiles, estos podrán ser degradados por los fluidos gastrointestinales. Si a su vez la microcápsula tiene un revestimiento que la mantiene intacta a su paso a través del estómago, estos compuestos no serán liberados hasta pasado el estómago (Anal et al., 2003; Anal y Stevens, 2005).

1.3.3. Técnicas de formulación

Como se ha comentado en apartados anteriores, son muchos los ingredientes que se pueden añadir a la formulación de los alimentos con la finalidad de aumentar en ellos el recuento de viables. Sin embargo, nos centraremos en la trehalosa por tratarse del disacárido empleado en el presente estudio.

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa que se encuentra presente en una amplia gama de organismos, en los que actúa como azúcar de reserva y como protector frente al estrés abiótico. La trehalosa posee amplias aplicaciones biotecnológicas ya que protege proteínas y membranas biológicas, lo que permite su uso como preservador de alimentos, enzimas, vacunas, células, tejidos y órganos, además de su empleo como sustituto de la sacarosa en productos de panadería y bollería (Ohtake y Wang, 2011). En la protección de las proteínas, la trehalosa forma una capsula a alrededor de las mismas y preserva su estructura terciaria (Lins et al., 2004). Durante los procesos de deshidratación, la trehalosa interacciona con las membranas para mantener el estado fluido y prevenir la fusión, la separación de fases y la rotura de las mismas (Crowe et al., 1984). También se ha demostrado el efecto crioprotector de la trehalosa durante la congelación y posterior liofilización de cepas de *Lactobacillus acidophilus* (Conrad et al., 2000).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este Trabajo de Final de Grado consiste en mejorar la funcionalidad de un snack probiótico a base de manzana obtenido mediante impregnación a vacío con zumo de clementina inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 y posterior secado con aire a 40 °C. Para conseguir este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- evaluar el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación y/o la homogeneización del mismo a 100 MPa una vez inoculado ejercen sobre el contenido probiótico, las propiedades antioxidantes, el color y la textura de **muestras de manzana impregnadas**.
- evaluar el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación y/o la homogeneización del mismo a 100 MPa una vez inoculado ejercen sobre el contenido probiótico, las propiedades antioxidantes, el color y la textura de **muestras de manzana impregnadas y deshidratadas** con aire a 40 °C hasta alcanzar una actividad del agua de 0,45 ó 0,35.
- evaluar el efecto que la adición de un 10% en peso de trehalosa al líquido de impregnación antes de su inoculación y/o la homogeneización del mismo a 100 MPa una vez inoculado ejercen sobre el contenido probiótico, las propiedades antioxidantes, el color y la textura de **muestras de manzana impregnadas, deshidratadas hasta diferentes niveles de actividad del agua y posteriormente almacenadas durante 30 días**.

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

- 1- Formulación de los líquidos de impregnación y preparación de las láminas de manzana.
- 2- Impregnación a vacío de las láminas de manzana y análisis de las muestras impregnadas.
- 3- Secado de las muestras impregnadas con aire a 40 °C durante 18-24 horas hasta alcanzar niveles de actividad del agua en torno a 0,45 y 0,35, respectivamente.
- 4- Análisis de las muestras de manzana deshidratadas y almacenamiento en condiciones adecuadas durante 30 días.
- 5- Análisis de las muestras almacenadas a diferentes tiempos a lo largo del almacenamiento.
- 6- Tratamiento y discusión de los datos obtenidos experimentalmente.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materias primas

Como materia prima principal se utilizaron manzanas de la variedad Granny Smith, cortadas en láminas de 5 mm de espesor, 65 mm de diámetro externo y 20 mm de diámetro interno.

Para la preparación del líquido de impregnación se utilizó zumo de clementina comercial marca Hacendado y trehalosa de grado alimentario extraída a partir de almidón de tapioca (TREHA™, Cargill Ibérica, Barcelona, España).

Como microorganismo probiótico se escogió el *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 por su potencial efecto contra la infección ocasionada por *Helicobacter pylori*. Para su reactivación, las cepas liofilizadas o congeladas se suspendieron en caldo MRS estéril (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se sembraron 0,1 mL en la superficie de placas con agar MRS y se incubaron en estufa a 37 °C durante otras 24 horas. Tras un máximo de 7 días de almacenamiento a 4 °C, se recogió con asa de siembra la capa blanca crecida en la superficie de la placa con agar MRS, se introdujo en un tubo con 9 mL de caldo MRS Broth previamente esterilizado y se volvió a incubar a 37 °C durante 24 horas. De esta forma se obtuvo un caldo color pardo y con una concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* del orden de 10⁹ UFC/mL.

3.2. Preparación de los líquidos de impregnación

Se prepararon un total de 4 líquidos de impregnación (Tabla 3.1). Para el óptimo crecimiento del microorganismo probiótico en el zumo de clementina, se elevó su pH hasta 6 mediante la adición de bicarbonato sódico (9,8 g/L) y se enriqueció con 5 g/L de extracto de levadura inactivada (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), de acuerdo a las recomendaciones dadas por Betoret et al. (2012). Además, en determinados casos, se añadió trehalosa a razón de 10 g por cada 100 g de zumo. Una vez disueltos todos los ingredientes, se inocularon los líquidos resultantes con 4 mL/L de caldo MRS Broth conteniendo alrededor de 10⁹ UFC/mL del microorganismo probiótico y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo, una parte de los líquidos fermentados se homogeneizó a 100 MPa en un equipo de altas presiones (Panda Plus 2000, GEA-Niro Soavi, Parma, Italia) antes de ser empleados como líquidos de impregnación y el resto se aplicó directamente en el proceso de impregnación a vacío.

Tabla 3.1. Líquidos de impregnación empleados en este estudio.

LÍQUIDO DE IMPREGNACIÓN	[TREHALOSA] (g/100 g)	PRESIÓN (MPa)
0%_0MPa	0	0
0%_100Mpa	0	100
10%_0Mpa	10	0
10%_100MPa	10	100

3.3. Operaciones unitarias

En la Figura 3.1 se muestra el diagrama de flujo empleado en este estudio para la obtención de los snacks de manzana con alto contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*. En este mismo esquema se indican las principales determinaciones analíticas llevadas a cabo sobre los productos elaborados. A continuación, se describen de forma detallada las condiciones de proceso y de análisis.

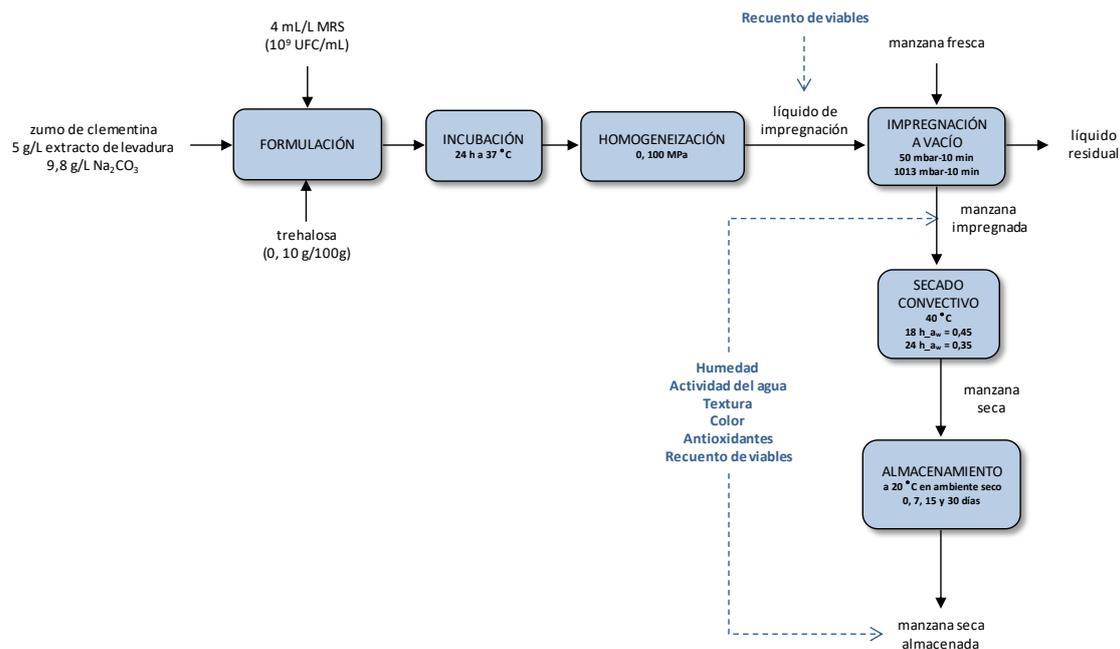


Figura 3.1. Diagrama de flujo empleado en el presente estudio para obtener snacks de manzana y manzana mínimamente procesada con efecto probiótico.

3.3.1. Impregnación a vacío

La impregnación a vacío se llevó a cabo a temperatura ambiente en una cámara hermética (Heraeus vacuum oven Thermo Fisher Scientific Inc., Alemania) conectada a una bomba de vacío (ILMVAC, Alemania). En una primera etapa, las láminas de manzana se introdujeron en el líquido de impregnación y el sistema se sometió a una presión de vacío de 50 mbar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se restauró la presión atmosférica y las muestras se mantuvieron sumergidas en el líquido durante 10 minutos más.

3.3.2. Secado por aire caliente

Para el secado de las manzanas impregnadas se utilizó un secador de bandejas CLW 750 TOP+ (Pol-Eko-Aparatura SPJ, Polonia) de flujo transversal. Los ensayos se llevaron a cabo con aire a 40 °C y una velocidad de 2 m/s. El proceso se prolongó el tiempo necesario para que las muestras alcanzaran una actividad del agua de 0,45 y 0,35.

3.3.3. Almacenamiento

Las muestras secas se almacenaron en bolsas herméticas al resguardo de la luz solar y a temperatura ambiente durante 30 días. A diferentes tiempos a lo largo del almacenamiento (7, 15 y 30 días) las muestras se analizaron en términos de humedad, actividad del agua, textura, color, propiedades antioxidantes y contenido probiótico.

3.4. Determinaciones analíticas

Las determinaciones analíticas descritas en este apartado se realizaron, al menos, por triplicado sobre los líquidos de impregnación y/o las muestras sólidas de manzana en diferentes instantes a lo largo del proceso de elaboración de las mismas, tal y como se indica en la Figura 3.1.

3.4.1. Humedad

La humedad (x^w , en g agua/g total) se determinó según el método oficial 20.013 de la AOAC (1980) para frutas ricas en azúcar. Este método consiste en cuantificar la pérdida de peso que experimenta una muestra cuando se somete a secado en una estufa de vacío (Vaciotem J.P Selecta) a una presión de 60 mm Hg y a una temperatura de 60 °C hasta alcanzar un peso constante (ecuación 3.1):

$$X^W = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde: M_0 = peso del crisol vacío (g); M_1 = peso del crisol con la muestra antes del secado en estufa a 60 °C (g); M_2 = peso del crisol con la muestra tras el secado en estufa a 60 °C (g).

3.4.2. Actividad del agua

Para la determinación de la actividad del agua (a_w) se empleó un higrómetro de punto de rocío (AquaLab 4TE) con una sensibilidad de $\pm 0,003$. Este equipo proporciona una medida directa de la actividad del agua con un sensor infrarrojo de precisión superior al 2%.

3.4.3. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se evaluaron mediante un ensayo de punción llevado a cabo con un analizador de textura (Stable Micro Systems, modelo TA.XT plus) y software Texture Exponent 32 versión 6,1,2,0. El ensayo se realizó con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 2 mm de diámetro a temperatura ambiente. Las condiciones del ensayo fueron: velocidad de avance del punzón de 2,0 mm/s, fuerza de activación de 0,04903 N, distancia recorrida por la sonda de 10 mm y celda de carga de 50 kg. A partir de las curvas fuerza-distancia proporcionadas por el equipo se obtuvieron los valores de fuerza máxima ($F_{m\acute{a}x}$, N) y distancia recorrida por el punzón hasta alcanzar la fuerza máxima ($d_{m\acute{a}x}$, mm).

3.4.4. Propiedades ópticas

El color de las muestras se midió con un espectrofotómetro Minolta modelo CM-3600d, utilizando el iluminante D65 y el observador estándar con un ángulo de visión de 10° (UNE 40-80, 1984). Al tratarse de muestras traslúcidas, en las que una parte de la luz se refleja y otra se transmite, las propiedades de reflectancia pueden variar en función del espesor de la muestra y del fondo utilizado. Es por ello que se aplicó la teoría de Kubelka-Munk de dispersión de luz múltiple (Hutchings, 1999; Judd y Wyszecki, 1975; Talens *et al.*, 2002) que describe las propiedades ópticas de una muestra a cualquier longitud de onda (ecuaciones 3.2 a 3.5) mediante un coeficiente de dispersión (S) y otro de absorción (K). Para poder aplicar esta teoría, se realizaron medidas de reflectancia en el espectro visible (entre 400 y 700 nm) sobre fondos blanco y negro.

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$R_{\infty} = a - b \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$a = \frac{1}{2} \left[R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right] \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$b = \sqrt{(a^2 - 1)} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde: R_{∞} = reflectancia infinita; R = reflectancia de la muestra determinada sobre fondo blanco; R_g = reflectancia del fondo blanco; R_0 = reflectancia de la muestra determinada sobre fondo negro.

De esta forma se calcularon las coordenadas $L^*a^*b^*$ características del espacio de color CIELAB, donde L^* es la medida de la luminosidad, a^* la medida del contenido de rojo o de verde de un color (+a indica rojo, -a indica verde) y b^* la medida del contenido de amarillo o azul (+b indica amarillo, -b indica azul). A partir de estas coordenadas y con el fin de cuantificar los cambios globales de color experimentados por las muestras deshidratadas durante su almacenamiento, se calculó la diferencia de color (ΔE) (ecuación 3.6) con respecto al de la muestra recién secada hasta un determinado valor de actividad del agua.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

3.4.5. Propiedades antioxidantes

Los productos obtenidos se caracterizaron en términos de contenido en fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante por el método DPPH. Todas las determinaciones se llevaron a cabo sobre extractos de las muestras sólidas obtenidos a partir de la mezcla de una cantidad conocida de manzana (2 g en el caso de manzana fresca e impregnada y 0,35 g en el caso de manzana secada por aire caliente) con 20 mL de disolvente (80:20 (v/v) metanol/agua). La extracción se llevó a cabo por agitación durante 1 hora y posterior centrifugación a 12000 rpm. Las determinaciones se realizaron sobre el sobrenadante.

FENOLES TOTALES

El contenido en compuestos fenólicos totales se determinó según el método del reactivo Folin-Ciocalteu reportado por Singleton y Rossi (1965) basado en la coloración azul susceptible de ser medida espectrofotométricamente que se produce por reacción a pH básico entre los compuestos fenólicos presentes en los extractos y el reactivo en cuestión. La reacción se llevó a cabo mezclando en las cubetas de espectrofotometría 0,125 mL de extracto, 0,5 mL de agua bidestilada y 0,125 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, España). Tras 6 minutos en oscuridad, se añadieron 1,25 mL de Na_2CO_3 al 7% y 1 mL de agua bidestilada. El desarrollo del color se completó en oscuridad durante 90 minutos para finalmente medir la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g) obtenidos a partir de la recta de calibrado preparada con este fenol de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 100 y 500 ppm.

FLAVONOIDES TOTALES

Para la determinación del contenido en flavonoides totales se empleó el método colorimétrico del cloruro de aluminio (Luximon-Ramma *et al.*, 2005) que consiste en hacer reaccionar la muestra con una disolución de cloruro de aluminio al 2% (w/v) en metanol. En concreto, se hicieron reaccionar 1,5 mL de muestra con 1,5 mL de la disolución de AlCl_3 en la cubeta espectrofotométrica durante 10 minutos, tras lo que se midió la absorbancia a 368 nm. El resultado se expresó en mg equivalentes de quercetina (mg EQ/g), obtenidos a partir de la recta de calibrado preparada con este flavonoide de referencia en el rango de concentraciones comprendido entre 100 y 500 ppm.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

Este método se basa en medir el cambio de coloración que experimenta una disolución del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) que, tras secuestrar los componentes antioxidantes presentes en la muestra, se reduce y pasa de ser morada a tener un color amarillo (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004). Para tal fin, se mezclaron en una cubeta de espectrofotometría 100 μL de extracto de la muestra de manzana, 900 μL de metanol y 2000 μL de una disolución de DPPH 100 mM en metanol. Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por el mismo volumen de agua bidestilada. Transcurridos 30 minutos, se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se compararon con un patrón de DPPH y, por diferencia entre la cantidad de DPPH introducida inicialmente en la cubeta y la residual, se expresaron en mg de DPPH reducido por g de muestra ($\text{mg DPPH}_{\text{red}}/\text{g}$).

3.4.6. Propiedades microbiológicas

RECUENTO DE VIABLES

La concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *Salivarius* en las diferentes muestras se determinó por el procedimiento de dilución seriada en agua destilada estéril y siembra en placa (ICMSF, 2000). Dado que el crecimiento observado en condiciones de anaerobiosis no mejoraba notablemente, a pesar de tratarse de un microorganismo anaerobio facultativo, la siembra se realizó en la superficie de placas Petri con agar MRS (Scharlau Chemie®, Barcelona, España), que se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis.

En el caso de los caldos de cultivo inoculados y los líquidos de impregnación, la primera dilución (10^{-1}) se llevó a cabo directamente mezclando 1 mL con 9 mL de agua destilada estéril.

En el caso de las muestras sólidas de manzana, la primera dilución (10^{-1}) se obtuvo tras mezclar 10 g de manzana impregnada con 90 g de agua destilada estéril o 5 g de manzana secada por aire caliente con 45 mL de agua destilada estéril en una bolsa de stomacher y triturar durante 2 minutos hasta obtener una mezcla más o menos homogénea.

3.5. Análisis estadístico

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se muestra el efecto que la adición de un 10% de trehalosa en peso a la formulación del zumo y/o la homogeneización a 100 MPa del zumo fermentado ejercen sobre las principales propiedades funcionales y fisicoquímicas de un snack de manzana con efecto probiótico obtenido mediante impregnación a vacío y posterior secado con aire a 40 °C hasta alcanzar una actividad del agua en torno a 0,35 ó 0,45.

4.1. Efecto de las variables de proceso sobre el contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius*

En la figura 4.1 se muestra el contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 medido de forma experimental en los diferentes líquidos de impregnación (zumo) y en las muestras de manzana impregnadas con cada uno de ellos (manzana IV).

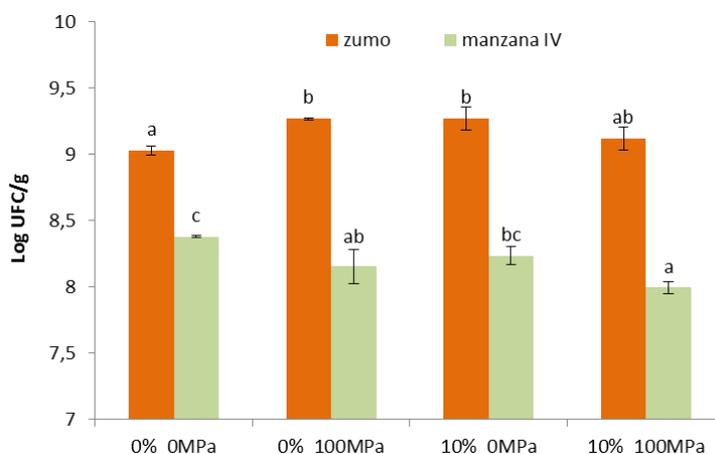


Figura 4.1. Efecto de la adición de trehalosa y/o de la homogeneización sobre la concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en zumo de clementina y en manzana impregnada. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Como se puede observar, el número de células vivas presentes en las muestras líquidas aumentó significativamente como consecuencia de la adición de un 10% de trehalosa en peso a la formulación del zumo o la homogeneización a 100 MPa del zumo fermentado. Sin embargo, la combinación de los dos factores en un mismo líquido (zumo 10%_100 MPa) resultó en un aumento menos acusado de la variable analizada.

En relación al contenido microbiano de las muestras de manzana impregnadas, éste resultó significativamente menor al obtenido en los líquidos de impregnación, lo que resulta lógico si se tiene en cuenta que sólo el 20% del volumen total de la manzana es ocupado por líquido tras la etapa de impregnación. Aun así, los recuentos resultaron superiores a 10^7 UFC/g, que es considerado por algunos autores (Ranadheera et al., 2010) el valor mínimo necesario para que el probiótico contenido en el alimento pueda ejercer su efecto beneficioso. En este caso, la adición de trehalosa al zumo antes de la inoculación y/o la homogeneización del zumo inoculado y fermentado no mejoraron los recuentos obtenidos en las muestras impregnadas con el zumo solo.

En la figura 4.2 se muestra el contenido en *L. salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 medido de forma experimental en las muestras de manzana impregnadas y secadas con aire a 40°C hasta un valor de actividad del agua en torno a 0,35 ó 0,45.

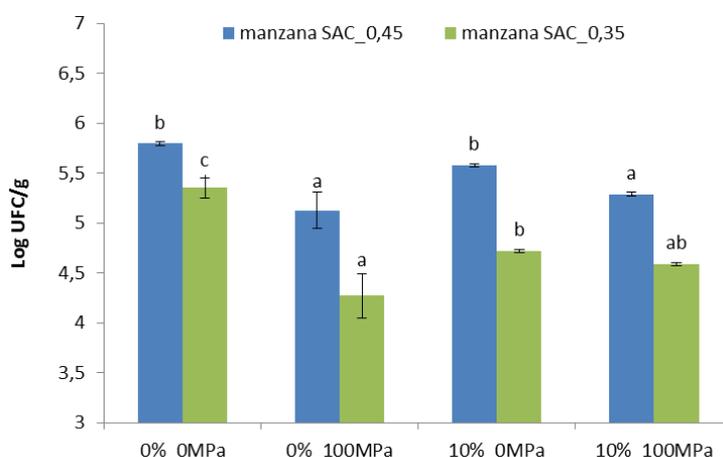


Figura 4.2. Efecto de la adición de trehalosa y/o de la homogeneización sobre la concentración de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en manzana secada con aire a 40 °C hasta un determinado valor de actividad del agua. Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Llama la atención en este caso el hecho de que, lejos de aumentar, el número de viables experimentó un notable descenso como consecuencia de la técnica de deshidratación empleada para aumentar la estabilidad de las láminas de manzana. Como era de esperar por el mayor tiempo de exposición a la corriente de aire a 40 °C, los recuentos en las muestras que tras el secado alcanzaron una menor actividad del agua fueron significativamente menores (p-valor < 0,05). De acuerdo a los resultados obtenidos, para conseguir mayores recuentos al final del secado lo más conveniente sería impregnar las muestras con el zumo que no ha sido formulado con trehalosa ni ha sido homogeneizado tras la incubación (zumo 0%_0MPa), afirmación que se ve especialmente corroborada cuando la exposición a la corriente de aire se ve prolongada por la necesidad de alcanzar una menor actividad del agua en las muestras. De entre todas las combinaciones analizadas, parece que la adición de un 10% en peso de trehalosa a la formulación del líquido de impregnación (zumo 10%_0MPa) ejerce un mayor efecto protector frente a las condiciones de secado, mientras que la simple homogeneización del zumo a 100 MPa (zumo 0%_100 MPa) resulta en menores recuentos tras el secado.

A pesar de que en todos los casos el contenido en probiótico de las muestras deshidratadas resultó inferior a 10^7 UFC/g, se ha considerado interesante seguir adelante con los estudios de almacenamiento con la finalidad de comprobar cómo evoluciona el número de células vivas presentes en las mismas en función de la diferente actividad del agua (figura 4.3). Los resultados obtenidos muestran una pérdida de viabilidad con el tiempo de almacenamiento, especialmente acusada en las muestras deshidratadas hasta un nivel de actividad del agua en torno a 0,45. De esta forma se pone de manifiesto la importancia de la actividad del agua en la estabilidad del probiótico durante su almacenamiento. La mayoría de autores señalan como óptimos para la supervivencia de las células probióticas en productos deshidratados valores de actividad del agua comprendidos entre 0,1 y 0,3 (Nualkaekul et al., 2012; Passot et al., 2012) y afirman que la interacción del agua con los grupos funcionales en estas condiciones bloquea los sitios de reacción, evitando así la interacción con el oxígeno y las reacciones de oxidación que degradan

los lípidos y las proteínas de la membrana celular del probiótico. Sin embargo, resulta complicado alcanzar estos valores de actividad del agua tan bajos en procesos de secado convectivo a temperaturas moderadas como las que son necesarias para no comprometer la supervivencia del probiótico. En cuanto a la adición de un 10% en peso de trehalosa a la formulación del líquido de impregnación y/o la homogeneización del mismo a 100 MPa, no se observa que mejoren de forma significativa los recuentos a lo largo del almacenamiento. De acuerdo con esto, el estrés osmótico causado por la adición de trehalosa y/o el daño mecánico y los demás cambios experimentados por el microorganismo durante la homogeneización enmascararon el efecto protector atribuido a cada una de estas variables y aceleraron la degradación del probiótico, especialmente en las muestras almacenadas con una mayor actividad del agua.

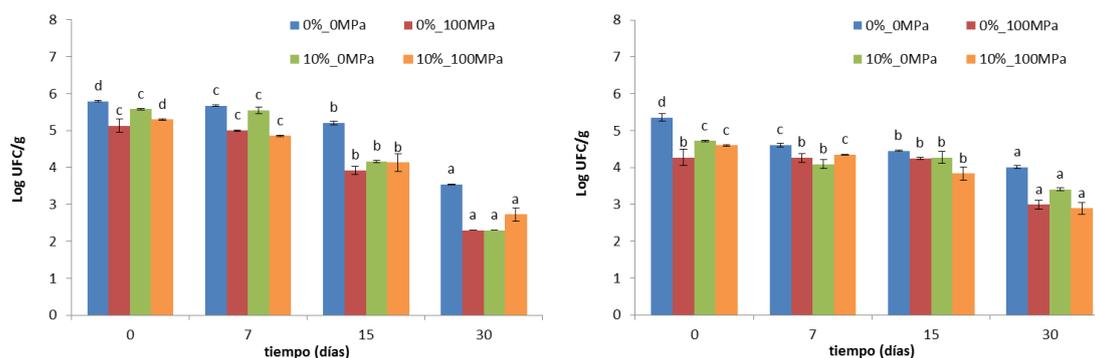


Figura 4.3. Evolución durante el almacenamiento del contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063 en muestras secas en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para una misma serie, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$).

Para corroborar de forma numérica el efecto que la composición del líquido de impregnación y la actividad del agua alcanzada tras el secado ejercen sobre la viabilidad de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* durante el almacenamiento, se ha obtenido el ajuste lineal de los datos experimentales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.1.

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

a_w	Tratamiento	Ordenada (Log UFC/mL)	Pendiente (Log UFC/g·día)	R-cuadrado	Coefficiente de correlación
0,45	0%_0MPa	6,063	-0,0779	93,07%	-0,9647
	0%_100MPa	5,371	-0,0972	94,28%	-0,9710
	10%_0MPa	5,853	-0,1053	93,24%	-0,9656
	10%_100MPa	5,378	-0,0869	98,33%	-0,9916
0,35	0%_0MPa	5,142	-0,0408	87,69%	-0,9364
	0%_100MPa	4,511	-0,0437	76,05%	-0,8721
	10%_0MPa	4,612	-0,0394	87,13%	-0,9335
	10%_100MPa	4,668	-0,0582	97,49%	-0,9874

En general, los valores de R-cuadrado resultaron más elevados para las muestras almacenadas con una mayor actividad del agua, lo que indica que el modelo predice con más exactitud en estos casos el descenso en la población microbiana con el tiempo de almacenamiento. En cuanto a los valores de la pendiente, estos fueron notablemente más elevados en las muestras almacenadas con una actividad del agua mayor, lo que corrobora que a menor actividad del agua

la pérdida de viabilidad por gramo de producto y día es menor. Los valores de pendiente del ajuste lineal también confirman que, para los dos niveles de actividad de agua analizados, la velocidad a la que se degradan las células resulta menor cuando no se añade trehalosa ni se homogeneiza el líquido de impregnación (0%_0MPa). En cuanto a las variables de proceso consideradas, su efecto sobre la supervivencia del probiótico se vio afectado por el nivel de actividad del agua alcanzado por las muestras tras el secado. Parece que añadir un 10% en peso de trehalosa a la formulación del líquido aceleró la destrucción del probiótico durante el almacenamiento de las muestras con una actividad del agua de 0,45, pero resultó la mejor opción para mantener el número de células vivas durante el almacenamiento de las muestras con una actividad del agua de 0,35. Aunque hay estudios que demuestran que en presencia de este disacárido ciertos organismos mantienen un estado de animación suspendida en condiciones de estrés hídrico (Green et al., 1989), es difícil afirmar que estos resultados se deban a los niveles de las variables analizadas y no a las imprecisiones del modelo matemático y a los diferentes valores de R-cuadrado.

4.2 Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades antioxidantes

En las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se muestra, para las muestras de manzana impregnadas, secas y almacenadas, el contenido en fenoles totales, el contenido en flavonoides totales y la actividad antioxidante medida por el método DPPH, respectivamente.

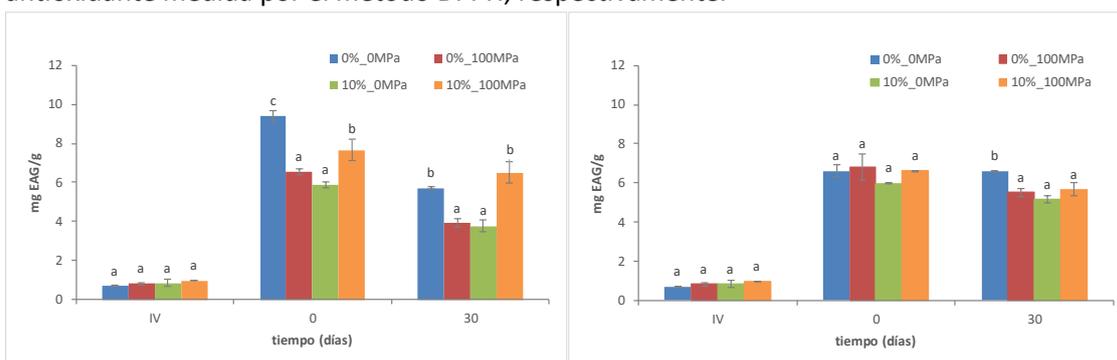


Figura 4.4. Contenido en fenoles totales en manzana impregnada y deshidratada, antes y después de 30 días de almacenamiento, en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$).

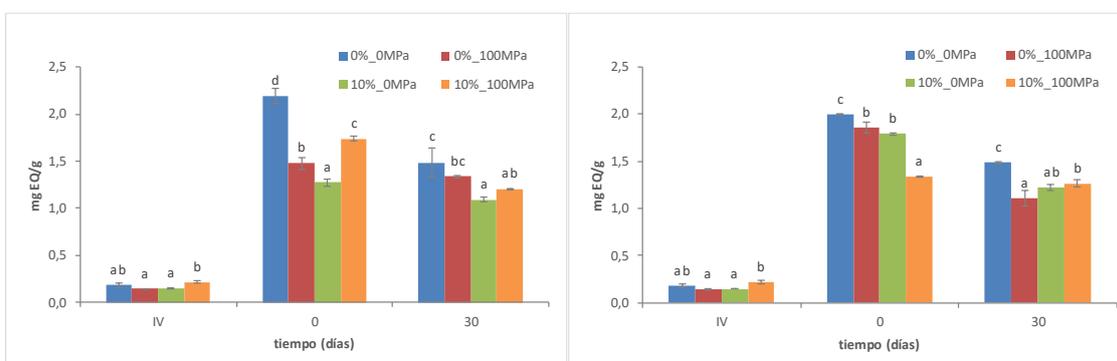


Figura 4.5. Contenido en flavonoides totales en manzana impregnada y deshidratada, antes y después de 30 días de almacenamiento, en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor $< 0,05$).

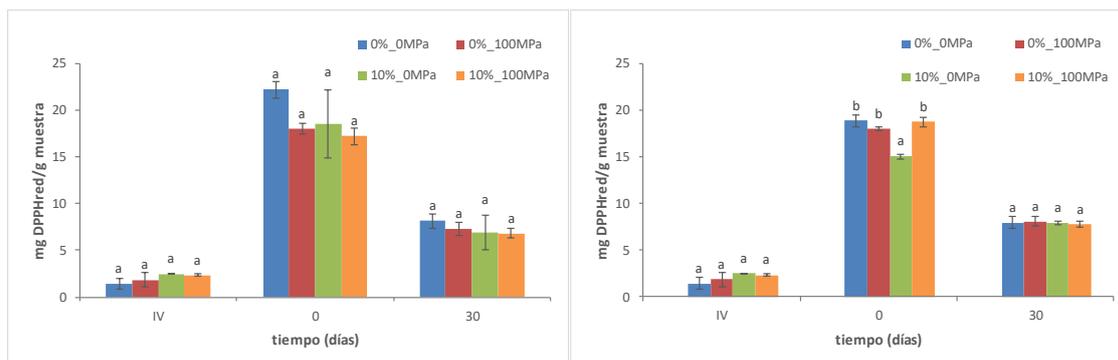


Figura 4.6. Actividad antioxidante de manzana impregnada y deshidratada, antes y después de 30 días de almacenamiento, en función de su actividad del agua: $a_w = 0,45$ (izquierda) y $a_w = 0,35$ (derecha). Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p -valor < 0,05).

Comenzando la discusión por las muestras de manzana impregnada, cabe destacar que sus propiedades antioxidantes no se vieron en general afectadas por la composición del líquido de impregnación. Aunque era de esperar que todos los ingredientes presentes en el zumo (incluidos los compuestos responsables de su actividad antioxidante) experimentaran una ligera dilución como consecuencia de la adición de trehalosa a la formulación del mismo y pese a que la trehalosa haya sido reconocida como un disacárido capaz de captar radicales libres e impedir que estos reaccionen con los reactivos empleados en su determinación analítica (Campos, 2016), su presencia en el líquido de impregnación no tuvo efecto alguno sobre las propiedades antioxidantes analizadas. Respecto a la homogeneización del líquido de impregnación era de esperar que, como consecuencia de la reducción del tamaño medio de las partículas presentes en el zumo (Campos, 2016), se produjera una mayor entrada de compuestos fenólicos altamente biodisponibles durante la etapa de impregnación a vacío, cosa que tampoco se aprecia en los resultados obtenidos experimentalmente.

Como era de esperar, tras el secado de las muestras se produjo un aumento significativo, tanto en el contenido en fenoles y flavonoides totales, como en la actividad antioxidante medida por el método DPPH. En general, por el menor tiempo de exposición a la corriente de aire, las muestras que tras el secado alcanzaron una actividad del agua de 0,45 presentaron, a pesar de su mayor contenido en agua, mayores contenidos en fenoles y flavonoides totales. En el caso de las muestras impregnadas con los líquidos 0%_100 MPa y 10%_0 MPa, el contenido en fenoles totales no se vio significativamente afectado por la actividad del agua alcanzada tras el secado y el contenido en flavonoides totales resultó significativamente más bajo en el caso de las muestras que estuvieron menos tiempo expuestas a la corriente de aire. Estos resultados pondrían de manifiesto que la adición de trehalosa a la formulación del zumo o la homogeneización del mismo a 100 MPa ejercen cierto efecto protector sobre los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante. Sin embargo, al analizar la actividad antioxidante de las muestras secas no se observan diferencias significativas en función de la diferente actividad del agua alcanzada por las mismas tras el secado.

Finalmente, tras el almacenamiento de las muestras deshidratadas se produjo un descenso significativo en el contenido en fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante medida por el método DPPH. Igual que se ha reportado anteriormente para el contenido en *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius*, las muestras que tras el secado alcanzaron una mayor actividad del agua ($a_w = 0,45$) resultaron ser las que mayor merma experimentaron en sus propiedades antioxidantes. Aunque las muestras impregnadas con el líquido que no incluía trehalosa en su composición ni había sido sometido a un proceso de homogeneización

(0%_0MPa) resultaron ser, para los dos niveles de actividad del agua ensayados, las que mayor contenido en fenoles y flavonoides totales presentaron al final del almacenamiento, la combinación de estos dos factores (10%_100MPa) redujo significativamente la pérdida de compuestos fenólicos (incluidos los flavonoides) durante el almacenamiento. Este efecto protector, que también se observa al analizar los valores de actividad antioxidante, resultó especialmente evidente durante el almacenamiento de las muestras que tras es secado experimentaron una menor reducción en su actividad del agua.

4.3. Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades ópticas y mecánicas

En la figura 4.7 se muestran las coordenadas cromáticas L*, a*, b* de las muestras de manzana impregnadas con los diferentes líquidos de impregnación y secadas hasta diferentes niveles de actividad del agua.

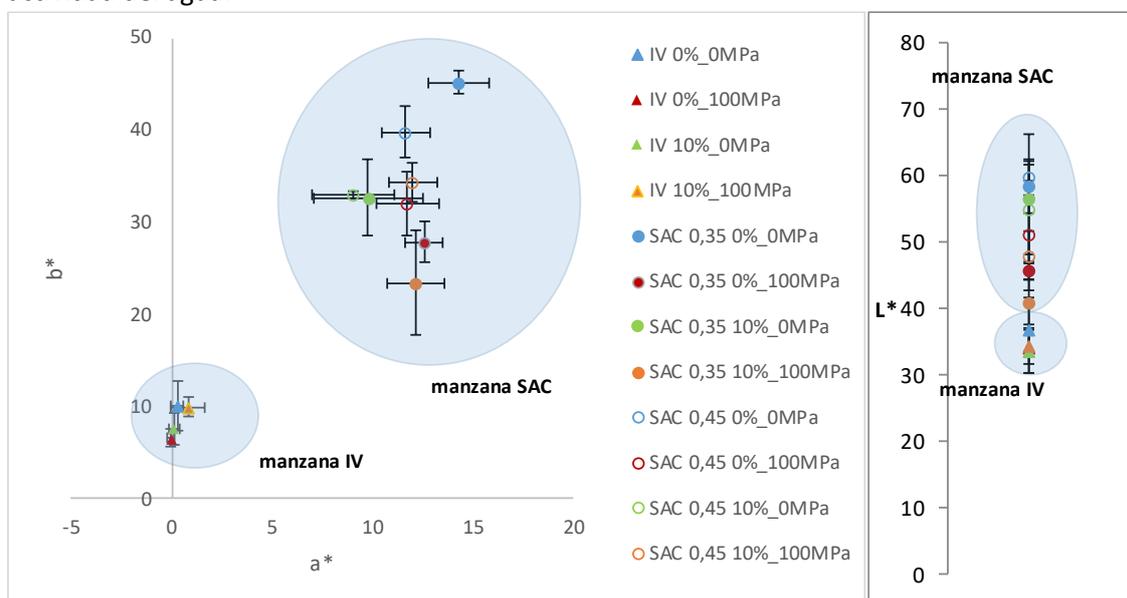


Figura 4.7. Coordenadas L*, a* y b* de las muestras de manzana impregnada y secada por aire caliente hasta niveles de actividad del agua de 0,35 y 0,45.

Tal y como se puede comprobar, el color de las muestras se vio fundamentalmente afectado por la aplicación de una etapa de secado, independientemente del nivel de actividad del agua alcanzado por las muestras al final del mismo. Según los resultados obtenidos, el secado con aire a 40 °C de las láminas de manzana impregnadas produjo un aumento significativo en los valores de las coordenadas L*, a* y b*.

El aumento en la luminosidad tras el secado es resultado de la pérdida de translucidez que experimentan las muestras impregnadas, en las que el líquido ocluido en los espacios intercelulares es reemplazado por aire. No se aprecia que la mayor o menor duración del secado tenga un efecto significativo sobre el valor de la coordenada L*. Sin embargo, el hecho de homogeneizar el líquido de impregnación sí que resultó en valores de L* significativamente más bajos al final de secado, lo que podría indicar que en estos casos las muestras experimentaron menos cambios en la porosidad y que conservaron mejor la integridad de su tejido celular.

El aumento en las coordenadas cromáticas a^* y b^* tras el secado de las muestras implica la evolución del color desde el verde hacia rojo-marrón y es consecuencia de la concentración de los compuestos responsables del color y de las reacciones de pardeamiento enzimático y no enzimático que tienen lugar durante el mismo. Aunque estos cambios de color deberían verse potenciados por el mayor tiempo de exposición del producto a la corriente de aire, no siempre las muestras que alcanzaron menores actividades del agua tras el secado fueron las que presentaron mayores valores de a^* y b^* . En el caso de la coordenada cromática a^* , sí que se observa que, para la misma disolución de impregnación, ésta toma valores ligeramente más elevados en las muestras secadas hasta una menor actividad del agua. En el caso de la coordenada cromática b^* , su aumento tras el secado se vio especialmente potenciado por la impregnación de las muestras con el líquido que no incluía trehalosa ni había sido sometido a altas presiones de homogeneización (0%_0MPa).

En la figura 4.8 se muestra la evolución con el tiempo de almacenamiento de las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* .

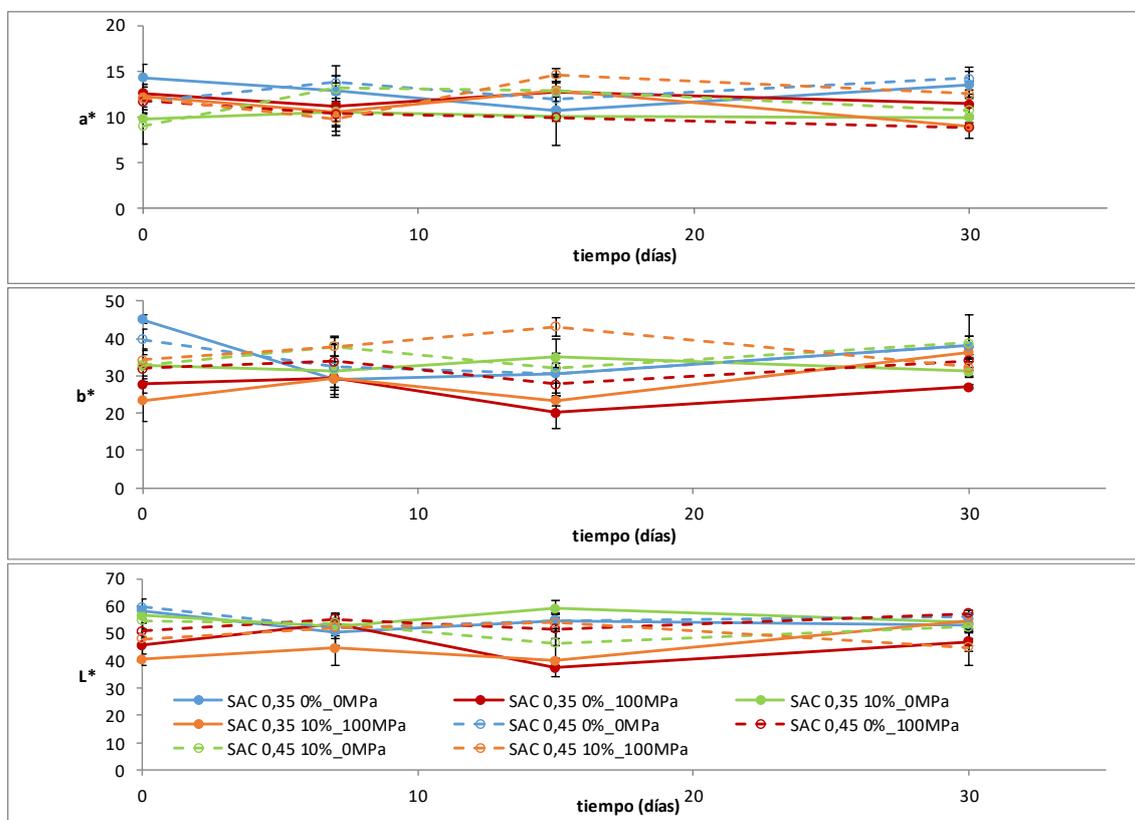


Figura 4.8. Evolución de las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* de las muestras deshidratadas hasta diferentes niveles de actividad del agua durante su almacenamiento.

En general, no se aprecian grandes cambios y los que hay no ocurren con una tendencia definida, de manera que podrían ser explicados en términos de la propia variabilidad existente entre las muestras analizadas.

Por otra parte, en la figura 4.9 se muestra los cambios de color experimentados por las muestras secas durante el almacenamiento, calculados respecto al color de las mismas a tiempo 0 de almacenamiento. De acuerdo a lo que se ha comentado anteriormente, la variación de color tampoco sigue una tendencia clara con el tiempo de almacenamiento. Al contrario de lo que

cabría esperar, en muchos casos se observa mayor similitud entre el color de las muestras al inicio y al final del almacenamiento que entre el inicio y tiempos medios de almacenamiento. Tampoco se aprecia que la actividad del agua de las muestras o la composición de la disolución de impregnación tengan un efecto claro sobre los cambios de color durante el almacenamiento. Podría decirse que los cambios de color se desarrollan durante los primeros 7 días de almacenamiento y que el tratamiento de secado aplicado resulta en muestras poco homogéneas en cuanto a color se refiere.

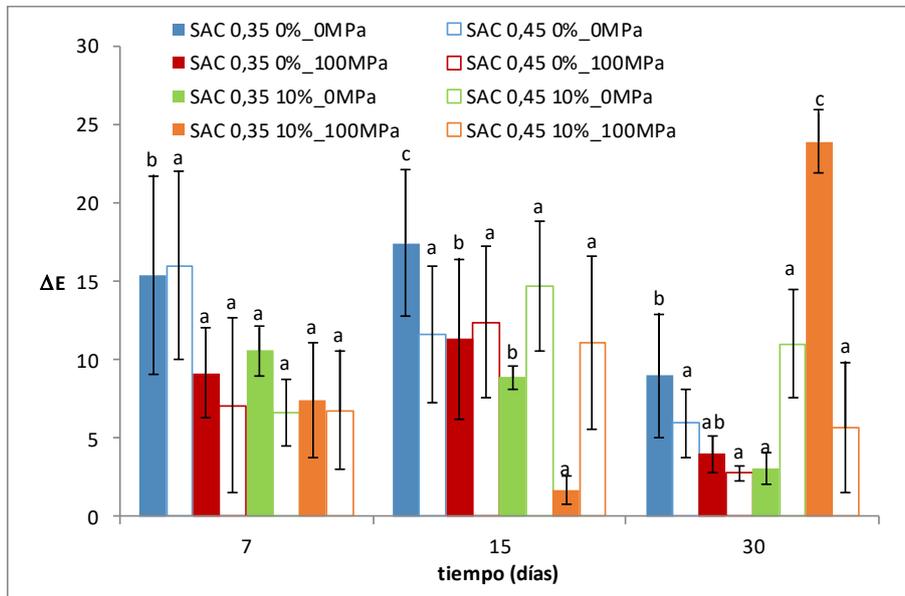


Figura 4.9. Variaciones de color experimentadas por las muestras deshidratadas hasta diferentes niveles de actividad del agua durante su almacenamiento. Para un mismo tiempo, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

4.4. Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades mecánicas

En la figura 4.10 se muestran los valores de fuerza máxima y distancia recorrida por el punzón hasta la rotura para las muestras de manzana impregnada y deshidratada hasta diferentes niveles de actividad del agua.

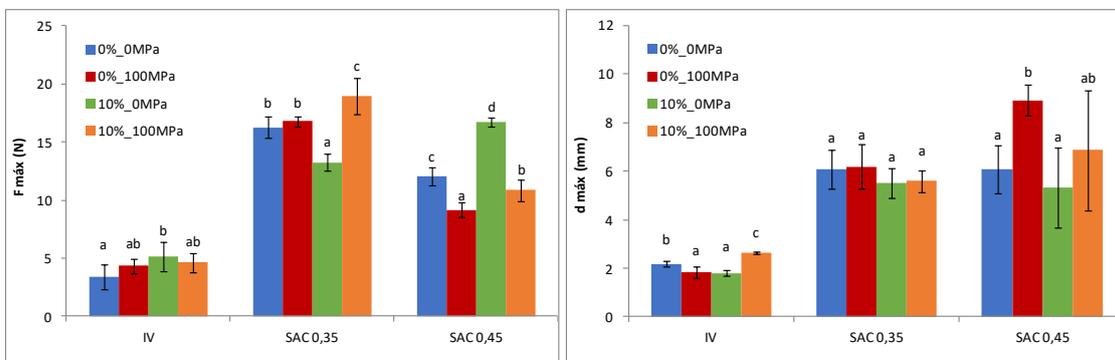


Figura 4.10. Valores de fuerza máxima y distancia de muestras impregnadas y deshidratadas hasta diferentes niveles de actividad del agua. Para un mismo instante del proceso, letras diferentes indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor < 0,05).

Como se puede observar, tanto la fuerza máxima necesaria para la rotura de las muestras como la deformación experimentada por las mismas antes de su rotura aumentaron significativamente tras su secado convectivo. De forma general, la dureza de las muestras aumentó con la duración del proceso y la necesidad de alcanzar valores de actividad del agua más bajos, mientras que la deformación máxima tomó valores similares para los diferentes niveles de actividad del agua obtenidos al final del secado. En cuanto a la composición del líquido de impregnación, su efecto sobre las propiedades mecánicas de las muestras resultó diferente en función de la actividad del agua que presentarían las mismas.

En la tabla 4.1 se muestra, para los cuatro líquidos de impregnación ensayados y los dos niveles de actividad del agua estudiados, la evolución de la humedad, la actividad del agua y las propiedades mecánicas durante los 30 días de almacenamiento. Como se puede observar, durante el almacenamiento de las muestras deshidratadas éstas experimentaron un ligero aumento en el valor de actividad del agua, lo que resultó especialmente acusado en las muestras que tras el secado presentaron una actividad del agua mayor. Como consecuencia, los valores de fuerza máxima también experimentaron un ligero aumento con el tiempo de almacenamiento, mientras que los de distancia máxima hasta la fractura permanecieron más o menos constantes.

Tabla 4.2. Evolución de la humedad, la actividad del agua y las propiedades mecánicas de las muestras de manzana deshidratadas durante el almacenamiento. Media (desviación típica).

	tratamiento	t (días)	x_w (%)	a_w	$F_{m\acute{a}x}$ (N)	$d_{m\acute{a}x}$ (mm)
$a_w = 0,45$	0%_0MPa	0	8,9(0,8)	0,384(0,004)	12,0(0,8)	6,1(0,9)
		7	11(3)	0,409(0,011)	11,62(1,03)	7,2(1,2)
		15	9,4(0,8)	0,418(0,008)	12,5(0,8)	4,9(0,9)
		30	8,5(0,3)	0,432(0,005)	17,8(0,5)	6,7(1,3)
	10%_0MPa	0	12,6(1,4)	0,432(0,011)	16,7(0,4)	5,3(1,7)
		7	11,93(0,06)	0,449(0,005)	9,7(0,4)	6,31(1,01)
		15	10,4(0,4)	0,458(0,010)	9,3(1,3)	6,3(1,2)
		30	9,9(0,2)	0,458(0,005)	12,49(1,09)	6,5(1,2)
	0%_100MPa	0	11,6(0,9)	0,37(0,02)	9,2(0,6)	8,9(0,6)
		7	12,7(0,4)	0,430(0,003)	9,4(0,6)	6,8(0,9)
		15	13(0,7)	0,435(0,006)	10,58(1,04)	8,5(0,8)
		30	9,3(1,2)	0,450(0,013)	11(2)	8(2)
	10%_100MPa	0	12,6(0,3)	0,431(0,008)	10,8(0,9)	7(2)
		7	12,0(0,2)	0,446(0,006)	10,1(0,9)	5,3(1,6)
		15	9,8(0,4)	0,4542(0,0010)	11(2)	6,66(1,08)
		30	9,47(1,04)	0,471(0,005)	15(2)	6,5(0,3)
$a_w = 0,35$	0%_0MPa	0	8,55(0,09)	0,32(0,02)	16,3(0,9)	6,1(0,8)
		7	9,5(0,2)	0,362(0,007)	23,3(0,5)	4,6(0,5)
		15	7,8(0,3)	0,39(0,02)	24,0(1,2)	5,2(0,8)
		30	7,0(0,4)	0,352(0,005)	24(2)	5,3(1,5)
	10%_0MPa	0	9,6(0,3)	0,378(0,015)	13,2(0,7)	5,5(0,6)
		7	8,8(0,3)	0,397(0,005)	19(3)	4,2(0,4)
		15	8,3(0,5)	0,404(0,009)	22,2(0,6)	3,5(0,7)
		30	6,83(0,12)	0,3881(0,0007)	19,9(1,2)	6,63(1,10)
	0%_100MPa	0	10,5(0,5)	0,36(0,02)	16,8(0,4)	6,2(0,9)
		7	11,3(0,2)	0,379(0,011)	21,2(0,5)	4,6(0,5)
		15	8,4(0,3)	0,3852(0,0006)	20,14(1,06)	5(2)
		30	6,8(0,4)	0,378(0,005)	23(2)	6,6(1,2)
	10%_100MPa	0	9,3(1,4)	0,385(0,012)	19(2)	5,6(0,4)
		7	10,0(0,2)	0,3923(0,0002)	22(2)	6,2(0,9)
		15	8,8(0,2)	0,395(0,013)	17(2)	5,8(0,9)
		30	7,7(0,5)	0,400(0,003)	20,5(1,2)	6(2)

Finalmente, en la figura 4.11 se representan las curvas fuerza-distancia típicas del ensayo de punción para láminas de manzana impregnadas con la disolución 0%_OMP_a y deshidratadas, antes y después de 30 días de almacenamiento.

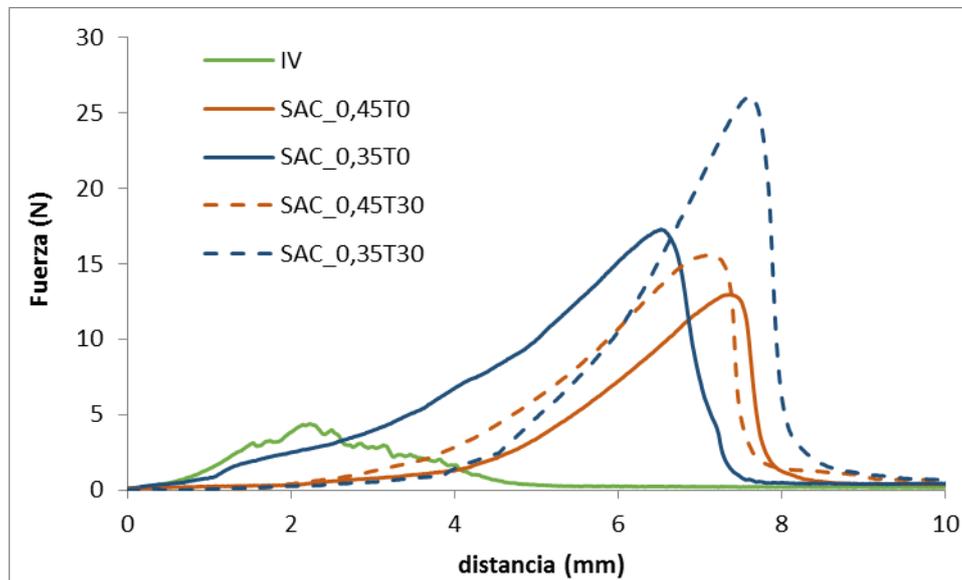


Figura 4.11. Curvas típicas del ensayo de punción de muestras de manzana impregnadas con el líquido 0%_OMP_a, deshidratadas hasta dos niveles de actividad del agua y posteriormente almacenadas.

Como se puede comprobar, la forma de las curvas obtenidas tras la punción de láminas de manzana impregnada se caracteriza porque presentan múltiples fracturas tras una ligera deformación previa, lo que es típico de tejidos vegetales frescos y porosos, constituidos por células turgentes y fuertemente unidas. En cuanto a la forma de las curvas obtenidas tras la punción de láminas de manzana deshidratadas, en todos los casos se observó una gran deformación de la muestra previa a su fractura, lo que pondría de manifiesto el carácter viscoelástico que adquieren las muestras tras el secado como consecuencia de la pérdida del turgor celular, la alteración de la lámina media y la disminución en la resistencia de la pared celular.

5- CONCLUSIONES

- El zumo de mandarina comercial rectificado con bicarbonato de sodio hasta pH 6 y enriquecido con 5 g/L de extracto de levadura es un medio óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (CECT 4063).
- Para aumentar los recuentos del probiótico en el zumo de clementina se aconseja añadir un 10% de trehalosa a la formulación del mismo o aplicar una etapa de homogeneización a 100 MPa, pero combinar los dos tratamientos.
- La impregnación a vacío es una técnica válida para incorporar probióticos en la matriz estructural de manzana, sin que la adición de trehalosa al líquido de impregnación y/o la homogeneización del mismo mejoren la cantidad incorporada.
- El secado con aire a 40 °C no es una técnica adecuada para la estabilización del producto impregnado con el microorganismo probiótico, ya que reduce hasta valores por debajo de 10^7 UFC/g el contenido microbiano del mismo.
- El secado de las muestras impregnadas con aire a 40 °C produce cambios significativos tanto en los recuentos de viables como en las propiedades antioxidantes, mecánicas y ópticas de las muestras impregnadas. Además, la intensidad de estos cambios viene condicionada por la actividad del agua alcanzada por las muestras al final del secado. En general, por el menor tiempo de exposición a la corriente de aire, las muestras que tras el secado alcanzan valores de actividad del agua en torno a 0,45 presentan mejores recuentos y mayor actividad antioxidante, aunque la estabilidad de estas propiedades funcionales durante el almacenamiento es menor que en el caso de las muestras deshidratadas hasta una actividad del agua de 0,35.
- Ninguna de las variables de proceso estudiadas (adición de trehalosa al líquido de impregnación y/o homogeneización del mismo a 100 MPa) mejoran el contenido microbiano o las propiedades antioxidantes de las muestras deshidratadas, al igual que tampoco afectan de forma significativa a los cambios en el color y la textura experimentados por las mismas. Sin embargo, sí que contribuyen en una menor pérdida de funcionalidad del snack durante su almacenamiento, especialmente cuando éste presenta una actividad del agua de 0,45.

6- BIBLIOGRAFÍA:

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

ALAM NH, ASHRAF H. (2003). Treatment of infectious diarrhea in children. *Paediatr Drugs*; 5:151-165.

ALZAMORA, S. M., SALVATORI, D., TAPIA, M. S., LÓPEZ-MALO, A., WELTI-CHANGES, J., & FITO, P. (2005). Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *Journal of Food Engineering*, 67, 205–214.

ANAL, A. K., BHOPATKAR, D., TOKURA, S., TAMURA, H., & STEVENS, W. F. (2003). Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29, 713e724.

ANAL, A. K., & STEVENS, W. F. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 45e54.

ANAL, A. K., STEVENS, W. F., & REMUÑAN-LOPEZ, C. (2006). Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 166e173.

ANAL, A. K., & SINGH, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.

BETORET, E.; CALABUIG-JIMÉNEZ, L.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; DALLA ROSA, M. (In Press). Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. *LWT- Food Science and Technology*.

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

BLASER MJ. (1991). *Helicobacter pylori*. *Princ and Pract Inf Dis Update*; 9: 3-9.

BLASER MJ. (1992). *Helicobacter pylori*: Its role in disease. *Clin Inf Dis*; 15: 386-393.

BRANNON-PEPPAS, L. (1997). Polymers in controlled drug delivery. *Biomaterials*, 11, 1e14.

BRACKETT, R. E., & SPLITTSTOESSER, D. F. (2001). Fruits and vegetables. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 515–520). Washington: American Public Health Association.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens.-Wiss.u.-Technol.*, 28: 25-30.

BODYECOLOGY (2010). Probiotic liquids and foods versus probiotic supplements: which is better? Available on line [https://bodyecology.com/articles/probiotic_foods_vs_supplements.php]. Consultation date: june 2017.

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

BOLTIN, D. (2016). Probiotics in Helicobacter pylori-induced peptic ulcer disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 30(1), 99-109.

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

CAMPOS, M. O. (2016). Efecto de la trehalosa y la presión de homogeneización sobre las propiedades funcionales de zumo de mandarina comercial inoculado con *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* (Doctoral dissertation).

CATS A, KUIPERS E, BOSSCHAERT M, POST R, VANDERBROUCKE-GRAUILS C, KUSTERS J. (2003). Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Aliment Pharmacol Ther.* 17: 429.

CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L., COLLINS, J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol.* May 26(5): 333-337.

CHEY WD, WONG BCY (2007). The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology Guideline on the Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol*; 102: 1808-1825.

COLLIER, R. (2009). Squabble over risks of probiotic infant formula. *Canadian Medical Association Journal* 181(3-4), E46-E47.

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

CONSULTA DE EXPERTOS FAO/OMS (2001) sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Informe. Córdoba, Argentina, 1- 4 de octubre de 2001.

CÔTÉ, J.; DION, J.; BURGUIÈRE, P.; CASAVANT, L.; VAN EIJK, J. (2013). Probiotics in bread and baked products: a new product category. *American Association of Cereal Chemists International* 58(6), 293-296.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223(4637), 701-703.

DE KEERSMAECKER, S.C.; VERHOEVEN, T.L.; DESAIR, J.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; NAGY, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters* 259(1), 89-96.

DE VRESE M, STEGELMAN A, RICHTER B, FENSELAU S, LAUE C, SCHREZENMEIR J. (2001). Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr*; 73 (suppl): 421S-9S.

DOING P, TRUST TJ. (1994). Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*; 62(10): 4526-4533 4 - 105 - 2001 89.

FALAGAS, M.E.; BETSI, G.I.; TOKAS, T.; ATHANASIOU, S. (2006). Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: a review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Drugs* 66(9): 1253-1261.

- GAON D, GARCIA H, WINTER L, RODRÍGUEZ N, QUINTAS R, GONZALEZ SN, OLIVER G. (2003). Efecto de cepas de Lactobacillus y Saccharomyces Boulardii sobre la diarrea persistente en niños. *Medicina*; 63(4):293-8.
- GILBERT, J.A.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; PORAZINSKA, D.L.; WEISS, S.J.; KNIGHT, R. (2013). Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell* 155(7), 1446-1448.
- GISBERT J, CASTRO-FERNANDEZ M, BERMEJO F, PEREZ-AISA A, DUCONS J, et al. (2006). Third line Rescue Therapy with Levofloxacin after Two H. pylori Treatment Failures. *Am J Gastroenterol*; 101:243-247.
- GISBERT J, BERMEJO F, CASTRO-FERNANDEZ M, PEREZ-AISA A, FERNANDEZ-BERMEJO M, TOMAS A, BARRIO J, et al. (2008). Second Line Rescue Therapy with Levofloxacin after H. pylori Treatment Failure: A Spanish Multicenter Study of 300 Patients. *Am J Gastroenterol*; 103: 71-76.
- GRANATO, D., BRANCO, G. F., NAZZARO, F., CRUZ, A. G., & FARIA, J. A. F. (2010). Functional foods and non-dairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 292–302.
- GREEN, J. L., & ANGELL, C. A. (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *The Journal of Physical Chemistry*, 93(8), 2880-2882.
- GUARNER F, KHAN GA, GARISCH J, ELIAKIM R, GANGL A, THOMSON A, et al. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y Prebióticos.
- HARRIS P, COVER TL, CROWE DR, ORENSTEIN JM, GRAHAM MF, BLASER MJ AND SMITH PD. (1996). Helicobacter pylori cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells. *Infect Immun*; 64(11): 4867-4871.
- HUTCHINGS, J.B. (1999). Food and color appearance. 2nd ed. Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). (2000). Microorganismos de los Alimentos. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios. *Editorial Acribia, Zaragoza*. Vol. 6.
- JIANG X, DOYLE MP. (2000). Growth supplements for Helicobacter pylori. *J Clin Microbiol*; 38(5): 1984-1987.
- JUDD, D.B. Y WYSZECKI, G. (1975). Color in business, science and industry. New York: John Wiley and Sons.
- KAILASAPATHY, K., & MASONDOLE, L. (2005). Survival of free and microencapsulated Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis and their effect on texture of feta cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 252e258.
- KHAN, M.I.; ARSHAD, M.S.; ANJUM, F.M.; SAMEEN, A.; REHMAN, A.; GILL, W.T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food Research International* 44(10), 3125-3133.
- KOLARS JC, LEVITT MD, AOUJI M, SAVAIANO DA. (1984). Yoghurt-an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med*. 310:1-3.

- KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D., & DOLATOWSKI, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47(12), 1761-1772.
- KULIGOWSKI, M.; JASIŃSKA-KULIGOWSKA, I.; NOWAK, J. (2013). Evaluation of bean and soy tempeh influence on intestinal bacteria and estimation of antibacterial properties of bean tempeh. *Polish Journal of Microbiology* 62(2), 189-194.
- LAMSAL, B. P., & FAUBION, J. M. (2009). The beneficial use of cereal and cereal components in probiotic foods. *Food Reviews International*, 25, 103–114.
- LINS R.D.; PEREIRA, C.S.; HUNENBERGER, P.H. (2004). Trehalose-protein interaccion in aqueous solution. *Proteins* 55, 177-186.
- LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A.; ZBARSKY, V.; DATLA, K.; DEXTER, D.; ARUOMA, O. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanicins in Muritian black teas. *Food Research International*, 38: 357-367.
- MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O’MORAIN C, BAZZOLI F, EL-OMAR E, GRAHAM D, HUNT R, ROKKAS T, VAKIL N, KUIPERS EJ, (2007). The European Helicobacter Study Group (EHSg). Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*; 56:772.
- MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN’T VELD, J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science* 80, 1031-1037.
- MARTEAU P, CUIILLERIER E, MEANCE S, GERHARDT MF, MYARA A, BOUVIER M, BOULEY C, TONDU F, BOMMELAER G, GRIMAUD JC. (2002). Bifidobacterium animalis strain DN-173-010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. Vol. 16, N° 3:587-593.
- MARTINS, E. M. F., RAMOS, A. M., VANZELA, E. S. L., STRINGHETA, P. C., DE OLIVEIRA PINTO, C. L., & MARTINS, J. M. (2013). Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764-770.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12, 173–182.
- MEANCE S, CAYUELA C, TURCHET P, RAIMONDI A, LUCAS C, ANTOINE JM. (2001). A fermented milk with a Bifidobacterium Probiotic Strain DN- 173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microbial Ecology in Health and Disease*; Vol 13, N°4. pag: 217 - 222.
- MEANCE S, CAYUELA C, RAIMONDI A, TURCHET P, LUCAS C, ANTOINE JM. (2003). Recent advances in the use of Functional Foods: effects of the commercial fermented milk with Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 and yoghurt strains on gut transit time in the elderly. *Microbial Ecology in Health and Disease*; Vol 15, N° 1. pag: 15 - 22.

- MICHAIL, S. (2009). The role of Probiotics in allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 5(1), 5-12.
- NUALKAEKUL, S., DEEPIKA, G., & CHARALAMPOPOULOS, D. (2012). Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International* 48(2), 627-633.
- MOLYNEUX, P. (2004). The use of the settable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, 26 (2): 211-219.
- OHTAKE, Y.; WANG, J. (2011) Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100(6), 2020-2053.
- OOI, L.G.; LIONG, M.T. (2010). Cholesterol-lowering effects of Probiotics and Prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *International Journal of Molecular Sciences* 11(6), 2499-2522.
- ORTEGA R, MARCOS A, ARANCETA J, MATEOS J, REQUEJO A, SERRA MAJEM L. (2002). *Alimentos Funcionales. Probióticos. 1ª Edición. Madrid. Médica Panamericana.*
- PARDO C. (2013). Los probióticos y prebióticos en la farmacia comunitaria. SEFAC. Taller «Actualización en indicación y uso de probióticos».
- PASSOT, S., CENARD, S., DOUANIA, I., TRÉLÉA, I. C., & FONSECA, F. (2012). Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, 132(4), 1699-1705.
- PATRIGNANI, F.; VANNINI, L.; LEROY, S.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. (2009) Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology* 136, 26–31.
- PATRIGNANI, F., TABANELLI, G., SIROLI, L., GARDINI, F., & LANCIOTTI, R. (2013). Combined effects of high pressure homogenization treatment and citral on microbiological quality of apricot juice. *International journal of food microbiology*, 160(3), 273-281.
- PERDIGÓN G, MEDINA M, VINTIÑI E, VALDEZ J. (2000). Intestinal pathway of internalization of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 13: 141-150.
- PERDIGÓN G, MALDONADO-GALDEANO C, VALDEZ J, MEDICI M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr.* 56 (4):21-26.
- PERES, C. M., PERES, C., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., & MALCATA, F. X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria — With an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 31–42.
- PICCOLOMINI R, DI BONAVENTURA G, NERI M, DI GIROLAMO A, CATAMO G, PIZZIGALLO E. (1999). Usefulness of Leifson staining method in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Microbiol*; 37(1): 199-201.
- RAMÍREZ RAMOS A, GILMAN R. (2004). *Helicobacter pylori* en el Perú. Primera edición. Editorial Santa Ana.
- RAMÍREZ RAMOS A. (2006). *Helicobacter pylori*. Libro Tópicos selectos en Medicina Interna. Gastroenterología. Primera edición. Editorial Santa Ana, págs. 177-195.

RANADHEERA, R. D. C. S., BAINES, S. K., & ADAMS, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1–7.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 27, 1–11.

ROSENFELDT V, MICHAELSEN KF, JAKOBSEN M, LARSEN CN, MOLLER PL, TVEDE M, WEYREHTER H, VALERIUS NH, PAERREGAARD A. (2002). Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis J*. 21:417-419.

SAAD R, SCHOENFELD P., MYRA H, CHEY W. (2006). Levofloxacin – Based Triple Therapy versus Bismuth – Based Quadruple Therapy for Persistent *Helicobacter pylori* Infection: A Meta – Analysis. *Am J Gastroenterol*; 101: 488-496.

SGOURAS D, MARAGKOUidakis P, PETRAKI K, MARTINEZ-GONZÁLEZ B, ERIOTOU E, MICHPOULOS S, KALANTZOPOULOS G, TSAKALIDOU E, MENTIS A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70: 518-526.

SINGLETON, V. L. Y ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic. , 16*, 144-158.

SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., SPIER, M. R., MEDEIROS, A. B. P., YAMAGUISHI, C. T., LINDNER, J. D., et al. (2010). The potential of probiotics. *Food Technology Biotechnology*, 48, 413–434.

SONGISEPP, E., KULLISAAR, T., HÜTT, P., ELIAS, P., BRILENE, T., ZILMER, M., & MIKELSAAR, M. (2004). A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of dairy science*, 87(7), 2017-2023.

SPINLER, J.K.; TAWEECHOTIPATR, M.; ROGNERUD, C.L.; OU, C.N.; TUMWASORN, S.; VERSALOVIC, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 14, 166–171.

SUÁREZ JE. (2015). Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp*. 31(Supl 1): 3-9.

SYKORA J, VALECKOVA K, AMLEROVA J, SIALA K, DEDEK P, WATKINS S, VARVAROVSKA J, STOZICKY F, PAZDIORA P, SCHWARZ J. (2005). Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN- 114 001 and the eradication of *H.pylori* in children. *J Clin Gastr*.39: 692-698.

TABANELLI, G.; BURNS, P.; PATRIGNANI, F.; GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. (2012). Effect of a non-lethal high pressure homogenization treatment on the *in vivo* response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology* 32, 302-307.

TALENS, P.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; FITO, P. Y CHIRALT, A. (2002). Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwifruit. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 191-199.

THAKUR, M., SATWADHAR, P., & DESHPANDE, H. Exploiting Fruits and Vegetables for Development of Probiotic Products.

TRIPATHI, M. K., & GIRI, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.

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

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