



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Desarrollo de una bebida natural con potencial simbiótico empleando frutos ricos en antocianinas**

**Marcela Patricia Palencia Argel**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Bogotá, Colombia  
2022



# **Desarrollo de una bebida natural con potencial simbiótico empleando frutos ricos en antocianinas**

**Marcela Patricia Palencia Argel**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director (a):

Ph.D. Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla

Codirector (a):

Ph.D. Amanda Consuelo Díaz Moreno

Línea de Investigación:

Caracterización y funcionalidad de alimentos / desarrollo de nuevos productos

Grupo de Investigación:

BIOALIMENTOS

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2022



*A mi familia por su eterna paciencia y apoyo incondicional, sin quienes no habría llegado tan lejos.*



## **Declaración de obra original**

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

*Marcela Palencia*

---

Marcela Patricia Palencia Argel

Fecha 04/10/2022

## **Agradecimientos**

Agradezco al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación – MinCiencias por financiar este proyecto de investigación bajo la convocatoria 891 - Convocatoria fortalecimiento de vocaciones y formación en CTeI para la reactivación económica en el marco de la postpandemia 2020, con número de contrato 80740-120-2021. También agradezco a Hawer Rodríguez quien fue joven investigador de pregrado en este proyecto de investigación y quien me acompañó y apoyó en toda la parte experimental del proyecto.

Agradezco a Carol Cortez, líder de calidad del laboratorio de análisis fisicoquímico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por su apoyo y enseñanzas sobre el montaje de métodos y calidad analítica. También incluyo a Gregorio Medina, técnico operativo del laboratorio de microbiológica del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por guiarme en la realización de los análisis de calidad microbiológica.

Le extiendo un agradecimiento especial a Camila Bernal, candidata a doctora en biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, por enseñarme desde cero sobre microbiología y en particular sobre microorganismos probióticos.



## Resumen

**Título en español:** Desarrollo de una bebida natural con potencial simbiótico empleando frutos ricos en antocianinas

Las bebidas de frutas ricas en antocianinas han sido de especial interés como productos funcionales principalmente en razón de su actividad antioxidante. Este tipo de bebidas pueden convertirse en alimentos con potencial simbiótico a través de la adición de fibras prebióticas y de microorganismos probióticos, lo cual aumentaría sustancialmente sus propiedades funcionales. Sin embargo, la posibilidad de garantizar una adecuada viabilidad de los microorganismos probióticos, así como propiedades nutricionales, fisicoquímicas y sensoriales deseables al producto final, constituyen un reto tecnológico de gran envergadura. El objetivo del presente estudio fue determinar las condiciones para la obtención de una bebida con potencial simbiótico a partir de matrices vegetales fuente de antocianinas, seleccionando combinaciones adecuadas de microorganismos probióticos y fibras prebióticas y comparando la aptitud de pretratamientos térmicos y no térmicos (ultrasonido) como estrategia de estabilización de carga microbiana antes de la adición del probiótico. La adaptación del cultivo probiótico a través de la inducción de procesos fermentativos, la adición de prebióticos y el uso de frutas menos ácidas en la formulación, permitieron obtener una buena viabilidad del cultivo al final de 28 días de almacenamiento en refrigeración de la bebida, con un conteo superior a 10 log UFC/mL. El uso de un tratamiento de pasteurización a 85°C por 5 min, previo a la inoculación del cultivo probiótico, permitió obtener una bebida inocua conservando sus propiedades fisicoquímicas y el contenido de antocianinas, alcanzando los 4,4 mg C3G/100 g al final del periodo de almacenamiento. De manera importante, la inducción de la fermentación con el cultivo probiótico no afectó significativamente el contenido de compuestos fenólicos ni la actividad antioxidante de la bebida, la cual, además, tuvo una buena aceptabilidad en cuanto a su apariencia, olor, textura, sabor y gusto general. El producto resultante es una bebida que contiene antocianinas, es totalmente de origen vegetal y cuenta con posibles características simbióticas.

**Palabras clave:** Frutos rojos; bacterias de ácido láctico; bebida no láctea; compuestos bioactivos; prebiótico; probiótico.

## Abstract

**Título en inglés:** Development of a natural beverage with synbiotic potential using anthocyanin-rich fruits

Anthocyanin-rich fruit beverages have been of special interest as functional products mainly because of their antioxidant activity. These types of beverages can become foods with synbiotic potential through the addition of prebiotic fibers and probiotic microorganisms, which substantially increase their functional properties. However, the possibility of guaranteeing an adequate viability of probiotic microorganisms, as well as desirable nutritional, physicochemical and sensory properties of the final product, is a major technological challenge. The objective of the present study was to determine the conditions for obtaining a beverage with synbiotic potential from an anthocyanin-rich vegetable matrix. This was done by selecting suitable combinations of probiotic microorganisms and prebiotic fibers and comparing the suitability of thermal and non-thermal pretreatments (ultrasound) as a microbial load stabilization strategy before the addition of the probiotic. The adaptation of the probiotic culture through the induction of fermentative processes, the addition of prebiotics and the use of less acidic fruits in the formulation, allowed for an adequate viability of the culture at the end of 28 days of refrigerated storage of the beverage, with a count greater than 10 log CFU/mL. The use of a pasteurization treatment at 85°C for 5 min, prior to the inoculation of the probiotic culture, yielded an innocuous beverage that preserved its physicochemical properties and anthocyanin content, reaching 4.4 mg C3G/100 g at the end of the storage period. Importantly, the induction of fermentation with the probiotic culture did not significantly affect the phenolic compounds content or the antioxidant activity of the beverage, which also had good acceptability in terms of appearance, smell, texture, flavor and general liking. The resulting product is a beverage that contains anthocyanins, is fully of vegetable origin and has possible synbiotic characteristics.

**Keywords:** Berries; lactic acid bacteria; non-dairy beverage; bioactive compounds; prebiotic; probiotic.

# Contenido

<b>Resumen.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>1</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>2</b>
<b>Lista de gráficas.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>Capítulo 1. Marco de referencia.....</b>	<b>10</b>
1.1. Frutos fuente de antocianinas.....	10
1.1.1. Actividad antioxidante de las antocianinas.....	11
1.1.2. Potencial prebiótico de las antocianinas.....	12
1.1.3. Actividad antimicrobiana de las antocianinas.....	15
1.2. Probióticos, prebióticos y simbióticos en bebidas de frutos fuente de antocianinas.....	17
1.2.1. Estrategias para mejorar la viabilidad de los probióticos en jugos de frutas.....	18
1.2.2. Cambios fisicoquímicos generados por la inclusión de probióticos en bebidas con antocianinas.....	21
1.2.3. Cambios sensoriales generados por la inclusión de probióticos en bebidas con antocianinas.....	23
1.3. Ultrasonido (US) como método de inactivación microbiana.....	24
1.3.1. Efectos del US sobre características fisicoquímicas y organolépticas.....	27
1.3.2. Desarrollo de bebidas prebióticas empleando US.....	29
1.3.3. Desarrollo de bebidas probióticas y simbióticas empleando US.....	30
1.4. Conclusiones.....	31
<b>Capítulo 2. Desarrollo de una bebida con antocianinas e inclusión de prebióticos y probióticos.....</b>	<b>33</b>
2.1. Introducción.....	33
2.2. Metodología.....	35
2.2.1. Materiales y reactivos.....	35
2.2.2. Formulación de una bebida base.....	36
2.2.3. Adición de prebióticos y evaluación de cambios fisicoquímicos en la bebida.....	36
2.2.4. Selección de la mejor combinación de probiótico y prebiótico.....	37

2.2.5. Adaptación del probiótico y selección de la concentración de prebiótico óptima en la bebida .....	37
2.2.6. Selección del pretratamiento de conservación de la bebida con potencial simbiótico.	38
2.2.7. Análisis estadístico.....	41
2.3. Resultados y discusiones.....	41
2.3.1. Formulación de la bebida base.....	41
2.3.2. Adición de prebióticos y evaluación de cambios fisicoquímicos en la bebida .....	42
2.3.3. Selección de la mejor combinación de probiótico y prebiótico .....	47
2.3.4. Adaptación de probiótico y selección de la concentración de prebiótico óptima en la bebida .....	50
2.3.5. Selección del pretratamiento de conservación de la bebida con potencial simbiótico.	51
2.4. Conclusiones .....	60
<b>Capítulo 3. Evaluación de los cambios fisicoquímicos, microbiológicos y bioactivos de la bebida simbiótica durante su fermentación y almacenamiento.....</b>	<b>63</b>
3.1. Introducción .....	63
3.2. Metodología .....	65
3.2.1. Materiales y reactivos .....	65
3.2.2. Proceso de elaboración de la bebida .....	65
3.2.3. Evaluación de la cinética de fermentación de la bebida.....	66
3.2.4. Evaluación del almacenamiento en refrigeración de la bebida .....	67
3.2.5. Análisis sensorial .....	69
3.2.6. Análisis estadístico.....	69
3.3. Resultados y discusiones.....	69
3.3.1. Evaluación de la cinética de fermentación de la bebida.....	69
3.3.2. Evaluación del almacenamiento en refrigeración de la bebida .....	72
3.3.3. Análisis sensorial .....	82
3.4. Conclusiones .....	84
<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>85</b>
Conclusiones .....	85
Recomendaciones .....	86
<b>Anexos .....</b>	<b>87</b>
Anexo 1: Productos académicos .....	87
Presentaciones.....	87
Artículos publicados .....	87
Anexo 2: Fichas técnicas de cepas probióticas comerciales .....	88
Anexo 3: Fichas técnicas de sustancias prebióticas .....	90
<b>Bibliografía.....</b>	<b>93</b>

## Lista de figuras

Figura 1-1: Estructura química de antocianidinas y antocianinas.....	10
Figura 1-2: Estructura del ion flavilio y grupos funcionales de las antocianidinas presentes en frutas. ....	11
Figura 1-3: Representación de los metabolitos de las antocianinas encontrados comúnmente en el colon.....	14
Figura 1-4: Etapas del desarrollo de una bebida de frutas probiótica. ....	18
Figura 1-5: Clasificación de las ondas sonoras según su frecuencia.....	24
Figura 2-1: Pasos para el desarrollo de la bebida con potencial simbiótico con antocianinas.....	36
Figura 2-2: Registro fotográfico de las bebidas con adición de las fibras prebióticas en sus diferentes concentraciones. ....	46
Figura 2-3: Fotografía de bebidas tratadas.....	54
Figura 3-1: Registro fotográfico de las bebidas inoculada y sin inocular (control) durante su almacenamiento. ....	76

## Lista de tablas

Tabla 2-1: Tratamientos de conservación evaluados .....	38
Tabla 2-2: Formulaciones preliminares para obtener una bebida base. ....	41
Tabla 2-3: Evaluación de la actividad prebiótica de los compuestos prebióticos en estudio frente al cultivo probiótico <i>L. rhamnosus</i> . ....	48
Tabla 2-4: Evaluación de la actividad prebiótica de los compuestos prebióticos en estudio frente al cultivo probiótico VEGE. ....	49
Tabla 2-5: Evaluación del crecimiento durante 24 horas de VEGE 092 en la bebida de frutos rojos con la inclusión de diferentes concentraciones de la fibra prebiótica Orafti® P95. ....	50
Tabla 2-6: Calidad microbiológica de las bebidas tratadas con 5 métodos de conservación.....	52

## Lista de gráficas

Gráfica 2-1: Cambio de pH relativo al pH de la bebida control al adicionar las fibras prebióticas en diferentes concentraciones. ....	43
Gráfica 2-2: Cambio de S.S.T. relativo a la bebida control al adicionar las fibras prebióticas en diferentes concentraciones. ....	44
Gráfica 2-3: Cambio de viscosidad relativo a la bebida control al adicionar las fibras prebióticas en diferentes concentraciones. ....	45
Gráfica 2-4: Efecto de la adición de fibras prebióticas en diferentes concentraciones sobre las diferencias de color de la bebida. ....	46
Gráfica 2-5: Índice prebiótico de las fibras utilizadas en el estudio sobre dos cultivos probióticos. ....	48
Gráfica 2-6: Cambio de pH relativo a la bebida control (sin tratamiento) de las bebidas tratadas. .	54
Gráfica 2-7: Cambio de S.S.T. relativo a la bebida control (sin tratamiento) de las bebidas tratadas. ....	55
Gráfica 2-8: Cambio de viscosidad relativo a la bebida control (sin tratamiento) de las bebidas tratadas. ....	56
Gráfica 2-9: Efecto de los tratamientos sobre el color de la bebida. ....	56
Gráfica 2-10: Análisis de discriminación lineal del color para identificar diferencias estadísticas entre los tratamientos empleados en la bebida. ....	57
Gráfica 2-11: Perfiles de antocianinas de la bebida antes y después de cada uno de los tratamientos en estudio. ....	58
Gráfica 2-12: Efecto de los tratamientos sobre el contenido de antocianinas totales de la bebida. .	59
Gráfica 3-1: Curva de crecimiento y acidificación del cultivo VEGE 092 en la bebida inoculada con adición de 1% de FOS. ....	70
Gráfica 3-2: Contenido de glucosa y fructosa en el sustrato durante la fermentación de la bebida con adición de 1% de FOS empleando el cultivo probiótico VEGE 092. ....	71
Gráfica 3-3: Contenido de ácido málico y ácido láctico en el sustrato durante la fermentación de la bebida con adición de 1% de FOS empleando el cultivo probiótico VEGE 092. ....	71
Gráfica 3-4: Viabilidad de VEGE 092 en la bebida inoculada durante su almacenamiento. ....	72
Gráfica 3-5: Cambio de pH durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	74
Gráfica 3-6: Cambios en el contenido de ácido láctico y ácido málico durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092. ....	75
Gráfica 3-7: Cambios en el contenido de glucosa y fructosa durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	76

Gráfica 3-8: Cambios en el color de la bebida inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control) durante 28 días de almacenamiento. ....	77
Gráfica 3-9: Representación gráfica del sistema CIELab de las bebidas inoculadas con VEGE 092 y sin inocular (control) a lo largo de su almacenamiento. ....	77
Gráfica 3-10: Cambios en la viscosidad durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	78
Gráfica 3-11: Contenido de antocianinas totales durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	79
Gráfica 3-12: Contenido de compuestos fenólicos totales durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	80
Gráfica 3-13: Actividad antioxidante durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	81
Gráfica 3-14: Frecuencia de frutas identificadas en el olor de la bebida inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	83
Gráfica 3-15: Frecuencia de frutas identificadas en el sabor de la bebida inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control). ....	83



# Introducción

La creciente conciencia de los consumidores sobre los beneficios para la salud que pueden proporcionar los productos alimenticios ha fomentado el desarrollo de alimentos funcionales, es decir, alimentos que proveen efectos positivos sobre la salud además de proporcionar nutrientes básicos (Topolska et al., 2021). Dos de las categorías de alimentos funcionales más importantes y de más amplia comercialización y consumo en la actualidad son los prebióticos y probióticos, en buena parte debido a la evidencia de su impacto en el tracto gastrointestinal y el sistema inmunológico (Cunningham et al., 2021).

Números estudios destacan la importancia de la microbiota intestinal sobre la salud, pues la alteración en la composición de ésta (disbiosis) se ha asociado a múltiples enfermedades intestinales y desordenes metabólicos como las enfermedades inflamatorias del intestino, la diabetes y la obesidad (Monteagudo-Mera et al., 2019). La dieta es uno de los factores que puede cambiar la composición de la microbiota intestinal por lo que el consumo de ciertos alimentos contribuye a la modificación de la microbiota intestinal (Xavier-Santos et al., 2020). Así, el consumo de productos probióticos y prebióticos se ha relacionado con beneficios a la salud por su capacidad de mantener un buen balance y una buena composición de la microbiota intestinal, asociado a su capacidad de inhibir bacterias patógenas, a sus efectos inmunomoduladores y a la estimulación de las funciones metabólicas y de barrera (Ranadheera et al., 2010).

Los probióticos son definidos por la FAO/OMS como “*microorganismos vivos que ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas*” (Zendeboodi et al., 2020). Además, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) recomienda usar el término probiótico solo en productos que contengan microorganismos vivos con un recuento adecuado de cepas bien definidas y con una expectativa razonable de brindar beneficios para el bienestar del huésped (Hill et al., 2014). De esta forma, sólo las especies y cepas de bacterias cuyos efectos positivos sobre la salud del huésped hayan sido confirmados, mediante pruebas *in vitro* y estudios clínicos, podrán ser catalogados como probióticos. En el mercado de alimentos, los probióticos que se utilizan principalmente son bacterias ácido lácticas que incluyen especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Ranadheera et al., 2017; Žuntar et al., 2020).

Por otro lado, la ISAPP define un prebiótico como “*un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped y confiere un beneficio para la salud*” (Gibson et al., 2017). La

selectividad es esencial en este concepto porque, a diferencia de las fibras como la celulosa, la pectina y el xilano que promueven el crecimiento de diversos microorganismos en el intestino, los prebióticos estimulan específicamente la proliferación de microorganismos beneficiosos (Hu et al., 2021). Algunas de estas moléculas clasificadas como prebióticos incluyen oligosacáridos de leche humana, inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS) y algunos glucanos (Quigley, 2019). Recientemente, algunos compuestos fenólicos naturalmente presente en alimentos de origen vegetal también han sido catalogados como potenciales prebióticos ya que pueden modular la microbiota intestinal estimulando selectivamente la proliferación de microorganismos benéficos (Rodríguez-Daza et al., 2021). De la gran diversidad de compuestos fenólicos que se encuentran en frutas y verduras, las antocianinas, un tipo de flavonoides responsable de la pigmentación de la mayoría de los llamados frutos rojos, tienen una actividad prebiótica potencial prometedora, además de una alta actividad antioxidante (Leong et al., 2018).

Los beneficios para la salud que aporta el consumo de prebióticos y probióticos se podrían potenciar cuando se utilizan de forma simultánea, es decir, como simbióticos. La ISAPP define un simbiótico como *“una mezcla que comprende microorganismos vivos y sustrato(s) utilizados selectivamente por los microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud del huésped”* (Swanson et al., 2020). En un simbiótico, un componente prebiótico puede favorecer selectivamente a un microorganismo probiótico, mejorando la supervivencia del microorganismo durante el almacenamiento y su paso por el tracto gastrointestinal, aumentando su efecto sobre el intestino delgado y el colon (Markowiak & Ślizewska, 2017). Así, los beneficios para la salud proporcionados por el consumo de productos prebióticos, probióticos y simbióticos que han sido documentados incluyen: 1) reducción de la intolerancia a la lactosa, 2) reducción de los niveles de colesterol, 3) reducción de los síntomas de estreñimiento y diarrea, 4) aumento en la absorción de minerales y compuestos bioactivos, y 5) prevención de ciertas enfermedades crónicas no transmisibles como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, obesidad, cáncer, osteoporosis, entre otras (Fernandes & Rodrigues, 2018; Mustafa & Chua, 2020).

En la industria de alimentos, la inclusión de cultivos probióticos se ha realizado tradicionalmente en productos lácteos como queso, yogur, helados, entre otros; pero el creciente número de personas con intolerancia a la lactosa, con altos niveles de colesterol y con preferencias veganas motivan la investigación de los beneficios de los probióticos y prebióticos en bebidas de fruta y/o vegetales en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades (Bernal-Castro et al., 2019). Además, el consumo de bebidas de frutas y hortalizas, en comparación con otro tipo de alimentos, fomentan la ingesta de compuestos funcionales de forma fácil y periódica (Min et al., 2019). Las bebidas a base de frutas y hortalizas son una alternativa de consumo de los compuestos fitoquímicos encontrados típicamente en estas matrices, además de ofrecer una gran versatilidad en términos de comodidad de consumo, modificación de atributos sensoriales para promover la palatabilidad y la posibilidad de incluir otros componentes con características bioactivas.

Por ejemplo, los jugos de frutas son matrices atractivas para la adición de probióticos debido a que contienen carbohidratos y sustratos que pueden ser metabolizados por microorganismos para su crecimiento, además de su buen perfil nutricional (Valero-Cases et al., 2020). Así, las bebidas probióticas con inclusión de frutas ricas en antocianinas en su formulación se convierten entonces en una alternativa interesante para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales ya que, además del

valor nutricional de las frutas y la adición de microorganismos benéficos, las antocianinas tienen propiedades antioxidantes (Leong et al., 2018), actividad antimicrobiana contra patógenos (Igwe et al., 2019; Lacombe & Wu, 2017) y potencial prebiótico (Lavefve et al., 2020; Yang & Kortensniemi, 2015). Sumado a esto, los frutos rojos son muy apetecidos y ampliamente cultivados en Colombia, comercializándose en grandes cantidades como fruta fresca, jugos, salsas, compotas, dulces y bebidas refrescantes (Bernal-Castro et al., 2019; Sánchez León, 2012). De esta forma, el desarrollo de bebidas probióticas usando frutos rojos disponibles en Colombia puede ser una alternativa viable para incentivar el consumo de este tipo de alimentos funcionales, además de la posibilidad de su obtención a bajo costo, beneficiando toda la cadena de producción, desde agricultores a consumidores.

No obstante, el desarrollo de bebidas probióticas y simbióticas con inclusión de frutas ricas en antocianinas supone varios retos tecnológicos. Por un lado, la viabilidad de los microorganismos probióticos en matrices vegetales es mucho más compleja que en productos lácteos y puede verse afectada por diversos factores (Lebaka et al., 2018). Los frutos rojos, en específico, son matrices hostiles para la supervivencia de microorganismos probióticos debido a su alta acidez y al contenido mismo de compuestos fenólicos (Nualkaekul et al., 2011). Por esta razón, es necesario emplear estrategias que permitan mejorar la viabilidad de microorganismos probióticos en este tipo de matriz, con miras a obtener un producto que, a lo largo de su toda su vida útil, tenga la dosis mínima de microorganismos vivos para proveer beneficios a la salud (Perricone et al., 2015). Algunas estrategias posibles serían el uso de formulaciones que permitan disminuir la acidez inicial (aumentar el pH) y la inducción de fermentaciones mediadas por los mismos microorganismos probióticos, para incrementar su población y mejorar su adaptabilidad al medio (Speranza et al., 2020).

Por otro lado, las antocianinas son relativamente propensas a la degradación, siendo mayor su estabilidad en condiciones ácidas (menor pH), por lo que pueden perderse tanto durante su extracción como en el procesamiento y almacenamiento del producto alimenticio (Navas et al., 2012). Su estabilidad está principalmente influenciada por su estructura química, el pH, la temperatura y la presencia de luz, iones metálicos, oxígeno y enzimas (Novoa Osorio, 2017). Así, los métodos convencionales de disminución de cargas microbiológicas iniciales de las frutas, como los tratamientos térmicos empleados para garantizar la inocuidad de los productos en los cuales se emplean como ingredientes y prolongar la vida útil, pueden causar la pérdida de nutrientes y compuestos bioactivos como las antocianinas y afectar las propiedades fisicoquímicas del producto final, modificando sus características sensoriales (Morales-de la Peña et al., 2016). En este sentido, para el desarrollo de bebidas de frutas, especialmente de aquellas en las cuales se desean adicionar probióticos y otros ingredientes, es importante evaluar el efecto de distintas estrategias de disminución de las cargas microbiológicas iniciales de las frutas y explorar el uso de tecnologías alternativas, como el tratamiento con ultrasonido, con el fin de lograr un menor impacto en las propiedades funcionales y sensoriales (Gallo et al., 2018).

En ese orden de ideas, esta investigación buscó establecer las condiciones de proceso para obtener una bebida con potencial simbiótico a partir de frutos ricos en antocianinas teniendo en consideración los múltiples retos tecnológicos necesarios para su desarrollo, como lo son: (i) el establecimiento de una formulación de bebida a partir de frutas y fibra prebiótica, adecuada en términos de acidez, contenido de antocianinas, apariencia y propiedades fisicoquímicas; (ii) la evaluación de métodos

de pre-tratamiento buscando la disminución de las cargas microbiológicas iniciales pero con un impacto reducido sobre el perfil de antocianinas y propiedades sensoriales como el color; (iii) la definición de las condiciones adecuadas de adición de las cepas probióticas con afinidad hacia la fibra prebiótica para favorecer su capacidad de adaptación a la bebida; y (iv) el análisis de sus propiedades de aceptabilidad sensorial y de estabilidad en el tiempo de sus atributos fisicoquímicos, funcionales y de inocuidad.

El primer capítulo del documento corresponde al marco de referencia tanto de los conceptos como del estado del arte de la investigación. En éste se encuentra una introducción a los aspectos más relevantes relacionados con los frutos como fuentes de antocianinas y con las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y prebióticas que presentan este tipo de compuestos. Se presenta un resumen de algunos de los estudios más recientes realizados sobre el desarrollo de bebidas probióticas, prebióticas y simbióticas empleando frutos fuente de antocianinas. Igualmente, se mencionan algunos conceptos básicos para la comprensión del uso de la tecnología de ultrasonido como método alternativo para la conservación, discutiendo los cambios fisicoquímicos, funcionales y sensoriales que puede generar su uso, a partir de algunos estudios recientes sobre el empleo de esta tecnología para el desarrollo de bebidas probióticas, prebióticas y simbióticas a base de matrices vegetales.

En el segundo capítulo se presentan las consideraciones metodológicas, los resultados y conclusiones de la parte de la investigación que se enfocó en la obtención de una bebida de fruta con potencial simbiótico con inclusión de probióticos, antocianinas y fibra prebiótica. Este componente inicia con la descripción de la formulación de una bebida fuente de antocianinas base para el desarrollo de la bebida con potencial simbiótico. Continúa con la selección de la combinación de un cultivo probiótico y una fibra con potencial prebiótico específico, la cual se realizó evaluando la interacción de dos cultivos (uno axénico y uno conglomerado) con varias fibras prebióticas en un medio de cultivo estándar y evaluando la capacidad de crecimiento del probiótico en la bebida base formulada. Posteriormente, se presenta el estudio que se realizó para la selección de un pre-tratamiento adecuado para la reducción de las cargas microbiológicas de la bebida base con la fibra prebiótica definida, para lo cual se comparó el efecto de los tratamientos de conservación tradicionales (pasteurización y esterilización) y alternativos (ultrasonido) en términos de la presencia de indicadores de contaminación, la concentración y el perfil de antocianinas y las propiedades fisicoquímicas de la bebida final obtenida.

En el tercer capítulo se presentan las estrategias metodológicas, así como los principales resultados y conclusiones del análisis realizado de la viabilidad, la estabilidad microbiológica y la calidad fisicoquímica y bioactiva de la bebida en condiciones de fermentación y almacenamiento refrigerado (4°C, 28 días). En primer lugar, se inoculó el probiótico seleccionado en la bebida formulada y se evaluó su cinética de fermentación durante 24 horas teniendo en cuenta parámetros como la viabilidad, el pH, el consumo de glucosa y fructosa y la producción de ácidos orgánicos. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad del cultivo probiótico en la bebida luego de su fermentación por 24 horas y posterior almacenamiento en refrigeración. De igual forma, se evaluó la calidad microbiológica y los cambios fisicoquímicos producidos en la bebida inoculada durante su almacenamiento en refrigeración por 28 días y se comparó con una bebida control sin inocular. Además, se analizó el efecto del proceso fermentativo y las condiciones de almacenamiento bajo

---

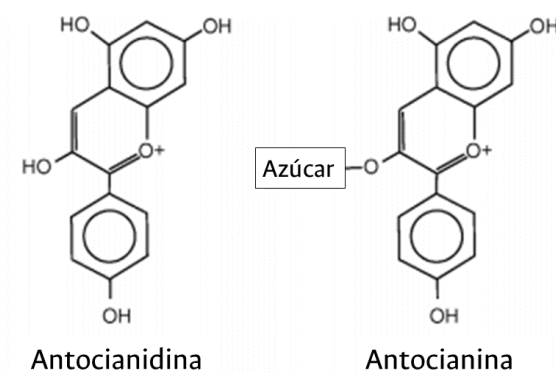
refrigeración sobre el contenido de las antocianinas monoméricas y los compuestos fenólicos totales y sobre la actividad antioxidante (DPPH) de la bebida inoculada y se compararon los resultados contra la bebida sin inocular. Finalmente, se hizo una evaluación de la aceptabilidad de la bebida inoculada y sin inocular con el cultivo probiótico para estudiar el gusto por este tipo de bebidas en el mercado colombiano, específicamente en Bogotá.

# Capítulo 1. Marco de referencia

## 1.1. Frutos fuente de antocianinas

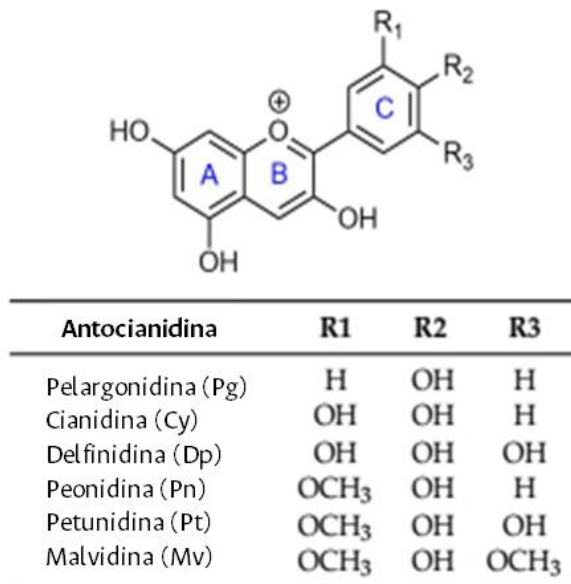
Muchos de los frutos fuente de antocianinas son conocidos como frutos rojos o bayas, los cuales hacen referencia a frutos pequeños, dulces o ácidos, jugosos y de color intenso que crecen en arbustos silvestres y pueden consumirse enteros (Hidalgo & Almajano, 2017). Los frutos rojos pertenecen a las familias *Rosaceae* (fresa, mora, frambuesa, cereza), *Grossulariaceae* (grosella), *Ericaceae* (arándanos), entre otras, y son de gran interés entre nutricionistas y científicos de alimentos por su valor nutricional, su alto contenido en fibra dietaria, su sabor y su olor agradables, su importancia económica y su alto contenido en compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides como las antocianinas y taninos) (Skrovankova et al., 2015).

**Figura 1-1:** Estructura química de antocianidinas y antocianinas.



Modificado de Yahia (2017).

Las antocianinas son los pigmentos solubles en agua más ampliamente distribuido en las plantas, los cuales son responsables de un amplio rango de colores que incluyen azul, púrpura, violeta, magenta y rojo (Leong et al., 2018). Las antocianinas son los derivados glicosilados del catión flavilio también conocido como antocianidinas y su amplio rango de colores se debe a la gran variedad de sustituyentes que puede tener este catión, por lo que el tipo de azúcar presente en la molécula y la acilación de éste afecta el color característico de la molécula (Navas et al., 2012; Yahia, 2017) (Figura 1-1). Existen 17 antocianidinas presentes en la naturaleza, pero solo 6 de éstas se encuentran comúnmente en los alimentos: cianidina (Cy), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg), malvidina (Mv), delphinidina (Dp) y petunidina (Pt) (Figura 1-2) (Hidalgo & Almajano, 2017).

**Figura 1-2:** Estructura del ion flavilio y grupos funcionales de las antocianidinas presentes en frutas.

Tomado de Hidalgo & Almajano (2017).

Las antocianinas son responsables de los diversos beneficios a la salud asociados al consumo de bayas, entre los que se encuentra la prevención de desórdenes inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras; asociadas a su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, neuroprotectiva y antidiabética (Durazzo et al., 2019). En los últimos años, el estudio de las antocianinas se ha centrado en su propiedad antimicrobiana y prebiótica, además de su actividad antioxidante, por su capacidad de influir y modular la microbiota intestinal (Lavefve et al., 2020; Leong et al., 2018; Li et al., 2017).

### 1.1.1. Actividad antioxidante de las antocianinas

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa gracias a su capacidad de reaccionar con radicales libres y detener su reacción en cadena; en este sentido, los antioxidantes son aquellos compuestos caracterizados por tener la capacidad de oxidarse protegiendo de este modo otras sustancias presentes en el medio de reacción (Londoño, 2012). El interés en realizar estudios de estos compuestos radica en el hecho de que pueden intervenir en la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento, las cuales están asociadas al estrés oxidativo caracterizado por un aumento en las especies oxidantes como las especies reactivas del oxígeno (EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de éstas (Li et al., 2017; Pisoschi & Negulescu, 2011). Adicional a esto, en matrices alimenticias, los compuestos antioxidantes van dirigidos a generar una protección frente a reacciones de oxidación que puede causar el deterioro del producto alimenticio y no siempre va dirigido a los efectos *in vivo* que producen estos compuestos (Durazzo et al., 2019).

Los frutos rojos son considerados alimentos ricos en compuestos antioxidantes por su alto contenido en antocianinas y compuestos fenólicos (Jakobek et al., 2007; Marhuenda et al., 2016). Sin embargo, el contenido de estos compuestos varía ampliamente entre los diferentes frutos rojos y en función de las operaciones utilizadas durante el procesamiento de estos frutos. En cuanto al procesamiento, Gancel et al. (2011) evaluaron los cambios que sufren los compuestos fenólicos durante el procesamiento de una bebida de mora encontrando que los procesos térmicos, especialmente el blanqueado, reducen drásticamente el contenido de antocianinas, con lo que el producto final mostró valores reducidos de antocianinas (52%) y actividad antioxidante (47%), y más aún durante su almacenamiento, en especial a altas temperaturas. Adicionalmente, Ah-Hen et al. (2018) encontraron que el extracto exprimido al vapor de la baya murta conservó un alto contenido de compuestos fenólicos luego de su procesamiento y fue capaz de retener el 80% de su contenido en antocianinas y capacidad antioxidante durante su almacenamiento a 5°C durante 21 días. En este sentido, el procesamiento, las condiciones de almacenamiento y los aditivos empleados en la formulación de estos productos afecta de manera significativa el contenido de antocianinas y la actividad antioxidante.

En cuanto a la variación entre frutas, Marhuenda et al. (2016) determinaron la composición de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de frutos de fresa, mora, frambuesa y arándano encontrando buena capacidad antioxidante y altos contenidos de compuestos fenólicos en todas las bayas, presentado diferencias significativas entre ellas, siendo la mora y la fresa las bayas con mayor concentración de antocianinas. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por de Souza et al. (2014) quienes evaluaron frutos de mora, frambuesa, fresa, cereza y arándano.

Varios estudios han encontrado una alta correlación entre el contenido de antocianinas y la actividad antioxidante, así como en su cinética de degradación, en el estudio de diversos frutos (Jakobek et al., 2007; Konić-Ristić et al., 2011; Zhang et al., 2012). Sin embargo, en algunos casos no es suficiente determinar la actividad antioxidante final con base en el contenido de compuestos fenólicos ni los ensayos *in vitro* de actividad antioxidante, pues éstos solo pueden ser parcialmente correlacionados con la actividad antioxidante en las células. La actividad antioxidante de las antocianinas también depende de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de éstas, con lo que varios estudios demuestran que los flavonoides presentan una actividad antioxidante alta en sistemas *in vitro*, pero su efecto *in vivo* se ve afectado por su baja absorción, baja biodisponibilidad y alta tasa de depuración (Leong et al., 2018). Por su baja absorción, las antocianinas pueden llegar casi intactas al intestino y ser catabolizadas por la microbiota intestinal productora de enzimas específicas necesarias para la degradación de estos compuestos, por lo que se sospecha que son los metabolitos de estos compuestos las verdaderas moléculas bioactivas, las cuales son capaces de alcanzar el torrente sanguíneo y los órganos objetivo (Lavefve et al., 2020). En consecuencia, el consumo de antocianinas también tendría una influencia en la población microbiana del intestino como se discutirá a continuación.

### **1.1.2. Potencial prebiótico de las antocianinas**

Los microorganismos que habitan el intestino juegan un rol fisiológico importante en procesos vitales como la digestión, la síntesis de vitaminas y el metabolismo; por lo que la compleja

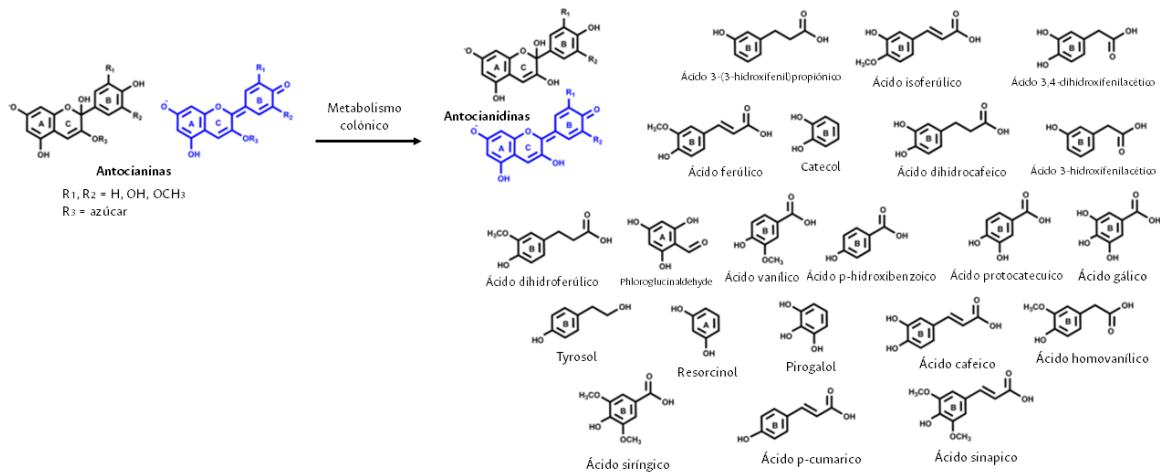


interacción entre la microbiota intestinal y la dieta puede contribuir a la salud general del consumidor y a la incidencia de algunas enfermedades (Quigley, 2019). Por esto, el consumo de frutos rojos como promotores de la salud intestinal radica en su contenido de fibras y compuestos fenólicos; de éstos, los compuestos fenólicos, y en especial las antocianinas, tienen propiedades prebióticas, estimulando el crecimiento de bacterias benéficas como las especies *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Yang & Kortensniemi, 2015).

El efecto de modulación de la microbiota que genera el consumo de los diferentes frutos fuente de antocianinas depende de la dosis, de la duración del tratamiento y de la forma de administración (fruta fresca, extracto, polvo, bebida, etc.) pero, de manera general, se puede afirmar que el consumo de estos frutos inhibe el crecimiento de diversos microorganismos patógenos de los géneros *Clostridium*, *Listeria* y *Salmonella*; a la vez que estimula o no afecta el crecimiento de bacterias benéficas como los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Alqurashi et al., 2017; Molan et al., 2010, 2014; Petersen et al., 2019). También es de resaltar que el consumo de estos frutos fuente de antocianinas disminuye la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* asociada a una mejora de los efectos causados por la obesidad o las inflamaciones del sistema gástrico (Mathur & Barlow, 2015; Tsuda, 2016). Sin embargo, este efecto es dependiente de múltiples factores y no es una tendencia generalizada pues, por ejemplo, Lavefve et al. (2020) encontraron que suplementar con mora y frambuesas ratones bajo una dieta alta en grasas no invierte la tendencia al aumento de la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* pero el consumo de grandes cantidades de honeyberry sí tenía un impacto significativo en el descenso de dicha relación.

Además, al alcanzar el intestino, las antocianinas de la dieta interactúan con la microbiota y pueden ser transformadas y metabolizadas antes de ser absorbidas a través de la mucosa intestinal, aumentando la biodisponibilidad y la actividad antioxidante de las antocianinas (Faria et al., 2014). Estas interacciones involucran la hidrólisis, desmetilación, reducción, descarboxilación, deshidroxilación o isomerización de estos compuestos hasta obtener compuestos más simples que modulan su absorción y actividad biológica (Jamar et al. 2017). Los metabolitos obtenidos en la degradación de las antocianinas son muy diversos, ya que dependen de la estructura de las antocianinas y de los microorganismos que constituyen la microbiota intestinal, sin embargo, en la Figura 1-3 se muestran algunos de los metabolitos comúnmente encontrados y se cree que son estos metabolitos los verdaderos compuestos bioactivos en el cuerpo humano (Lavefve et al., 2020).

**Figura 1-3:** Representación de los metabolitos de las antocianinas encontrados comúnmente en el colon.



Adaptado de Faria et al. (2014).

Hidalgo et al. (2012) evaluaron el metabolismo *in vitro* de las antocianinas presentes en vino de uva por parte de microbiota fecal humana encontrando que las antocianinas fueron casi completamente degradadas (desaparecían del medio de fermentación) en presencia de dicha microbiota con la aparición de nuevos compuestos formados a partir de la metabolización de las antocianinas (ácidos fenólicos o compuestos fenólicos más pequeños); por lo que las antocianinas pueden alcanzar el colon y ser fermentadas por la microbiota intestinal para producir nuevos metabolitos que pueden presentar beneficios a la salud, además de modular positivamente la microbiota intestinal, contribuyendo al mantenimiento de la salud gastrointestinal. Hidalgo et al. (2012) también encontraron que las antocianinas mejoran el crecimiento de las bacterias totales en la microbiota fecal humana y, más aún, causan un aumento significativo en el crecimiento de bacterias benéficas como las especies *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* estimulando el crecimiento de estas bacterias incluso más que los observados empleando FOS.

Guergoletto et al. (2016) reportaron el potencial efecto prebiótico de bayas jucara, fruta rica en antocianinas, por su efecto modulador de la microbiota intestinal en estudios *in vitro* incrementando significativamente el crecimiento de especies *Bifidobacterium* (sin cambios significativos en las especies *Lactobacillus/Enterococcus*) y disminuyendo e incluso desapareciendo *Clostridium histolyticum*, además de que promueve el efecto bifidogénico y los efectos antimicrobianos en microorganismos patógenos por el incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta, ácido acético y ácido propiónico. Zhou et al. (2020) extrajeron, identificaron y cuantificaron las antocianinas presentes en arándanos y determinaron la actividad antioxidante de los extractos de arándano por diferentes métodos y analizaron el impacto que presentan estas antocianinas de arándano en la microbiota intestinal humana por medio de una fermentación *in vitro*, encontrando una actividad antioxidante alta y dependiente del método de determinación, y un incremento en la abundancia de bacterias intestinales, incluyendo las especies *Bifidobacterium*, pero con poca selectividad en comparación con los resultados obtenidos empleando FOS; sin embargo, los resultados sugieren que el consumo de arándanos y sus extractos puede ejercer una actividad prebiótica.

### 1.1.3. Actividad antimicrobiana de las antocianinas

Los productos naturales de frutos rojos no solo están siendo investigados por su potencial prebiótico, sino también por su actividad antimicrobiana al presentar la capacidad de inhibir selectivamente patógenos entéricos mientras promueven el crecimiento de microorganismos benéficos. En este sentido, los extractos de frutos rojos han exhibido actividad antimicrobiana, principalmente por parte de sus compuestos antioxidantes, previniendo la adhesión microbiana, reduciendo la producción de biopelículas y modificando la microbiota intestinal (Lacombe & Wu, 2017). Por lo tanto, las antocianinas pueden presentar efectos inhibitorios en una amplia variedad de bacterias patógenas Gram negativas (*Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella enterica ser. typhimurium*) y Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Enterococcus faecalis*) (Jamar et al., 2017).

Así, múltiples cultivares de arándanos han demostrado propiedades antimicrobianas sobre microorganismos patógenos sin importar el cultivar o la parte de la fruta empleada (fruto entero o cascara) (Burdulis et al., 2009; Lacombe et al., 2012; Park et al., 2011). Un jugo de mora al 10% ha demostrado una reducción de 2-4 log UFC/mL de *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* en leche entera y descremada (Yang et al., 2014). Wu et al. (2008) observaron una reducción de 8 log UFC/mL en *E. coli* O157:H7 y de 3-5,3 log UFC/mL en *L. monocytogenes* en caldo nutritivo tratado durante 1 día con extracto de arándanos (100 µl/ml) y no fueron detectables luego de 5 días de tratamiento.

Se cree que el mecanismo de acción de la inhibición sobre estos microorganismos por parte de los compuestos en los frutos rojos es una acumulación de acciones que incluyen reacciones entre los fitoquímicos con la membrana celular, la desestabilización de la membrana celular por el bajo pH que provocan estos compuestos, la inactivación de enzimas celulares esenciales o la afectación sobre la expresión genética de los microorganismos que genera un impedimento metabólico y funcional (Lacombe & Wu, 2017). El mecanismo de acción aún no es claro, sin embargo, algunos autores reportan que la exposición a extractos concentrados de diferentes frutos rojos causa un daño morfológico en las bacterias por pérdida de la integridad estructural de la pared, membrana y matriz intracelular, lo que provoca una deformación celular, el rompimiento de la pared y membrana celular y la condensación de material celular; la presencia de cantidades significativas de material citoplasmático y de membrana por fuera de la célula luego del tratamiento de bacterias patógenas con extractos y frutos fuentes de antocianinas permiten confirmar estos sucesos (Cisowska et al., 2011).

Sun et al. (2018) encontraron que el tratamiento de patógenos con antocianinas durante 2 horas causa un incremento en la liberación de ácidos nucleicos y proteínas, lo que demuestra la destrucción de la membrana celular, además de observar una disminución en la actividad enzimática y el contenido de proteína total luego del tratamiento con antocianinas. Este estudio también demostró que un incremento en la concentración de antocianinas disminuye la velocidad de producción de formazan (compuesto indicador del funcionamiento mitocondrial de las células), lo que se asocia a afecciones sobre el ciclo de Krebs y, por tanto, a la reducción de la transferencia energética de los patógenos, causando la inhibición de su crecimiento y reproducción. Sun et al. (2018) también postulan que las

antocianinas son capaces de entrar en las células y provocar una disminución en la actividad de enzimas como la fosfatasa alcalina (AKP), la ATPasa y la superóxido dismutasa (SOD), asociadas a diversos procesos metabólicos como la transferencia de información y energía o los mecanismos de autoprotección de las células.

Cuando se considera el potencial antimicrobiano de algún compuesto contra microorganismos patógenos es importante evaluar también el posible impacto que tendría sobre microorganismos benéficos. Respecto a esto, Biswas et al. (2012) afirman que los ácidos orgánicos, los compuestos fenólicos monoméricos, las antocianinas y las proantocianinas de arándanos afectan la viabilidad de las cepas de *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* sin afectar el crecimiento de especies probióticas como *Bifidobacteria bifidum* y *Lactobacillus bulgaris*, en donde se observa que los microorganismos patógenos son dos o cuatro veces más susceptibles a los constituyentes de los arándanos que los microorganismos probióticos. Adicionalmente, Puupponen-Pimiä et al. (2001) demostraron que *S. typhimurium* y *E. coli* CM 871 fueron fuertemente inhibidos por la presencia de arándanos mientras que el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* no se vieron afectadas, sin embargo, otras cepas de lactobacilos sí se vieron ligeramente afectadas.

Así pues, las antocianinas pueden presentar de manera simultánea potencial prebiótico y efectos antimicrobianos frente a microorganismo patógenos, lo que hace a los frutos fuente de antocianinas una matriz aún más interesante para la inclusión de microorganismos probióticos. Coman et al. (2018) probaron que extractos ricos en antocianinas y altos en actividad antioxidante de cáscara de ciruela, uva y diferentes parte de la baya de sauco (elderberry) inhibieron el crecimiento de diversos patógenos (*Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* y *Candida albicans*) y estimularon el crecimiento de los microorganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® y *Lactobacillus plantarum* IMC 509, axénicos y conglomerados. Más aún, los extractos de la baya de sauco mostraron un aumento de la actividad antioxidante después del crecimiento de los diferentes cultivos probióticos, indicando la habilidad de los probióticos para aumentar la actividad antioxidante de este tipo de extractos. Adicionalmente, Yang et al. (2014) observaron una inhibición significativa del crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* O157:H7 al suplementar caldo nutritivo y leche con 10% de jugo de mora al mismo tiempo que estímulo el crecimiento de *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* con lo que se demuestra que el jugo diluido de mora puede presentar un efecto antimicrobiano frente a microorganismos patógenos y un potencial prebiótico frente a microorganismos probióticos.

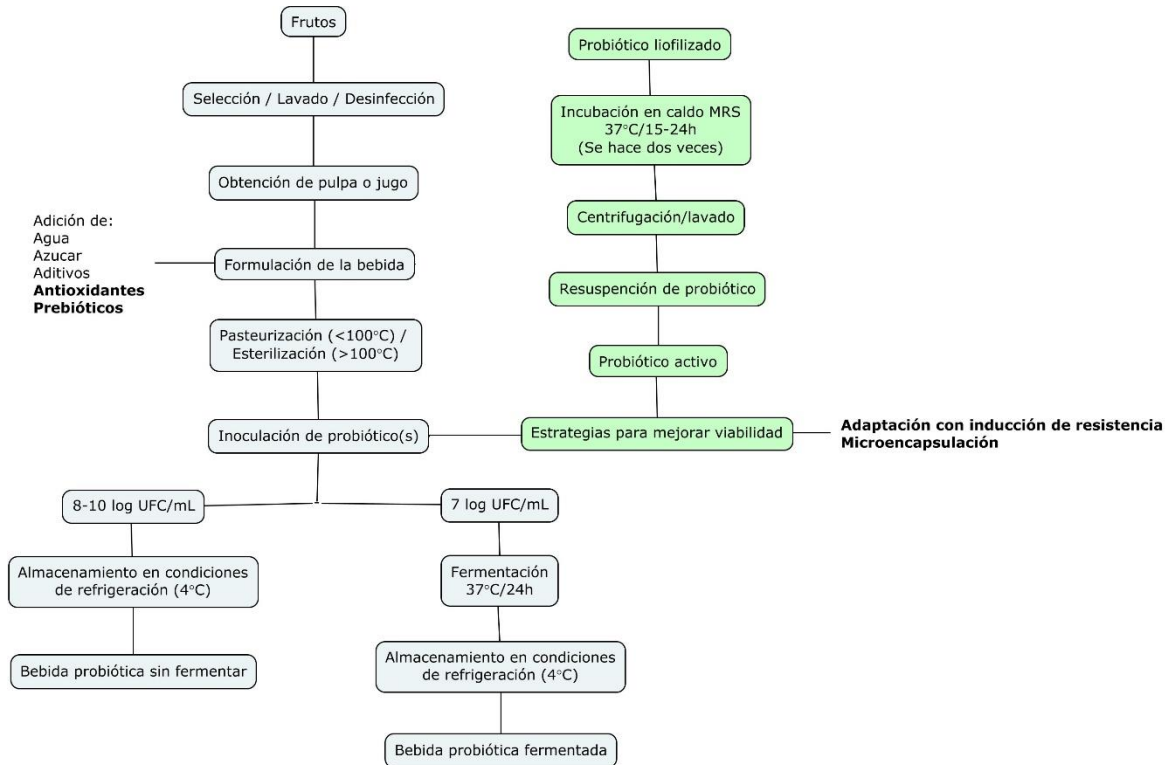
En resumen, se puede afirmar que el consumo de alimentos ricos en antocianinas promueve la proliferación de bacterias anaeróbicas benéficas para la salud del huésped, especialmente las especies *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, a la vez que inhibe el crecimiento de especies patógenas (Igwe et al., 2019). Sin embargo, es de mencionar que la inhibición de microorganismos patógenos no siempre es tan evidente, pues en muchos estudios estas especies patógenas no se ven alteradas con la presencia de antocianinas o disminuyen, pero no presentan diferencias estadísticamente significativas frente a los controles (Boto-Ordóñez et al., 2014; Hidalgo et al., 2012). También se encuentran estudios en los que el crecimiento de la mayoría de las especies intestinales no se ven afectadas por la presencia de un tipo de antocianinas (malvidin-3-glucosido) pero sí por otro tipo

(cianidina-3-glucosido y delphinidin-3-glucosido) que incluso causan una inhibición importante en algunos microorganismos patógenos (Flores et al., 2015).

## **1.2. Probióticos, prebióticos y simbióticos en bebidas de frutos fuente de antocianinas**

La elaboración de una bebida de frutos fuente de antocianinas con inclusión de microorganismos probióticos inicia con la selección de los frutos con alto contenido de antocianinas, especialmente en estado de madurez, con la intención de obtener la mayor cantidad de antocianinas en la bebida final. Luego de la selección, lavado, desinfección y obtención de pulpa o jugo (generalmente por prensado) se procede a desarrollar la formulación de la bebida en donde se definen las proporciones de los ingredientes como el agua, la pulpa o jugo de fruta, el azúcar, los aditivos, los antioxidantes y los compuestos prebióticos. La NTC 3549, que establece los requisitos y ensayos que deben cumplir las bebidas de frutas, especifica que el porcentaje mínimo de jugo o pulpa presente en una bebida debe ser de 8,0%, el porcentaje máximo de sólidos solubles totales debe ser de 13,0°Brix y un pH máximo de 4,6; estos valores deben ser tenidos en cuenta para la formulación de la bebida. Seguido de esto, se realiza un tratamiento térmico para eliminar o disminuir la carga microbiológica en el producto y después de esto se puede realizar la inoculación del probiótico. Las etapas que se siguen para el desarrollo de una bebida de frutas probiótica se resumen en la Figura 1-4.

Existen dos formas de desarrollar una bebida de frutas probiótica: 1) adicionando el microorganismo probiótico a la bebida de frutas sin fermentación y 2) fermentando la bebida luego de la adición del microorganismo probiótico. Muchas bebidas probióticas no lácteas son producidas sin fermentación para evitar la generación de propiedades sensoriales indeseadas como el desarrollo de acidez y cambios de viscosidad, textura, color, sabor y olor comunes en los procesos de fermentación (Ranadheera et al., 2017). Por otro lado, la fermentación permite obtener un producto bajo en azúcar, con una cepa microbiana más adaptada, con una mejor viabilidad y con metabolitos que pueden mejorar la calidad y seguridad del producto, como las bacteriocinas, ácidos orgánicos de cadena corta y/o algunos compuestos bioactivos (Fernandes & Rodrigues, 2018; Pimentel et al., 2019). Durante el proceso de fermentación, se espera la metabolización de los constituyentes de la bebida y un crecimiento de la población de microorganismos probióticos inoculados, por esta razón se suele inocular 7 log UFC/mL, durante la fermentación se da un incremento de UFC y durante su almacenamiento en condiciones de refrigeración se suele observar un decrecimiento de UFC, de esta forma se garantiza la dosis mínima recomendada de probióticos para proporcionar beneficios a la salud (6 log UFC/mL) (di Cagno et al., 2011; White & Hekmat, 2018). Por su parte, al no realizarse la fermentación no se observa un crecimiento en la población de probióticos y se obtiene un descenso durante su almacenamiento, con lo que el inóculo inicial debe ser superior, el cual generalmente se encuentra entre 8 y 10 log UFC/mL (de Oliveira et al., 2020; Hesam et al., 2020).

**Figura 1-4:** Etapas del desarrollo de una bebida de frutas probiótica.

### 1.2.1. Estrategias para mejorar la viabilidad de los probióticos en jugos de frutas

A pesar de que las frutas son una matriz adecuada para el crecimiento de probióticos, la viabilidad de estos microorganismos en estos sustratos es mucho más compleja que en productos lácteos y se ve afectada por: 1) parámetros de la matriz como el pH, la acidez titulable, el oxígeno, la actividad de agua y la presencia de compuestos fenólicos, fibra dietaria, azúcar, compuestos antimicrobianos y aditivos como saborizantes y colorantes; 2) parámetros de procesamiento como los tratamientos térmicos empleados, la temperatura de incubación, la velocidad de enfriamiento, el material del empaque y el métodos de almacenamiento; y 3) parámetros microbiológicos como la cepa probiótica seleccionada y la velocidad y proporción de inoculación (Lebaka et al., 2018). A continuación, se discuten algunas de las estrategias utilizadas para sobrellevar las dificultades esperadas en la inoculación de bebidas de frutas con microorganismos probióticos.

#### Selección de cepa probiótica

La selección de la cepa es un paso determinante en el desarrollo de bebidas probióticas con la viabilidad adecuada para garantizar la dosis mínima recomendada para proveer beneficios a la salud al final de la vida útil del producto. Pese a la diversidad de cepas a las cuales se les ha atribuido un potencial probiótico, se evidencia que en los diferentes estudios de bebidas probióticas o simbióticas de frutas fuente de antocianinas se han empleado para su producción cepas probióticas

principalmente del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (de Oliveira et al., 2020; Nualkaekul et al., 2013; Sheehan et al., 2007); en algunos casos se contempla la adición de cepas *Streptococcus* (Wu et al., 2021), *Pediococcus* (di Cagno et al., 2011) y *Saccharomyces* (Fратиanni et al., 2014). El uso de estas cepas, en especial las pertenecientes al género de *Lactobacillus*, se atribuye a que tanto frutas como vegetales han sido fuente de aislamiento de estas bacterias ácido lácticas, es decir, son cultivos autóctonos y se espera por tanto que puedan resistir a las características fisicoquímicas de estas matrices, siendo su principal y más limitante característica el bajo pH que presentan (Castillo-Escandón et al., 2019).

Se ha observado que la reducción del pH provoca pérdidas en la viabilidad de estos microorganismos (Castillo-Escandón et al., 2019). Sin embargo, la sensibilidad de los probióticos frente a medios ácidos parece depender de la cepa y género en estudio. Así, el género *Lactobacillus* generalmente resiste medios ácidos y sobrevive en pH entre 3,7 y 4,3, mientras que el *Bifidobacterium* es menos tolerante a la acidez y un pH de aproximadamente 4,6 es perjudicial para su supervivencia (Perricone et al. 2015). Por esto, la selección de la cepa del microorganismo probiótico es un punto clave para el desarrollo de este tipo de productos que poseen un bajo pH (Sheehan et al., 2007). En cuanto a esto, Nualkaekul et al. (2011) evaluaron la viabilidad de *Bifidobacterium longum* en bebidas sin fermentar de naranja, toronja, piña, grosella, granada y fresa encontrando que esta cepa era capaz de sobrevivir e incluso ser metabólicamente activa en la bebida de naranja, toronja, piña y grosella por 6 semanas a 4°C pero no fue detectable al final del mismo tiempo en las bebidas de granada y fresa, debido especialmente al bajo pH y alto contenido de compuestos fenólicos. Sheehan et al. (2007) evaluaron la viabilidad de *Lactobacillus salivarius*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* en bebidas sin fermentar de naranja, piña y arándanos encontrando que las cepas *L. paracasei* y *L. rhamnosus* presentaron las mejores viabilidades en las bebidas de piña y naranja superando las 6 log UFC/mL al final de 12 semanas, pero ninguna de las cepas fue detectada en la bebida de arándanos, solo con un ajuste de pH *L. paracasei* logró presentar 7 log UFC/mL al final de 9 días a 4°C. de Oliveira Ribeiro et al. (2020) estudiaron la viabilidad de *B. animalis subsp. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum* en una bebida sin fermentar de banano, fresa y jicara encontrando que la mejor viabilidad en dicha bebida la presentó *L. casei* (7 log UFC/mL), seguida de *L. plantarum* (6 log UFC/mL) y por último *L. acidophilus* y *B. animalis* (4 log UFC/mL) después de 90 días a 4°C.

Por otro lado, la fermentación y el uso de cultivos autóctonos y conglomerados pueden ayudar a mejorar la viabilidad de los microorganismos probióticos y obtener el conteo de UFC al final de la vida del producto necesario para ejercer beneficios a la salud. di Cagno et al. (2011) evaluaron la viabilidad de cultivos conglomerados de *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum* y *Weissella cibaria* aislados de diferentes frutas (moras, ciruelas pasas, kiwis, papaya e hinojos) en un batido fermentado de cerezas, tomates, moras y ciruelas pasas encontrando que tanto la fermentación como el uso de cultivos autóctonos conglomerados permite obtener una cantidad considerable de microorganismos probióticos (9 log UFC/mL) al final de 30 días de almacenamiento a 4°C. Adicionalmente, ajustar el pH de la bebida empleando NaOH o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> puede ser una estrategia para aumentar la viabilidad de los microorganismos probióticos en estas matrices de pH bajo (Sheehan et al., 2007; Wu et al., 2021; Yan et al., 2019), sin embargo, su efecto sobre los aspectos sensoriales y de seguridad del

producto hacen más adecuado el uso de frutas menos ácidas en la formulación de la bebida como proponen Bernal Castro et al. (2017) y Perricone et al. (2014).

### **Adaptación con inducción de resistencia**

La adaptación con inducción de resistencia de microorganismos probióticos consiste en someter al microorganismo a condiciones por debajo de lo letal por un tiempo limitado causando que el microorganismo se acostumbre de cierta forma a dichas condiciones, induciendo un tipo de resistencia y una respuesta adaptativa al estrés (Speranza et al., 2020). Frente a los frutos rojos como base de bebidas probióticas, la mayor limitante es la acidez, por lo tanto, el pH ha sido un factor que se ha tenido muy en cuenta en múltiples investigaciones, por lo que la modificación del pH del medio de crecimiento con el propósito de generar condiciones subletales para adaptar al microorganismo puede usarse como estrategia para mejorar la viabilidad de la cepa en matrices ácidas (Mustafa et al., 2019). Por ejemplo, Srisukchayakul et al. (2018) estudiaron el efecto de la adaptación con ácido cítrico en la supervivencia de *L. plantarum* en jugo de frutas de pH bajo durante su almacenamiento en refrigeración, encontrando que el pretratamiento con ácido cítrico mejora la viabilidad del probiótico en jugos con bajo pH, como jugos de arándanos (pH 2,7), granada (3,5) y lima-limón (pH 2,8). En este estudio también se realizó un análisis del contenido de ácidos grasos de las células adaptadas al medio ácido, observándose un aumento en el contenido de ácidos grasos de ciclopropano, por lo que es probable que este cambio generara una disminución en la fluidez de membrana y una menor permeabilidad de ésta, impidiendo el flujo de protones durante su almacenamiento en estas frutas de bajo pH.

Sin embargo, el pH por sí solo no puede explicar las tendencias que presentan algunos probióticos en las diferentes bebidas de frutas. Respecto a esto, Nualkaekul et al. (2011) investigaron los factores que afectan la viabilidad de *B. longum* en bebidas de naranja, toronja, grosella, piña, granada y fresa, encontrando que luego de 6 semanas de almacenamiento a 4°C, el conteo de UFC solo disminuyó en 0,8 log UFC/mL en naranja, grosella y piña y para toronja fue de solo 0,5 log UFC/mL a pesar de su bajo pH (3,21); sin embargo, el probiótico se encontraba por debajo de los límites de detección después de una semana en la bebida de granada y después de 4 semanas en la de fresa. Estos resultados sugieren que la viabilidad del probiótico resulta de interacciones sinérgicas y antagónicas de diferentes factores como el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas, ácidos orgánicos, proteínas, azúcares, fibras dietarias, entre otras. Así, la suplementación del medio de cultivo con compuestos fenólicos o con una cantidad de la matriz alimenticia (entre 10% y 50%) puede servir como estrategia de adaptación para aumentar la viabilidad del cultivo probiótico en el producto (Speranza et al., 2020). En cuanto a esto, Perricone et al. (2014) evaluaron la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* en jugos de piña, naranja, manzana verde y frutos rojos, de lo cual se encontró que la cepa en estudio presentó una pérdida considerable de su viabilidad en el jugo de frutos rojos debido probablemente a efectos de pH y el contenido fenólico. Por tal razón, en este estudio se inoculó la cepa en un medio de cultivo con contenido de jugo de frutos rojo, ácido vanílico para evaluar estrés fenólico o acidificado a pH 5 para evaluar estrés ácido, con lo que se obtuvo una prolongación de la viabilidad de la cepa en estudio.



### Fortificación con prebióticos

Otra forma de mejorar la viabilidad y estabilidad de los probióticos en las bebidas de frutas es la fortificación de estas bebidas con compuestos prebióticos. En general, la adición de compuestos prebióticos mejora y/o aumenta la viabilidad de los probióticos durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración alcanzando niveles satisfactorios (6 log UFC/mL) en diferentes productos simbióticos, sin embargo, en jugos de frutas ricos en antocianinas y con pH bajo esta tendencia no es tan evidente debido principalmente al ambiente hostil de la matriz y su composición diversa. Por ejemplo, Marín-Arango et al. (2019) no observaron un efecto evidente al usar inulina en el desarrollo de un concentrado de mora inoculado con *L. casei* y encontrando que la viabilidad del microorganismo se veía mayormente afectada por la proporción de concentrado de mora usado y la cantidad de inóculo, siendo las proporciones bajas de mora (10%) y altas cantidades de inóculo (7,49 log UFC/g) las que presentaron mejor viabilidad.

Urbano Marinho et al. (2019) encontraron que el uso de povidexosa en el desarrollo de un sorbete de jussara con inclusión de *L. acidophilus* y *L. paracasei* no afectó la viabilidad del producto almacenado a -18°C por 120 días en comparación con el mismo sorbete sin adición de povidexosa. Por su parte, Hesam et al. (2020) observaron una mayor viabilidad de *B. animalis spp. lactis* en jugo de granada sin fermentar al usar xilooligosacáridos que sin su uso, además de observar un mayor proceso metabólico en la bebida simbiótica con un mayor descenso del pH y aumento de la acidez titulable. Freitas et al. (2021) concluyeron que el uso de FOS y sacarosa mejoraba la viabilidad de *L. casei* en bebida fermentada de açai. Además, White & Hekmat (2018) encontraron que la viabilidad de *L. rhamnosus* no presenta diferencias significativas a lo largo de la fermentación de bebidas de uva, manzana y naranja por 72 horas a 37°C usando o no inulina tanto de cadena corta como de cadena larga; también se observó que la viabilidad en la bebida de naranja no presentó diferencias significativa durante su almacenamiento, mientras que en las bebidas de manzana y uva se observó un descenso de la viabilidad durante su almacenamiento, especialmente en la bebida de uva en cuyo caso no fue detectable al final de los 30 días incluso con la incorporación de inulina. Lo anterior da a entender que, en el desarrollo de bebidas de frutas, el solo uso de compuestos prebióticos no es suficiente para garantizar la viabilidad de los microorganismos probióticos, sino que la composición de la matriz y la cepa probiótica usada son factores que afectan en mayor medida la viabilidad.

### 1.2.2. Cambios fisicoquímicos generados por la inclusión de probióticos en bebidas con antocianinas

En el desarrollo de bebidas de frutas con inclusión de probióticos es importante tener en cuenta los cambios fisicoquímicos y sensoriales que se pueden presentar en el producto debido a la presencia de estos microorganismos y su actividad metabólica en dichas matrices, donde estos cambios serán altamente dependientes de las condiciones del proceso como la temperatura, el pH, la composición química de la matriz, la cepa probiótica y el tiempo de fermentación. Como se mencionó, las bebidas a base de frutos fuentes de antocianinas con inclusión de probióticos pueden desarrollarse permitiendo o no la fermentación por parte de estos microorganismos, con lo que se obtienen cambios fisicoquímicos y sensoriales diferentes. Los cambios fisicoquímicos comúnmente

observados en bebidas fermentadas son las alteraciones del pH, la acidez titulables, el contenido de azúcares y el contenido de compuestos fenólicos relacionadas con el hecho de que los cultivos probióticos son capaces de metabolizar los azúcares y algunos compuestos fenólicos, como las antocianinas y los taninos, presentes en las bebidas de frutas, provocando la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y acético, con la consecuente reducción del pH y el aumento de la acidez titulable y la producción compuestos fenólicos más sencillos que pueden llegar a presentar una actividad antioxidante mayor a la de sus precursores (Ruiz et al., 2021).

En cuanto a esto, Yan et al. (2019) encontraron que la fermentación por 24 horas a 37°C con *L. rhamnosus* y *L. plantarum* de una bebida de arándanos con pH ajustado provocaba la producción de ácido láctico y acético con la consecuente disminución de pH (de 6,2 a 3,8) y aumento de la acidez titulable (de 4 a 16%), cuyo efecto se acentuaba al adicionar glucosa. En este estudio también se observó el aumento de compuestos fenólicos (de 1066,89 µg GAE/mL a 4269,21 µg GAE/mL) y flavonoides (de 81,71 µg RE/mL a 404,99 µg RE/mL) y la disminución en el contenido de antocianinas (de 15,41 µg C3G/mL a 5,44 µg C3G/mL), con un ligero aumento en la actividad antioxidante del producto (de 205,15 mmol Trolox/L a 269,82 mmol Trolox/L). Por su parte, Wu et al. (2021) también observaron la disminución en el contenido de antocianinas al fermentar bebidas de arándanos y mora con *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus* y *B. bifidum* por 48 horas a 37°C, además del aumento en el contenido de ácidos fenólicos y ácido láctico y el aumento de la actividad antioxidante del producto fermentado.

La acidificación por parte de los probióticos, en parte, es deseada pues aumenta la vida útil y seguridad del producto, sin embargo, puede disminuir la aceptabilidad del consumidor y afectar la viabilidad durante el almacenamiento del cultivo probiótico debido a la alta acidez. Por lo anterior, es recomendable emplear cultivos probióticos con tolerancia a ambientes ácidos y con actividad metabólica lenta o desarrollar el producto evitando el proceso de fermentación con lo que los cambios fisicoquímicos no se observan comúnmente. En este sentido, estudios como los realizados por de Oliveira Ribeiro et al. (2020), Lai et al. (2020), Nualkaekul et al. (2011) y Perricone et al. (2014) demuestran que durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración de bebidas de frutas fuentes de antocianinas con inclusión de cultivos probióticos sin fermentar se puede observar un ligero descenso del pH y el contenido de azúcares pero estos cambios no son estadísticamente significativos, esto se debe a que los microorganismos probióticos en condiciones de refrigeración ralentizan su actividad metabólica significativamente.

En cuanto a los cambios que presentan los compuestos fenólicos presentes en las bebidas de frutas por la inclusión de probióticos, se observa de manera general que el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas y actividad antioxidante disminuye durante su almacenamiento en condiciones de refrigeración. Esto se relaciona fuertemente con la baja estabilidad que presenta este tipo de compuestos frente a diversas condiciones como el pH, el oxígeno, la luz, la temperatura, entre otras, generando su degradación a lo largo del tiempo. de Oliveira Ribeiro et al. (2020) observaron una disminución en el contenido de antocianinas de una bebida de banana, fresa y júcara inoculada con *L. casei* y *L. plantarum* en almacenamiento a 4°C por 90 días. Por su parte, Urbano Marinho et al. (2019) encontraron que el contenido de antocianinas no se ve afectado en un sorbete de jussara con inclusión de *L. acidophilus* y *L. paracasei* y polidextrosa almacenado a -18°C por 120 días, debido a que las bajas temperaturas afectan menos la estabilidad de las antocianinas.

### 1.2.3. Cambios sensoriales generados por la inclusión de probióticos en bebidas con antocianinas

Las propiedades sensoriales son otro factor importante en el desarrollo de productos con inclusión de probióticos, puesto que la incorporación de probióticos puede causar alteraciones en el sabor, aroma y textura del producto durante su almacenamiento y, por ende, cambiar la aceptabilidad del producto. Se ha reportado que la adición de probióticos a jugos de frutas puede generar sabores descritos como lácteos, medicinales, ácidos, salados, amargos, astringentes y artificiales, los cuales dependen del tipo de fruta, la cepa probiótica, la temperatura de almacenamiento y el uso de prebióticos o estrategias de encapsulación (Lebaka et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de las bebidas fuentes de antocianinas con inclusión de probióticos presentan una buena aceptabilidad, incluso mayor a los productos sin inclusión o fermentación de estos microorganismos, observándose una disminución de la aceptabilidad a lo largo de su almacenamiento (di Cagno et al., 2011; Freitas et al., 2021; Hesam et al., 2020; Mantzourani et al., 2020).

En general se ha descubierto que las bebidas simbióticas con frutas fuente de antocianinas tienen una alta aceptabilidad sensorial en cuanto a color y más baja en cuanto a olor y sabor, siendo el último potencialmente modificado negativamente por el tiempo de almacenamiento; aunque esta aceptabilidad puede mejorar. Un estudio reciente, realizado en jugos de açaí con adición de FOS y sucralosa, comparado con adición de FOS y sacarosa, concluyó que, a nivel sensorial, después de 42 días de almacenamiento, la aceptabilidad sensorial por el jugo con adición de sucralosa fue mayor al compararlo con la sacarosa representando así una buena opción en la elaboración de productos comerciales (Freitas et al., 2021). Uno de los defectos sensoriales más comunes en bebidas fermentadas es el sabor característico conferido por los probióticos (ácido y ausente de dulce); sin embargo, se han reportado casos en los que esto no sucede; tal es el caso de una bebida de cereza corneliana fermentada con *L. paracasei* desarrollada por Mantzourani et al. (2019), la cual presentó alta aceptabilidad sensorial en cuanto al sabor.

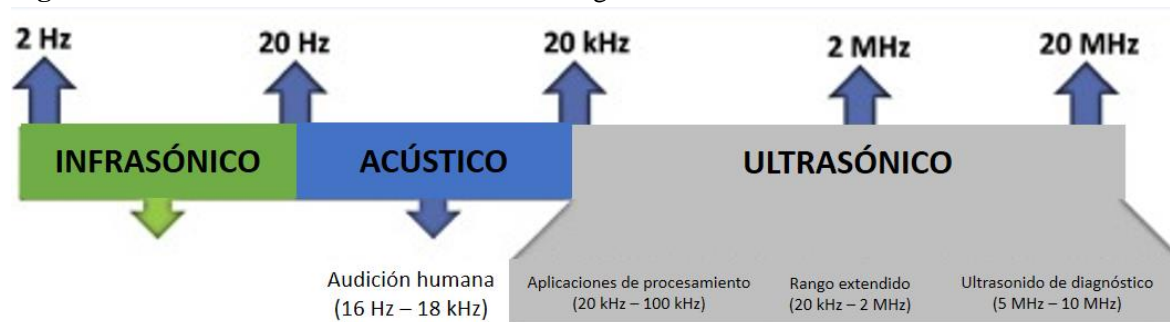
Por su parte, Perricone et al. (2014) mostraron que la adición de *L. reuteri* a jugos de manzana, piña, naranja y frutos rojos no ejerció ningún impacto negativo en los atributos sensoriales de estas bebidas. El mismo estudio realizado por di Cagno et al. (2011), en cuanto a los atributos sensoriales de los batidos de frutos rojos, encontró que no hubo diferencia significativa entre los batidos inoculados y los no inoculados en cuanto a la acidez, la astringencia y la apariencia; sin embargo, los batidos sin inocular tuvieron una mejor aceptabilidad, lo que se atribuye al menor cambio de color, principalmente. Aunque también se encontró una buena aceptabilidad por la bebida inoculada con probiótico. Así pues, algunos estudios han demostrado que la aceptabilidad de las bebidas de frutas probióticas es similar al de las bebidas convencionales sin adición de probióticos; sin embargo, en caso de presentarse alteraciones organolépticas en la bebida probiótica desarrollada se pueden emplear estrategias como las adiciones de saborizantes o aromas para enmascarar la presencia de los probióticos. Se han usado frutos tropicales como piña, mango y maracuyá de manera exitosa para enmascarar el sabor medicinal causado por los probióticos y mejorar la calidad sensorial y aceptabilidad de jugos probióticos (Pimentel et al., 2019). Es de destacar que factores no sensoriales, como el hecho de informar al consumidor sobre los beneficios a la salud que proporciona el consumo de este tipo de bebidas funcionales, también influye significativamente en la aceptabilidad del

producto. En este aspecto, Luckow et al. (2006) determinaron que factores no sensoriales, como el consumo repetitivo y la información de los beneficios a la salud, tienen un impacto positivo sobre el agrado del consumidor por una bebida probiótica de naranja.

### 1.3. Ultrasonido (US) como método de inactivación microbiana

El ultrasonido es una técnica basada en la generación de ondas mecánicas a frecuencias por encima del umbral de la audición humana (>16kHz) (Ojha et al., 2017). El ultrasonido puede ser clasificado en tres categorías basado en el rango de frecuencia como: 1) ultrasonido de baja frecuencia o de potencia con frecuencias entre 20 y 100 kHz; 2) ultrasonido de alta frecuencia o sonoquímica de rango extendido con frecuencias entre 20 kHz y 2 MHz; y 3) ultrasonido de diagnóstico con frecuencias superiores a 2 MHz, ver Figura 1-5 (Ojha et al., 2017).

**Figura 1-5:** Clasificación de las ondas sonoras según su frecuencia.



Tomado de Ojha et al. (2017)

La aplicación de ultrasonido de potencia en matrices líquidas provoca cavitación acústica, lo cual consiste en la generación, crecimiento y eventual colapso de burbujas lo que provoca efectos térmicos, mecánicos y químicos (Singla & Sit, 2021). Los efectos mecánicos incluyen cambios de presión, turbulencia y esfuerzos de cizalla; mientras que los efectos químicos involucran la generación de radicales libres; y los efectos térmicos implican la generación de altas temperaturas en las zonas de cavitación (Majid et al., 2015). Esta tecnología se ha empleado en procesos como emulsificación, eliminación de espuma, descontaminación, extracción, desgasificación, cristalización, precipitación, limpieza, extrusión, tratamiento de aguas residuales y ablandamiento de carnes (Singla & Sit, 2021). Sin embargo, su uso como método de conservación de alimentos ha llamado especialmente el interés de los investigadores, en donde se emplean los efectos del ultrasonido para la inactivación de enzimas y diversos microorganismos patógenos sin afectar negativamente la calidad nutricional y sensorial del producto (Gallo et al., 2018).

El efecto de inactivación microbiana por parte del ultrasonido se debe a la generación de la cavitación acústica que lleva al incremento de la permeabilidad de las membranas, pérdida de selectividad, disminución del grosor de la membrana celular, confinamiento de calor y formación de radicales hidroxilo (Majid et al., 2015). Algunos estudios han atribuido el efecto de inactivación microbiana del ultrasonido a la generación de cavitación intracelular, lo que causa un shock mecánico que afecta la estructura celular y sus componentes hasta el punto de causar lisis celular (Chemat et al., 2011).

Se estima que frecuencias entre 20 y 60 kHz mejoran los efectos del ultrasonido sobre la inactivación de microorganismos (Ercan & Soysal, 2013).

Liao et al. (2018) evaluaron el mecanismo de acción y el efecto del ultrasonido sobre *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva) concluyendo que el tratamiento con ultrasonido puede generar un daño intracelular al ADN y una inactivación enzimática sin causar daños en la pared celular, lo que lleva a una inapropiada actividad celular y posterior muerte; por lo tanto, los investigadores atribuyeron el efecto bactericida del ultrasonido al ingreso de radicales libres generados por la sonólisis del agua por los efectos de cavitación al interior de la célula. La ruptura celular causada por la fuerza mecánica de la cavitación no es el único mecanismo de acción en la inactivación de microorganismos con ultrasonido, sino que incluso puede ser el efecto que se presente en menor proporción como comprobaron Liao et al. (2018) al observar un número mucho menor de células con daños o permeabilidad en la pared celular en comparación al número de células no viables que generó el tratamiento ultrasónico.

Los factores críticos en el procesamiento de alimentos como método de conservación con ultrasonido involucran la naturaleza de las ondas ultrasónicas, el tiempo de exposición, el tipo de microorganismos, el volumen de alimento procesado, la composición del alimento, la temperatura y la presión. Respecto al tipo y forma del microorganismo, se puede afirmar que en general las células alargadas son más sensibles que células pequeñas, debido, probablemente, a su mayor área superficial; así pues, los cocos son más resistentes que los bacilos frente a los efectos del ultrasonido (Charoux et al., 2019). Adicional a eso, las bacterias Gram positivas han mostrado ser más resistentes que las Gram negativas, posiblemente, debido a que poseen una pared celular más gruesa lo que las provee de una mejor protección frente a los efectos del ultrasonido (Chemat et al., 2011).

En ese sentido, D'Amico et al. (2006) evaluaron el efecto del ultrasonido (frecuencia de 20 kHz, amplitud de 100%, potencia de 150 W e intensidad de 118 W/cm<sup>2</sup>) sobre *E. Coli* O157:H7 (bacilo Gram negativo) en cidra de manzana y *L. monocytogenes* (bacilo Gram positivo) en leche, observándose una reducción en el número de células viables en ambos estudios, incluso a temperatura ambiente o con un calentamiento leve (57°C). Además, Juraga et al. (2011) trabajaron con ultrasonido de alta intensidad para evaluar la inactivación de Enterobacterias (Gram negativas con morfología de cocos o bacilos) en leche cruda, variando parámetros como la temperatura (20°C, 40°C y 60°C), amplitud (120, 90 y 60 μm) y tiempo (6, 9 y 12 min). De este trabajo se concluyó que la inactivación de microorganismos mediante ultrasonido es dependiente de los tres parámetros evaluados, alcanzándose mayor inactivación de los microorganismos con tiempos largos de exposición, aumentos de temperatura y mayores amplitudes.

En cuanto a los mohos y levaduras, se encuentra que generalmente son más resistentes que los microorganismos vegetativos, pero menos que las esporas (Charoux et al., 2019). Sin embargo, Wordon et al. (2012) estudiaron la viabilidad, el daño y la muerte de *Saccharomyces cerevisiae* bajo la aplicación de ultrasonido encontrando una mayor inactivación de este microorganismo al usar ultrasonido en conjunto con la aplicación de calor, los cuales actúan de manera sinérgica, y sugieren que el uso de altas frecuencias de ultrasonido es más eficiente en la eliminación de microorganismos. Ferrario et al. (2015) lograron una reducción de 2,5 log de *S. cerevisiae* en jugo de manzana aplicando

un tratamiento de ultrasonido (20 kHz) por 30 min, sin embargo, obtuvieron una reducción de 5,8 log al realizar un posterior tratamiento con luz pulsada a 56°C. Guimarães et al. (2018) emplearon un tratamiento con ultrasonido (19 kHz por 3 min) como método de inactivación de bacterias mesófilas aeróbicas, mohos y levaduras en una bebida de lactosuero, obteniendo una reducción similar a la producida por un tratamiento térmico de baja duración (72°C por 15 s), observándose una menor reducción en mohos y levaduras (menos de 1 log). Režek Jambrak et al. (2018) evaluaron el tratamiento con ultrasonido en jugos y néctares de manzana, arándano rojo y arándano morado variando la temperatura (20, 40 y 60°C), el tiempo (3, 6 y 9 min) y la amplitud (60, 90 y 120  $\mu\text{m}$ ) del tratamiento; encontrando que todas las muestras tratadas a 60°C a los diferentes tiempos de duración y de amplitud lograban la inactivación completa del crecimiento de los mohos y levaduras evaluados logrando reducciones entre 3,6 y 5,9 log, mientras que los tratamientos a 20 y 40°C eran insuficientes. Este estudio también confirmó que ninguno de los tratamientos con ultrasonido fue eficiente en la inactivación de la bacteria formadora de esporas *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

La presión y la temperatura del medio durante el tratamiento con ultrasonido son otros factores importantes que afectan el efecto letal del ultrasonido. Zhu et al. (2017) evaluaron el efecto sobre *E. coli* O157:H7 en jugo de arándanos de diferentes tratamientos: tratamiento térmico (HT: 80 °C), sonicación (SC: 280, 420, 560 y 700 W por 10 min), termosonicación (TS: 30, 40, 50, 60 °C, 280, 420, 560, and 700 W por 10 min), manosonicación (MS, 560 W y 350 MPa) y manotermosonicación (MTS, 560 W, 40 °C y 350 MPa). Este estudio encontró que el tratamiento con sonicación no era suficiente para la inactivación de *E. coli* sin importar la intensidad usada obteniéndose valores entre 0,1 y 0,3 log de reducción; por su parte el tratamiento térmico resultó con una reducción de 2,00 log; la termosonicación provocó reducciones entre 0,13 y 5,10 log donde las mayores reducciones se obtuvieron a mayores temperaturas e intensidades; la manosonicación presentó una reducción de 5,2 log y la manotermosonicación una reducción de 5,85 log, después de 5 minutos de tratamiento.

De forma general, los microorganismos toleran más los efectos del ultrasonido cuando se encuentran en matrices alimenticias o medios complejos en comparación a cuando se encuentran en soluciones buffer o salinas; este comportamiento ha sido atribuido a la protección que ejercen los componentes de las matrices alimenticias sobre los microorganismos contra los efectos del ultrasonido (Villamiel et al., 2017). Sin embargo, hay estudios que demuestran que puede ser un método efectivo de inactivación de microorganismos en bebidas. Por ejemplo, Gabriel (2014) estableció los parámetros de la cinética de inactivación de las bacterias patógenas *E. coli* O157:H7, *S. entérica* y *L. monocytogenes*, además de las levaduras causantes de deterioro *Debaryomyces hansenii*, *Clavispora lusitaniae*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia fermentans* y *S. cerevisiae*, en jugo de naranja tratado con baño de ultrasonido multi-frecuencia en donde la frecuencia se alternaba entre 28, 45 y 100 kHz cada 1 ms para maximizar la cavitación, obteniéndose valores D (tiempo de reducción decimal, tiempo necesaria para obtener 1 log o 90% de inactivación) de 2,95, 3,42 y 3,48 min para *E. coli*, *S. entérica* y *L. monocytogenes*, respectivamente; mientras que los valores D de las levaduras en estudio se encontraban en el rango entre 1,41 y 6,10 minutos, siendo las más resistentes las levaduras *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae*. Este estudio demuestra la efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos y causantes de deterioro en bebidas usando tratamiento con ultrasonido prolongados (30-40 min) y recomiendan combinar el tratamiento con un calentamiento medio.

El efecto letal del ultrasonido depende de la intensidad de la cavitación, lo que a su vez depende de múltiples parámetros físicos, entre los cuales la frecuencia y amplitud son los más importantes. Se suele trabajar a frecuencias constantes de 20 kHz, pues permiten la generación de burbujas de cavitación grandes que liberan más energía, pero a valores superiores a éstos, la formación de burbujas se dificulta y no se da a frecuencias mayores a 2,5 MHz (Villamiel et al., 2017). En cuanto a la amplitud, se ha observado que a mayores amplitudes más rápida es la inactivación de microorganismo, lo que puede deberse al incremento del número de burbujas de cavitación que colapsan por unidad de tiempo en un volumen dado y/o al incremento del volumen del líquido propenso a la cavitación (Majid et al., 2015).

### **1.3.1. Efectos del US sobre características fisicoquímicas y organolépticas**

Además del estudio del ultrasonido sobre la inactivación de microorganismos, se han realizado múltiples investigaciones de los efectos del ultrasonido sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de diversas matrices alimenticias, así como los cambios provocados por este tratamiento sobre compuestos bioactivos para la obtención de productos de alta calidad y con un mínimo procesamiento. A continuación, se resumen algunos de estos estudios.

En general, se reporta que el tratamiento con ultrasonido tiene un efecto mínimo en la calidad general de los jugos de fruta, conservándose el pH, acidez y sólidos solubles (Cervantes-Elizarrarás et al., 2017; Ramírez-Moreno et al., 2018). El cambio de color producido por el ultrasonido también ha sido un factor importante a evaluar, pues es el primer parámetro que considera el consumidor al evaluar la calidad del producto y determinar su aceptación sensorial. En cuanto a este aspecto, se ha observado que el color varía, pero no de manera notoria bajo tratamientos con ultrasonido (Bhat et al., 2011; Režek Jambrak, Šimunek, & Djekic, 2018). Adicionalmente, se atribuye al tratamiento con ultrasonido la mayor disponibilidad y extractabilidad de compuestos fenólicos y ácido ascórbico, presentando así una marcada importancia en la mejora de la capacidad antioxidante de diversos jugos (Aadil et al., 2013; Zafra-Rojas et al., 2013). Además, estos estudios en general concluyen que el contenido de antocianinas se mantiene o aumenta después de su procesamiento con ultrasonido y que, a su vez, éste tiene un efecto mínimo en la degradación de antocianinas (Pérez-Grijalva et al., 2018; Tiwari et al., 2009).

Una de las ventajas de emplear ultrasonido en el procesamiento de alimentos es la poca variación que presenta sobre las propiedades de los alimentos y el incremento en el contenido de compuestos bioactivos en comparación con los tratamientos térmicos como la pasteurización. Así pues, Santhirasegaram et al. (2013) realizaron un estudio comparando estos dos métodos aplicados a jugo de mango observando que, a diferencia del tratamiento ultrasónico, la pasteurización provoca cambios notorios en el color del jugo, así como un incremento en la turbidez del mismo. Adicionalmente, el tratamiento térmico causó una disminución significativa en el contenido de carotenoides y polifenoles, mientras que se observó un aumento para las muestras tratadas con ultrasonido. Finalmente, se observó en este estudio que la actividad antioxidante del jugo no cambia en las muestras tratadas con calor, pero aumenta significativamente en las muestras tratadas con ultrasonido.

Por su parte, Gomes et al. (2017) observaron un incremento en el contenido de antocianinas en un jugo de arándanos tratado con altas presiones (450 MPa por 5 min) seguido de ultrasonido (18 kHz, 500 W, 600 y 1200 W/L por 5 min a temperatura ambiente). El aumento en el contenido de antocianinas observado en este estudio se atribuyó a la extracción de antocianinas unidas a la pulpa en suspensión. En este estudio también se observó que a alta densidad de potencia ultrasónica (600 W/L), la degradación de las antocianinas sobrepasaba el proceso de extracción de las mismas con lo que se observaba una disminución en el contenido de antocianinas, relacionado principalmente a la formación de radicales hidroxilo durante la aplicación del ultrasonido. Wang et al. (2019) evaluaron la influencia de tratamientos con ultrasonido (20 kHz, 400 W durante 0, 4, 8, 12, y 16 min) en el color, la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico y la microestructura de un jugo de fresa, encontrando que el tratamiento durante 16 minutos incrementa la diferencia en el color de la muestra en comparación a la muestra sin tratamiento, pero sin llegar a ser un cambio percibido por el ojo humano ( $\Delta E=1,01$ ). También se observó un mayor aumento en el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico y actividad antioxidante en las muestras tratadas durante 12 min siendo incluso mucho mayor que la muestra sin tratamiento. Estos efectos se atribuyeron a la remoción del oxígeno disuelto debido a la cavitación producida por el ultrasonido y, según el análisis de microestructura, a la formación de formas irregulares, el desgarrado y la pérdida del tejido y la distorsión de la pared celular lo que explica porque el ultrasonido mejora la eficiencia de extracción de fitoquímicos.

Zhu et al. (2017) evaluaron el efecto en el contenido de antocianinas en jugo de arándanos luego de diferentes tratamientos: tratamiento térmico, sonicación, termosonicación, manosonicación y manotermosonicación. En este estudio se observó que los tratamientos térmicos a bajas temperaturas no provocaban una pérdida importante de antocianinas (antocianinas residuales de 99.05%, 98.15%, 96.46% y 94.49% a 30 °C, 40 °C, 50 °C y 60 °C por 10 min, respectivamente) pero a temperaturas de 70 y 80°C se obtenía una pérdida de antocianinas más considerable (antocianinas residuales de 86,03 y 82,64%, respectivamente). También se observó que los tratamientos de sonicación a potencias mayores generan un mayor descenso en el contenido de antocianinas sin llegar a ser importante (retención de antocianinas de 98.68%, 98.26%, 97.82% y 96.93% a potencias de 280, 420, 560 y 700 W, respectivamente). Por su parte, los tratamientos de termosonicación no mostraron una diferencia significativa en el contenido de antocianinas al emplear temperaturas de 30 y 40°C, pero al aumentar la temperatura y potencia se observó un descenso en el contenido de antocianinas, donde la menor retención de antocianinas (91,64%) se obtuvo al trabajar a 60°C y 700W. Por último, empleando altas presiones en conjunto con ultrasonido se obtienen resultados similares a los obtenidos en los tratamientos de termosonicación, con lo que el tratamiento de manotermosonicación con las condiciones máximas (350 MPa/40 °C/560 W/20 min) presentó la menor retención de antocianinas con un valor de 94,74%. Zhu et al. (2017) concluyen que la combinación de tratamientos de sonicación con altas presiones y/o temperaturas medias son estrategias superiores tanto para la seguridad como para la preservación de antocianinas en jugo de arándanos en comparación con los tratamientos térmicos tradicionales.



### 1.3.2. Desarrollo de bebidas prebióticas empleando US

La incorporación de prebióticos en las bebidas de frutas presenta varios retos tecnológicos, pues su inclusión no debe afectar las propiedades organolépticas del producto y debe ser químicamente estable durante el procesamiento de la bebida, sin verse afectado significativamente por altas temperaturas, bajo pH y/o condiciones que provoquen reacciones de Maillard. Esto último, es de especial importancia pues, si se da la degradación o alteración de los compuestos prebióticos a sus componentes mono y/o disacáridos, el prebiótico no estará disponible para estimular el crecimiento selectivo de bacterias, disminuyendo su actividad prebiótica, y no proporcionará los beneficios a la salud esperados (Hurtado-Romero et al., 2020).

Estudios demuestran que el tratamiento con ultrasonido no afecta de manera significativa la estructura y propiedades de compuestos prebióticos incluidos en diversas bebidas. Por ejemplo, Alves Filho et al. (2016) evaluaron los cambios que presentan los FOS en una solución acuosa (para evaluar el efecto directo sobre la hidrólisis de FOS) luego de ser tratados con ultrasonido (600 y 1200 W/L por 5 min) seguido de un procesamiento con alta presión (450 MPa por 300 s), concluyendo que el tratamiento no provocaba cambios en la composición de los FOS bajo el análisis del espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR y del perfil de azúcares (FOS con diferentes grados de polimerización, glucosa y fructosa) y su cuantificación con HPLC-RID, antes y después del tratamiento, indicando que el tratamiento empleado no causa la hidrólisis de los FOS. Silva et al. (2020) observaron que al tratar un jugo de naranja enriquecido con XOS con ultrasonido de alta intensidad (20 kHz, 300-1200 W por 10 min con temperaturas entre 50 y 90°C) el perfil cromatográfico de los XOS no cambiaba y la cantidad de todos los compuestos del prebiótico y los azúcares permanecía constante, demostrando que la estructura molecular de los XOS no se fragmentaba en xilosa y en unidades de XOS de cadenas más cortas debido a reacciones de hidrólisis. Este estudio demostró que el pH y el contenido de sólidos solubles en la bebida prebiótica no se ven afectados por el tratamiento con ultrasonido, sin embargo, se observó un descenso en el contenido de ácidos orgánicos, en el contenido de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante al aumentar la intensidad o poder del tratamiento.

Gomes et al. (2017) evaluaron el efecto de un tratamiento con ultrasonido (18 kHz, 500 W, 600 y 1200 W/L por 5 min a temperatura ambiente) seguido de un tratamiento de alta presión (450 MPa por 5 min) sobre la calidad de una bebida de arándanos fortificada con FOS, encontrando una alta retención de ácidos orgánicos (>90%) y un aumento en el contenido de antocianinas de hasta 24%. Además, el cambio en el color, los sólidos solubles totales y pH fueron insignificantes. Sin embargo, el tratamiento con ultrasonido provocó un ligero cambio en el perfil de FOS y una pequeña disminución de FOS con grados de polimerización mayores y un aumento en el contenido de FOS de bajo grado de polimerización, denotando una ligera hidrólisis de los FOS; a pesar de que estos cambios fueron estadísticamente significativos, los autores resaltan que son cambios tan pequeños que en realidad no implican una degradación de FOS significativa.

Según los estudios realizados en diversas bebidas y matrices con inclusión de prebióticos, los tratamientos con ultrasonido de alta intensidad parecen no afectar de manera considerable la estructura de los prebióticos, por lo que no provoca, o solo en cierto grado, la hidrólisis de éstos, lo

que permite mantener la concentración de prebióticos recomendada y proveer beneficios a la salud al ser consumidos. De esta forma y en comparación con tratamientos térmicos convencionales, el ultrasonido de potencia es una tecnología alternativa eficiente para la inactivación de enzimas y microorganismos, que provocan la degradación de los productos, mientras permite mantener las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto e incluso mejorarlas. En este sentido, los tratamientos con ultrasonido pueden aumentar el contenido de compuestos fenólicos y por ende mejorar la capacidad antioxidante del producto, no descomponen en mayor medida los compuestos prebióticos y conservan el color, características reológicas y el aspecto fresco del producto final, presentando una buena estabilidad y aceptabilidad por parte de los consumidores durante su almacenamiento.

### 1.3.3. Desarrollo de bebidas probióticas y simbióticas empleando US

El ultrasonido se ha usado como método de pretratamiento para obtener bebidas como sustrato de microorganismos probióticos con un alto valor nutricional, un alto contenido de compuestos bioactivos y nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo del cultivo probiótico. En este sentido, Fonteles et al. (2013) estudiaron la cinética de fermentación de *L. casei* B-442 en un jugo de melón cantaloupe sonicado (19 kHz, 376 W cm<sup>-2</sup> por 10 min) y evaluaron la viabilidad y varios parámetros de calidad de la bebida fermentada (8h a 31 °C y pH 6.16) durante su almacenamiento (4°C) por 42 días. En este estudio se encontró que *L. casei* B-442 fue capaz de fermentar la bebida de melón con una buena velocidad de crecimiento y viabilidad, usando únicamente los azúcares y nutrientes naturales presentes en la bebida sin ser necesario la adición de éstos, por lo que el tratamiento de ultrasonido no afectó la calidad nutricional de la bebida, si no que mejoró significativamente el crecimiento y el conteo de células viables en comparación con la bebida sin tratamiento con ultrasonido. También, se observó un aumento de la acidez de la bebida y una ligera reducción en el número de células viables durante el almacenamiento, pero se alcanzaron los niveles recomendados de consumo de probióticos al final de su almacenamiento.

Además, Costa et al. (2013) evaluaron el uso de una bebida de piña tratada con ultrasonido (19 kHz, 376 W cm<sup>-2</sup> por 10 min) como sustrato para la producción de una bebida probiótica con *L. casei* NRRL B442. En este estudio se encontró que la bebida de piña sonicada es un sustrato adecuado para el desarrollo de una bebida probiótica fermentada con *L. casei* NRRL B442, donde luego de 42 días de almacenamiento (4°C) la viabilidad del microorganismo fue de 6,03 log UFC/mL en la bebida sin adición de azúcar y 4,77 log UFC/mL con adición de azúcar, la mayor disminución en la viabilidad de la bebida con adición de azúcar se atribuye a una mayor fermentación y producción de ácido láctico. También se observó un descenso en el pH durante el almacenamiento de la bebida debido a la producción de ácido láctico, pero se obtuvo una buena aceptación de la bebida y el uso de un pretratamiento con ultrasonido permitió prevenir el pardeamiento de la bebida de piña.

Por su parte, Vivek et al. (2019) emplearon el ultrasonido (20 kHz, 250 W y amplitud de 80% por 15 min con pulsos de 3 s) en la reducción de carga microbiológica de jugo de Sohiong (fruto de la india rico en vitaminas, minerales, polifenoles y antocianinas) y luego fermentaron el jugo con *L. plantarum* MCC 2974. En este estudio se encontró que, durante la fermentación, el número de microorganismos probióticos viables alcanzó valores de hasta 10 log UFC/ml y, además, que el

contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas y la capacidad de captación de radicales DPPH aumentó al emplear como pretratamiento el ultrasonido. Así pues, la bebida desarrollada por estos investigadores mantuvo una población probiótica superior a 6 log UFC/ml, incluso después de cuatro semanas de almacenamiento a 4°C. De estos estudios se concluye que el tratamiento con ultrasonido mejora la fermentación a pesar de notarse una acidificación y una pequeña disminución en el número de células viables de microorganismos probióticos, pues se alcanza la cantidad recomendada para proporcionar beneficios a la salud ( $>6 \log \text{ UFCml}^{-1}$ ) al final de su almacenamiento. Adicionalmente, estas bebidas conservan su color característico, presentan una buena aceptación por parte de los consumidores y conservan un alto contenido de compuestos bioactivos.

Seyed Ahmadi et al. (2020) desarrollaron una bebida simbiótica de zanahoria con 2% de inulina como compuesto prebiótico y *L. casei* y *L. plantarum* como cultivos probióticos comparando un tratamiento térmico (90° C por 4 min) con un tratamiento con ultrasonido (37 kHz por 10 min a 60°C) como métodos de conservación. Se observó que al final de 45 días el conteo de bacterias probióticas fue mayor en la bebida tratada con ultrasonido que en la tratada con pasteurización (12,89 log UFC/ml vs 10,86 log UFC/mL). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas evaluadas presentaron comportamientos similares con pequeñas diferencias significativas estadísticamente; en este sentido, en ambos tratamientos se observó una ligera disminución del pH y los sólidos solubles durante el tiempo de almacenamiento, así como un aumento en la acidez titulable y una disminución de la viscosidad en su almacenamiento. De esta forma y considerando los efectos de degradación provocados por el tratamiento térmico, la bebida simbiótica de zanahoria desarrollada en este estudio empleando ultrasonido con una mejor supervivencia de los microorganismos probióticos, propiedades fisicoquímicas aceptables y un puntaje alto en sus propiedades organolépticas es sugerida como un producto funcional.

## 1.4. Conclusiones

Los estudios realizados para el entendimiento de los efectos de las antocianinas en la microbiota intestinal aún son escasos y, debido a las diversas técnicas empleadas en el estudio de la microbiota, las diferentes fuentes de antocianinas, los posibles efectos sinérgicos entre los componentes de las matrices alimenticias y el diseño del estudio, es difícil comparar estos estudios para llegar a una conclusión certera frente a este aspecto; sin embargo, es de común acuerdo que los compuestos fenólicos, en especial las antocianinas, tienen la habilidad de modular la microbiota intestinal, especialmente en la estimulación del crecimiento de las especies *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* y la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos como *C. histolyticum*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Adicionalmente, la metabolización de las antocianinas por parte de la microbiota intestinal mejora su biodisponibilidad y los metabolitos generados pueden llegar a mejorar los beneficios a la salud proporcionados por las antocianinas como un aumento en su efecto antioxidante y antimicrobiano, por lo que pueden llegar a intervenir aún más en la prevención de enfermedades y desordenes crónicos.

Por otro lado, existe evidencia suficiente sobre la factibilidad de desarrollar bebidas de frutas ricas en antocianinas con la inclusión de microorganismos probióticos en las dosis recomendadas que se espera brinden beneficios para la salud del consumidor. Las limitaciones más significativas para desarrollar este tipo de bebidas son la alta acidez de las frutas ricas en antocianinas y su alto contenido en compuestos fenólicos. Sin embargo, estas limitaciones pueden superarse con una selección adecuada de la cepa probiótica y el uso de estrategias posteriores para mejorar su adaptación al medio. La modulación del pH mediante la adición de frutas menos ácidas a las bebidas podría ser otro enfoque prometedor. La promoción de procesos fermentativos mediados por los cultivos probióticos, en periodos de alrededor de 24 horas, ha demostrado aumentar su viabilidad en las bebidas, al mismo tiempo que mejora la seguridad y el perfil sensorial, y potencialmente aumenta la capacidad antioxidante del producto final. Por su parte, la inoculación de probióticos sin inducción a la fermentación permite obtener un producto con cambios más leves en cuanto a atributos de calidad fisicoquímicos y sensoriales.

En cuanto a la capacidad del ultrasonido de eliminar microorganismos patógenos, se observa que se logra una mayor reducción de carga microbiana empleando equipos de ultrasonido con sonda en lugar de baños ultrasónicos y que amplitudes, potencias o intensidades mayores, así como mayores tiempos y temperaturas de exposición, son más eficientes en la destrucción de microorganismos, pero pueden provocar mayores cambios fisicoquímicos y sensoriales, así como una mayor pérdida de compuestos bioactivos. También, se ha observado una menor reducción de levaduras y moho bajo tratamiento ultrasónico en comparación con bacterias aerobias, lo que sugiere una mayor resistencia de levaduras y mohos a la sonicación. Con esto, la sonicación es efectiva para reducir la carga microbiana en bebidas, pero no es suficiente para obtener una inactivación completa del crecimiento microbiano por sí solo, por lo que es recomendable combinarlo con un tratamiento térmico medio, de aproximadamente 60°C por 15 min. Finalmente, el uso de tratamientos con ultrasonido antes de la inoculación de probióticos en bebidas de frutas, como una operación alternativa a tratamientos térmicos convencionales, es un campo floreciente de investigación que podría garantizar la calidad microbiológica sin afectar significativamente las propiedades fisicoquímicas del producto final, además de mejorar el proceso fermentativo de los cultivos probióticos.

# **Capítulo 2. Desarrollo de una bebida con antocianinas e inclusión de prebióticos y probióticos**

## **2.1. Introducción**

El término alimento funcional se refiere a cualquier tipo de alimento que demuestre tener un efecto benéfico sobre la salud y el bienestar humano, más allá de contribuir a los requerimientos nutricionales diarios de un individuo (Ashaolu, 2020). El creciente interés de los consumidores por la salud y el bienestar propio, favorecido como consecuencia de la reciente pandemia por Covid-19, ha impulsado el mercado de alimentos y bebidas funcionales, con un crecimiento esperado desde \$21,4 mil millones en 2022 a \$324,4 mil millones para 2027 con una tasa de crecimiento anual de 8,4% para el periodo de 2022-2027 (BCC Research, 2022).

Algunas bebidas de frutas pueden considerarse como funcionales debido, principalmente, a que contienen compuestos antioxidantes como carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides que, además de incrementar la vida útil del producto final, satisfacen la demanda en el mercado de productos capaces de promover el bienestar humano y prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas (Ramírez-Sucre et al., 2019). De estos compuestos bioactivos, las antocianinas han sido ampliamente estudiadas por su habilidad de prevenir enfermedades asociadas al estrés oxidativo como lo son las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias (Tian et al., 2019).

Otro tipo de alimentos y bebidas funcionales que han tomado impulso en el mercado son los probióticos, los prebióticos y, su uso en conjunto, los simbióticos. Los beneficios a la salud aportados por estos productos son el manejo y la prevención de enfermedades y/o condiciones como la diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal, intolerancia a la lactosa, alergias, cáncer, infecciones en el tracto respiratorio, constipación, infecciones en el tracto urinario y colesterol alto en sangre, además de modular la salud intestinal y el sistema inmune (Min et al., 2019).

Los productos simbióticos pueden ser de dos tipos: 1) complementarios los cuales son una mezcla de probióticos y prebióticos que actúan sobre los microorganismos autóctonos del huésped sin necesariamente interactuar entre ellos; y 2) sinérgicos en los que el sustrato prebiótico es selectivamente utilizado por el microorganismo probiótico coadministrado (Swanson et al., 2020). Así, los simbióticos sinérgicos representan una ventaja a la hora de desarrollar productos con

inclusión de probióticos pues su adición simultánea con prebióticos puede mejorar su viabilidad durante la fermentación y el almacenamiento de este tipo de productos, garantizando la dosis mínima recomendada de probióticos para conferir beneficios a la salud (6 log UFC/mL) (Min et al., 2019; Ospina-Corral et al., 2019).

Por otro lado, este tipo de bebidas debe ser sometida a procesos de conservación para evitar el deterioro, la pérdida de calidad y valor nutricional del producto, permitiendo un almacenamiento prolongado (Bhadekar & Bhola, 2019). Los tratamientos térmicos tradicionales como la pasteurización y la esterilización son los más empleados en la conservación de bebidas funcionales debido a su capacidad de eliminar microorganismos e inactivar enzimas (Morales-de la Peña et al., 2016). Sin embargo, las altas temperaturas alcanzadas en estos tratamientos tradicionales pueden generar cambios químicos y físicos que afectan las propiedades sensoriales, nutricionales y bioactivas del producto final (Morales-de la Peña et al., 2016). En consecuencia, las desventajas presentadas por los tratamientos térmicos han impulsado la búsqueda de nuevos tratamientos y tecnologías de conservación que permitan obtener productos de calidad, con características frescas y sin pérdidas del contenido nutricional y bioactivo.

El ultrasonido se ha evaluado ampliamente como método de inactivación microbiana en matrices líquidas como solución salina (Wordon et al., 2012), leches (D'Amico et al., 2006), jugo de guayaba (Cheng et al., 2007), jugo de naranja (Valero et al., 2007), jugo de tomate (Wu et al., 2008) y diversos jugos y néctares (Režek Jambrak et al., 2018). El ultrasonido se refiere a la aplicación de ondas sonoras por debajo del rango de frecuencia auditiva (>20 kHz) que cuando se transmite a través de un medio líquido produce cavitación acústica (Ojha et al., 2017). Al regular la intensidad, el tiempo del tratamiento, el ciclo del pulso, la temperatura y la presión el fenómeno de cavitación puede llegar a inactivar microorganismos sin afectar en mayor medida los atributos de calidad y funcionalidad del producto final (Morales-de la Peña et al., 2016).

El objetivo de esta parte del trabajo fue determinar las condiciones de bioproceso para la obtención de una bebida de frutas con potencial simbiótico con inclusión de probióticos, antocianinas y fibra prebiótica, con la cual se pueda obtener la dosis mínima recomendada de probióticos en la bebida final. Como estrategias para lograr una bebida con presencia de antocianinas y mejorar la potencial viabilidad de los cultivos probióticos se exploraron: el uso de frutos rojos disponibles en el mercado nacional en combinación con una fruta de menor acidez, la selección de una combinación de prebiótico y probiótico a partir de un estudio de su interacción (índice prebiótico y actividad prebiótica) de varias fibras prebióticas con dos cepas de microorganismos probióticos comerciales y la adaptación de la cepa probiótica en la bebida formulada usando un medio estándar de cultivo con la adición de un porcentaje de bebida formulada. En la selección de la fibra prebiótica se tuvo también en cuenta el efecto de su concentración en propiedades fisicoquímicas en la bebida y en el crecimiento del cultivo probiótico. Adicionalmente, se evaluaron tratamientos de conservación convencionales y alternativos en la producción de la bebida de frutas con adición de fibra con potencial prebiótico, previo a la inoculación de microorganismos probióticos, para seleccionar un tratamiento que permitiese obtener una apropiada calidad microbiológica y una menor pérdida de antocianinas en el producto final.

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Materiales y reactivos

#### Material vegetal

Para la formulación de la bebida base se seleccionaron frutos de mora (*Rubus glaucus*) y fresa (*Fragaria* sp.), especies frutícolas cultivadas comercialmente en Colombia, por su alto contenido en antocianinas y su perfil sensorial adecuado para la fabricación de bebidas de frutas, y adicionalmente se incluyó sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), mango (*Mangifera indica*), guayaba (*Psidium guajava*) y banano (*Musa* sp.) como frutas de menor acidez, como estrategia para aumentar el pH del sustrato y mejorar la potencial viabilidad de microorganismos probióticos. Se adquirieron los frutos, sin signos de deterioro mecánico o microbiológico, en estado de madurez comercial, directamente de proveedores en un mercado local de la ciudad de Bogotá.

#### Químicos y reactivos

El hidróxido de sodio y el ácido fórmico grado analítico fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España). El acetonitrilo y metanol grado HPLC y el estándar de ciadinin-3-O-glucósido fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Para la separación cromatográfica se empleó agua destilada purificada usando un equipo de intercambio iónico y microfiltración Milli-Q (Millipore, Molsheim, France). La goma xanthan, usada como estabilizante, fue adquirida de Cimpa (Bogotá, Colombia). Los reactivos analíticos y aditivos fueron empleados sin protocolos de purificación adicionales.

#### Prebióticos

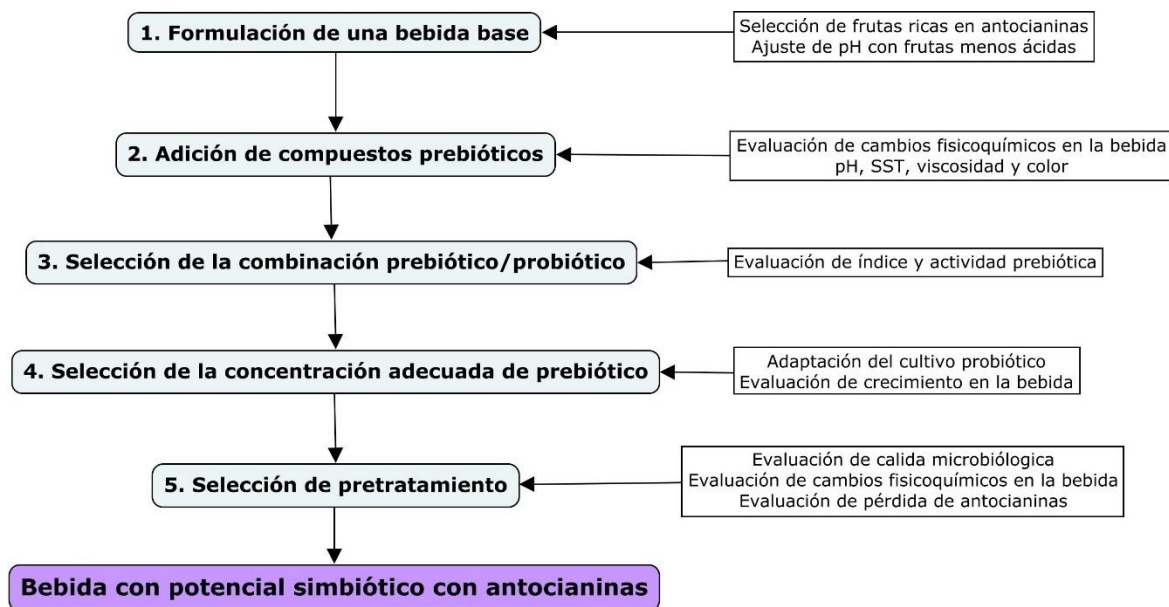
Se evaluaron tres fibras prebióticas comerciales, a saber, Orafti® GR ( $\geq 90$  g/100g de inulina), Orafti® ST-Gel ( $\geq 90$  g/100g de inulina de achicoria) y Orafti® P95 ( $\geq 93,2$  g/100g de fructooligosacáridos (FOS)) (BENEIO, Mannheim, Germany), ver anexo 3. Adicionalmente, se evaluó un ingrediente con presencia de fibra con potencial prebiótico la cual fue una harina de avena adquirida en un mercado local.

#### Microorganismos probióticos

Se evaluaron dos cultivos con potencial probiótico de la línea comercial DANISCO-HOWARU®: *Rhamnosus* (*Lactobacillus rhamnosus*) y el conglomerado VEGE 092 (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*), ver anexo 2. Los cultivos probióticos se obtuvieron de la colección del laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA).

Para la obtención de una bebida de frutas con potencial simbiótico con inclusión de probióticos, antocianinas y fibra prebiótica se siguieron 5 pasos como se muestra en la Figura 2-1:

**Figura 2-1:** Pasos para el desarrollo de la bebida con potencial simbiótico con antocianinas.



### 2.2.2. Formulación de una bebida base

Se realizaron mezclas de frutas con un contenido de pulpa total entre 30 y 40% empleando pulpa de mora, fresa y una fruta de menor acidez como sandía, melón, banano, mango o guayaba buscando una bebida con un valor de pH entre 3,7 y 4,0. Para obtener las mezclas se pesaron las pulpas, se completó en peso con agua potable y se homogenizó con licuadora.

Para la obtención de pulpa de mora y fresa, se lavaron los frutos con agua potable y se eliminaron las hojas de manera manual. En una marmita, se escaldaron las moras o las fresas con 10% p/p de agua a 85°C por 3 min. Se hizo un choque térmico y se pasaron por una despulpadora. Para la obtención de la pulpa de banano, se lavaron con agua potable los bananos, se dejaron secar ayudando con toallas de papel y se dejaron en congelación durante la noche. Al día siguiente, se removió la cáscara de los bananos congelados con un cuchillo y se obtuvo la pulpa en un procesador de alimentos. Para las pulpas de sandía, melón, mango y guayaba, se lavaron los frutos con agua potable, se removió la cascara y las semillas y se obtuvieron las pulpas en un procesador de alimentos. Las pulpas obtenidas se almacenaron en bolsas herméticas resellables (Ziploc) a  $-15 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.2.3. Adición de prebióticos y evaluación de cambios fisicoquímicos en la bebida

Para evaluar los cambios fisicoquímicos generados por la adición de cada uno de los compuestos prebióticos se trabajaron 5 niveles de concentración, a saber: 0 g/L (control), 2,5 g/L, 5 g/L, 10 g/L



y 15 g/L. De esta forma se tomaron 200 mL de bebida base, se adicionó la cantidad correspondiente de compuesto prebiótico y se homogenizó en licuadora.

A cada una de las bebidas prebióticas y bebidas control se les determinó, por duplicado, el pH usando un potenciómetro Mettler Toledo SevenCompact, los sólidos solubles totales (S.S.T) usando un refractómetro, el cambio de color ( $\Delta E$ ) empleando un colorímetro Minolta CR-400 y la viscosidad usando un HAAKE Viscotester 550. La viscosidad aparente se reporta como la pendiente de la gráfica del esfuerzo vs el gradiente de velocidad usando un sensor de viscosidad media (MV) y un gradiente de velocidad de 0 a 1000 1/s en 10 min a 20°C. Los valores de las variables fisicoquímicas (pH, viscosidad, S.S.T) se expresan como cambios relativos al control (bebida con 0 g/L de compuesto prebiótico) según la Ecuación 2-1.

$$\text{Cambio relativo} = \frac{\text{Valor del parámetro en muestra con prebiótico}}{\text{Valor del parámetro en muestra control}} \quad \text{Ecuación 2-1}$$

#### 2.2.4. Selección de la mejor combinación de probiótico y prebiótico

Con el fin de seleccionar el prebiótico adecuado para el crecimiento de los cultivos probióticos, se determinó el índice y la actividad prebióticos *in vitro* de los cuatro ingredientes con potencial prebiótico en estudio de acuerdo con la metodología propuesta por Figueroa-González et al. (2019). Se evaluó el crecimiento de los probióticos en un medio de cultivo constituido por 10 g/L de lactosa (Sharlau®), como control, o uno de los cuatro ingredientes con potencial prebiótico en estudio, 3g/L de extracto de levadura (Oxoid®) y 5 g/L de peptona de caseína (Oxoid®). Se inoculó el 2% de la cepas probiótica, previamente activada en caldo MRS, en los distintos medios y se incubó por 24 horas a 37°C. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) a través de recuentos en placa por profundidad en agar MRS (Oxoid®) a la hora 0 y a las 24 horas por duplicado incubando las placas por 48 horas en condiciones de microaerobiosis a 37°C. Para determinar el índice prebiótico se empleó la Ecuación 2-2.

$$\text{Índice prebiótico} = \frac{(\text{Log}P_{24})_{\text{Prebiótico}}}{(\text{Log}P_{24})_{\text{Lactosa}}} \quad \text{Ecuación 2-2}$$

Para determinar la actividad prebiótica se siguió el mismo procedimiento que en el índice prebiótico, pero con un co-cultivo con *E. coli* ATCC 25992, es decir, se inoculó el 2% de la cepa probiótica junto con 2% de *E. coli*. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en placa por siembra en profundidad en agar MRS (Oxoid®) para los probióticos y en agar MacConkey (Oxoid®) para *E. coli*. a la hora 0 y a las 24 horas de incubación a 37°C por duplicado.

#### 2.2.5. Adaptación del probiótico y selección de la concentración de prebiótico óptima en la bebida

Como estrategia para mejorar la viabilidad del cultivo probiótico en la bebida, se realizó su adaptación en un medio constituido de caldo MRS (Oxoid®) y la bebida base y se incubó a 37°C durante la noche. Para seleccionar la concentración del compuesto prebiótico elegido que mejor estimule el crecimiento del cultivo probiótico en la bebida se realizó la inoculación del 1-2% del

inóculo obtenido del medio de adaptación en 200 mL de la bebida base con 0 g/L, 5 g/L, 10 g/L y 15 g/L del compuesto prebiótico seleccionado. Cada bebida se esterilizó a 120°C, 15 psi por 15 min antes de ser inoculada con el fin de evitar interferencia de otra población microbiana presente en la matriz vegetal. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en placa por siembra en profundidad, por duplicado, en agar MRS (Oxoid®) a la hora 0 y a las 24 horas de incubación a 37°C.

## 2.2.6. Selección del pretratamiento de conservación de la bebida con potencial simbiótico

Con el fin de seleccionar el pretratamiento de conservación que afecta en menor proporción el contenido y perfil de antocianinas de la bebida y que permite cumplir con los lineamientos de la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social sobre calidad microbiológica de refresco de frutas, se evaluaron dos tratamientos convencionales (pasteurización y esterilización) y uno alternativo (ultrasonido). Se preparó un lote de bebida de acuerdo con la formulación seleccionada, con la inclusión de la fibra prebiótica, y la bebida se separó, garantizando la mayor homogeneidad posible, en 6 sub-lotes de 700 mL para evaluar los siguientes tratamientos (Tabla 2-1):

**Tabla 2-1:** Tratamientos de conservación evaluados

Tratamiento	Descripción
US60	Ultrasonido a 60% amplitud x 15 min, <40°C
US80	Ultrasonido a 80% amplitud x 15 min, <40°C
US100	Ultrasonido a 100% amplitud x 15 min, <40°C
Pasteurización	85°C x 5 min
Esterilización	120°C, 15 psi x 15 min
Control	Bebida sin tratamiento

Como control positivo se usó un sub-lote de bebida tratado con un tratamiento convencional de pasteurización a 85°C por 5 minutos y otro tratado por esterilización a 120°C y 15 psi por 15 minutos. Como control negativo se usó un sub-lote de bebida sin ningún tipo de tratamiento.

Otros tres sub-lotes se trataron por medio de ultrasonido en bache (empleando el equipo Ultrasonic Liquid Processor de la marca Fisher Scientific, modelo 705 Sonic Dismembrator) a frecuencia constante de 20 kHz y amplitudes variables de 60%, 80% y 100% (35 µm) durante 15 min a una temperatura inferior a 40°C, empleando una sonda de 25 mm que fue sumergida 40 mm en cada sub-lote a tratar. La sonda se limpió con etanol al 70% luego de cada tratamiento para evitar una posible contaminación.

Una parte de las bebidas tratadas se almacenó en refrigeración en botellas previamente esterilizadas por máximo 24 horas para su análisis fisicoquímico y perfil de antocianinas. La otra parte de las bebidas se almacenó en refrigeración en botellas previamente esterilizadas por máximo 24 h para ser inoculada con 1-2% del cultivo probiótico, previamente adaptado, en 200 mL de volumen efectivo de bebida, para ser incubadas por 24 horas a 37°C y almacenadas nuevamente en refrigeración

durante 7 días para su análisis de calidad microbiológica. El tratamiento control no se inoculó con cultivo probiótico, pero se mantuvo en las mismas condiciones de las demás bebidas, que incluyen la incubación y posterior refrigeración.

### **Comparación del efecto de los tratamientos de conservación sobre la inocuidad microbiológica de la bebida formulada.**

Se realizaron los siguientes ensayos microbiológicos, según la resolución 3929 del 2013 (refrescos) y NTC 3549, a cada uno de los 5 sub-lotes de bebidas tratadas y fermentadas y al sub-lote sin tratamiento ni fermentación, pero almacenada en las mismas condiciones como control:

- Coliformes totales según el método NMP INVIMA N. 13. Se prepararon las diluciones adecuadas de la bebida en tubos con solución salina estéril y se pipetearon 1 mL de cada una de las diluciones en tubos con caldo lactosado bilis verde brillante (Oxoid®) al 2%, utilizando tres tubos por cada dilución, se agitaron los tubos y se incubaron a 37°C por 48 horas. Luego de 48 h se anotaron los tubos que mostraron producción de gas y se hizo una prueba de confirmación. Con la prueba de confirmación se determinó si los organismos identificados pertenecían al grupo de coliformes. Así, se realizó un sembrado por estría de cada uno de los tubos con producción de gas en la superficie de una placa de agar eosina azul de metileno (EMB) (Oxoid®) y se incubó a 35-37°C por 24 horas. Pasado este tiempo se hizo la lectura de las colonias típicas de coliformes y se anotó el número de tubos confirmados como positivos para organismos coliformes en cada dilución y se obtuvo el NMP.
- Coliformes fecales según el método NMP INVIMA N. 14, empleando la prueba de MacKenzie. A partir de los tubos positivos con la producción de gas de la prueba presuntiva del NMP de coliformes se transfirieron de cada tubo una asada de cultivo en: a) caldo lactosado bilis verde brillante al 2% contenido en un tubo de fermentación de Durham y b) caldo triptófano. Se mezclaron suavemente los tubos y se incubaron a 44,5°C por 48 h. Se buscó la producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante (Oxoid®) al 2% y la presencia de un anillo rojo cereza en la superficie de los tubos de caldo triptófano al adicionar 0,2 mL del reactivo de Kovac indicando la presencia de indol. Se consideraron como coliformes de origen fecal los que demostraron positividad en ambas pruebas: gas e indol positivos. Los resultados se expresaron como NMP de coliformes fecales/mL.
- Recuento de mohos y levaduras según el método de recuento en placa INVIMA N. 7. Se prepararon las diluciones adecuadas de la bebida en tubos con solución salina estéril y se adicionó 1 mL de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de Petri y se adicionaron 15 mL de agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura (OGY) (Oxoid®) y se incubó a 22°C por 5-7 días. Luego de este tiempo se hizo el conteo en placa y se reportaron las unidades formadoras de colonias/mL de bebidas (UFC/mL) teniendo en cuenta las diluciones evaluadas.

### **Cambios fisicoquímicos en la bebida por los tratamientos de conservación**

A cada una de las bebidas tratadas se les determinó, por triplicado, el pH, los S.S.T, el cambio de color ( $\Delta E$ ) y la viscosidad como se indicó en la sección 2.2.3.

### **Comparación del efecto de los tratamientos de conservación sobre el contenido y perfil de antocianinas de la bebida formulada**

3-5 g de cada una de las bebidas se extrajo con 3 mL de metanol con 1% de ácido fórmico durante 15 min en un baño de ultrasonido, centrifugando por 20 min a 1000 rpm (6000xg) tres veces recuperando y combinando los sobrenadantes cada vez y llevando a 10 mL con el mismo solvente de extracción. Las antocianinas de dichos extractos se analizaron por métodos cromatográficos.

Se empleó un cromatógrafo HPLC Jasco con detector UV/Vis y una columna C12 RP con dimensiones estándar (Synergi Max-RP 250 x 4,6 mm y 4  $\mu$ m), empleando dos solventes como sistema de fase móvil: Fase A, Acetonitrilo - Ácido fórmico - Agua 3:10:87, y Fase B, Acetonitrilo - Ácido fórmico - Agua 40:10:50. Se empleó un gradiente lineal de fases móviles empezando con 94% de A hasta 80% de A en 10 minutos, luego a 40% de A en 30 min y por ultimo a 94% de A en 5 min usando un flujo de 0,8 mL/min a 30°C. Previo a la inyección, todas las muestras se filtraron a través de un filtro de jeringa PTFE con el propósito de remover las partículas en la bebida que puedan afectar la columna cromatográfica. Se realizaron inyecciones de 20  $\mu$ L por duplicado y se usó una longitud de onda de 510 nm para detectar las antocianinas. Se cuantificaron las antocianinas como mg de equivalentes de cianidin-3-O-glucósido por 100g de bebida (mg C3G/100g) comparando cada pico de cada uno de los cromatogramas con una curva de calibración de estándar externo de cianidin-3-O-glucósido en un rango de 0,1 mgC3G/kg a 10 mgC3G/kg ( $r^2=0,9988$ ) y sumando el resultado de cada extracto.

Para la identificación de las antocianinas, se liofilizó una porción de las bebidas tratadas y se enviaron al Departamento de Alimentos, Nutrición y Ciencias Ambientales de la Universidad de Milán. Quienes emplearon un UHPLC modelo Vanquish (Thermo Scientific) equipado con un detector de arreglo de diodos (Thermo) y un espectrómetro de masas por transformada de Fourier de alta resolución Orbitrap modelo Exactive (Thermo Scientific, Rodano, I), con una sonda HESI-II para el ESI y la celda de colisión (HCD). Las condiciones de operación fueron las siguientes: spray voltage +4.0 kV, velocidad de flujo de gas envolvente de 45 (unidades arbitrarias), velocidad de flujo de gas auxiliar de 10 (unidades arbitrarias), temperatura del capilar de 275 °C, voltaje del capilar de +60 V, del lente del tubo de +100 V, del skimmer de +26 V, y una temperatura en el calentador de 130 °C. La adquisición de datos se hizo en modo full-scan en el rango (m/z)<sup>+</sup> de 100–1000 u. El procesamiento de datos del MS se hizo empleando el software Xcalibur (Thermo Scientific), identificando los picos mediante la masa y los fragmentos obtenidos en la celda de colisión. La separación se realizó empleando una columna Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 2,6  $\mu$ m, Phenomenex) a 45 °C y a flujo de 1,2 mL/min. Como eluyentes se usó (A) 0.1% TFA y (B) 0.1% TFA en CH<sub>3</sub>CN, usando un gradiente lineal de 0–45 min de 5 a 20% B.

### 2.2.7. Análisis estadístico

Como análisis estadístico se hizo un análisis de varianza y prueba de Tukey con el 95% de confianza en el software libre R para determinar diferencias significativas en las propiedades fisicoquímicas y el contenido de antocianinas de las bebidas.

Como análisis estadístico del índice prebiótico, al no cumplir con la homocedasticidad, se hizo una prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre los diferentes compuestos prebióticos por cada cultivo probiótico con un 95% de confianza en el software libre R.

Para determinar el crecimiento de los microorganismos, se evaluaron las diferencias significativas entre la hora 0 y 24 de incubación con una prueba T-Student con un nivel de confianza del 95%, en el software libre R.

## 2.3. Resultados y discusiones

### 2.3.1. Formulación de la bebida base

Puesto que especies del género *Lactobacillus* y *Pediococcus*, como los probióticos en estudio, generalmente sobreviven en medios de cultivo con pH entre 3,7 y 4,3 (Perricone et al., 2015; Raccach, 2014), se buscó formular una bebida base con un pH en dicho rango. En la Tabla 2-2 se muestran diferentes formulaciones preliminares de bebidas de mora, fresa y una fruta de menor acidez para comparar el efecto de la inclusión y la proporción de estas frutas de menor acidez sobre el pH de la bebida.

**Tabla 2-2:** Formulaciones preliminares para obtener una bebida base.

Fórmula	Fruta	Porcentaje	pH
F1	Mora	10%	3,36 ± 0,02
	Fresa	10%	
	Sandía	10%	
F2	Mora	10%	3,47 ± 0,03
	Fresa	10%	
	Sandía	20%	
F3	Mora	11%	3,19 ± 0,02
	Fresa	9%	
	Melón	10%	
F4	Mora	10%	3,54 ± 0,03
	Fresa	10%	
	Melón	20%	
F5	Mora	10%	3,35 ± 0,01
	Fresa	10%	
	Guayaba	10%	

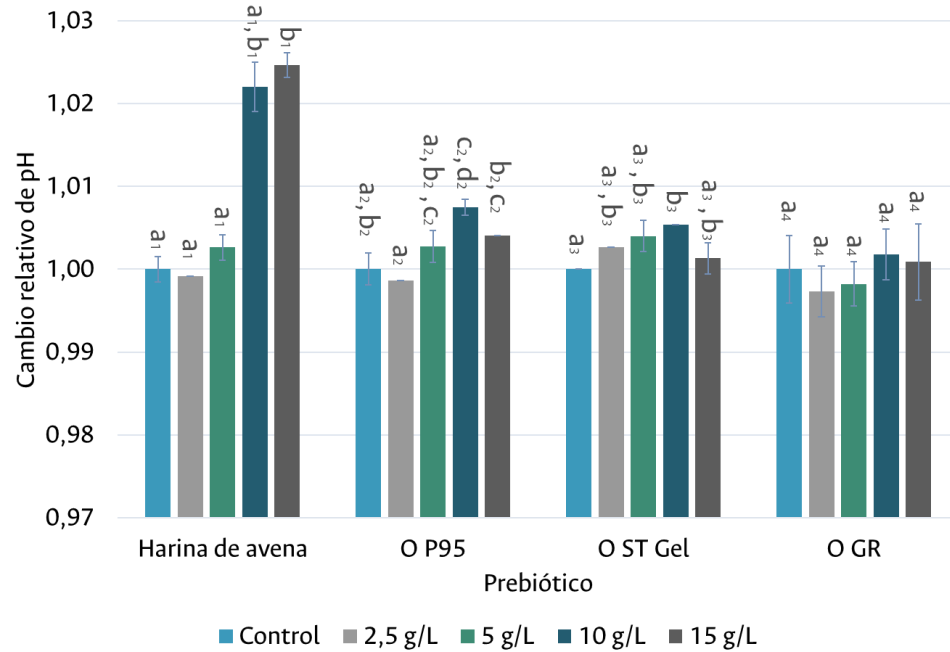
Fórmula	Fruta	Porcentaje	pH
F6	Mora	10%	3,48 ± 0,03
	Fresa	10%	
	Guayaba	20%	
F7	Mora	10%	3,30 ± 0,04
	Fresa	10%	
	Mango	10%	
F8	Mora	10%	3,46 ± 0,01
	Fresa	10%	
	Mango	20%	
F9	Mora	10%	3,44 ± 0,01
	Fresa	10%	
	Banano	10%	
F10	Mora	10%	3,74 ± 0,01
	Fresa	10%	
	Banano	20%	

Se encontró que, de las frutas de menor acidez usadas, el banano fue la fruta que más aumentaba el pH de la bebida (F10). Con el fin de aumentar más el pH se decidió disminuir el porcentaje de mora y fresa, pero conservando la relación másica de la suma de estas dos frutas con el banano, es decir 1:1, por lo que se definió la composición de la bebida base como 7% de pulpa de mora, 8% de pulpa de fresa y 15% de pulpa de banano con lo que se obtuvo un pH de  $3,92 \pm 0,01$ . Se adicionó un 0,05% de goma xanthan para darle estabilidad a la bebida y evitar la precipitación de los sólidos en suspensión.

### 2.3.2. Adición de prebióticos y evaluación de cambios fisicoquímicos en la bebida

Una vez establecida la composición de la bebida base se evaluó el impacto que tiene la adición de compuestos prebióticos y la cantidad adicionada sobre las propiedades fisicoquímicas de la bebida, buscando un cambio mínimo para no afectar la aceptabilidad del producto final. Así, se realizaron ensayos en los cuales se incluyeron las fibras en proporciones de 0 g/L a 15 g/L, cuantificando el pH, los S.S.T. y la viscosidad como el valor de cada parámetro fisicoquímico después de la adición de la fibra sobre el valor de dicho parámetro en la bebida base (antes de la adición de la fibra). En la Gráfica 2-1 se presenta el cambio del pH relativo al pH de la bebida base (pH después de adición/pH antes de adición). Se observó un ligero aumento del pH respecto al control al adicionar harina de avena, aunque estadísticamente las diferencias no fueron significativas, salvo cuando se adicionó una concentración de 15g/L de harina de avena (de  $3,78 \pm 0,01$  a  $3,88 \pm 0,01$ ). Para los demás prebióticos, el pH de la bebida fue prácticamente constante al aumentar la concentración de compuesto prebiótico en la bebida, con valores entre 3,74 y 3,76.

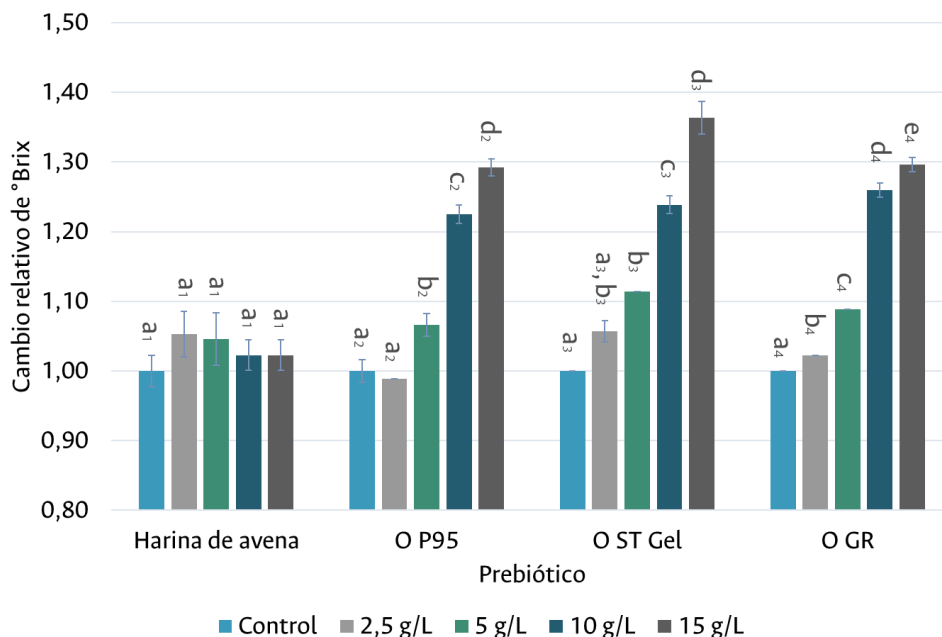
**Gráfica 2-1:** Cambio de pH relativo al pH de la bebida control al adicionar las fibras prebióticas en diferentes concentraciones.



Letras diferentes representan diferencia significativa entre las concentraciones de prebiótico. Se realizaron comparaciones entre concentraciones de cada fibra, indicadas por los subíndices en las letras.

Por su parte, los sólidos solubles totales de la bebida aumentaron al aumentar la concentración del compuesto prebiótico en el caso de los prebióticos comerciales Orafit P95, Orafit ST Gel y Orafit GR, con diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 2-2), presentando valores entre  $4,4 \pm 0,1$  y  $6,0 \pm 0,1$  °Brix. En el caso de la harina de avena no se observaron diferencias significativas en los sólidos solubles totales en la bebida, debido posiblemente a la gran diversidad de compuestos presentes en la harina de avena con diversa solubilidad en agua como lo son minerales, vitaminas, aceites, proteínas, carbohidratos simples, almidones y fibra dietaria (Liu, 2014). Una mayor cantidad de sólidos solubles totales proporcionado por los prebióticos comerciales es favorable para el crecimiento de microorganismos probióticos pues representa una fuente de alimento de fácil acceso o una mayor disposición de carbohidratos como fuente de carbono para estos microorganismos, lo que ayuda a mejorar las condiciones de la matriz como sustrato para los cultivos probióticos a usar más adelante.

**Gráfica 2-2:** Cambio de S.S.T. relativo a la bebida control al adicionar las fibras prebióticas en diferentes concentraciones.

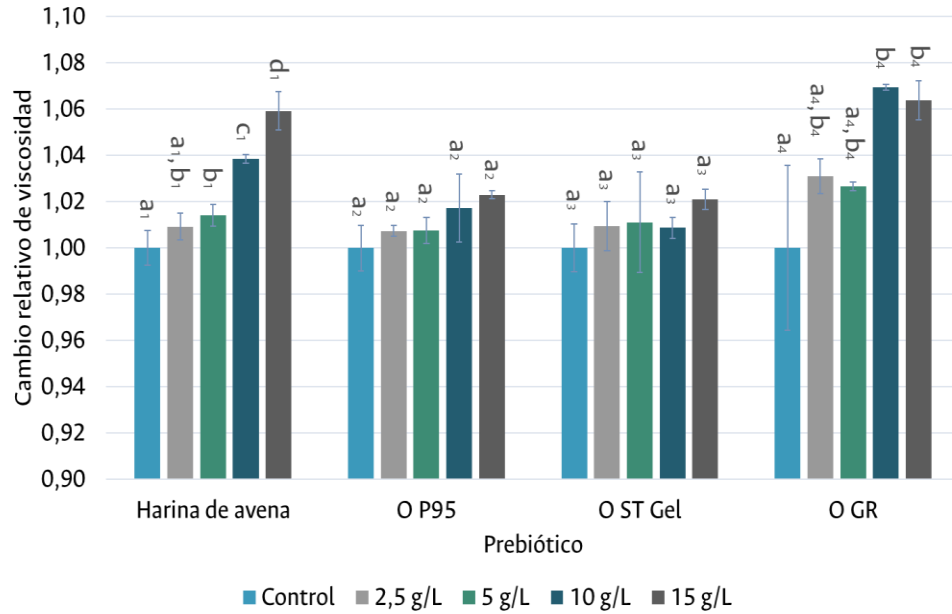


Letras diferentes representan diferencia significativa entre las concentraciones de prebiótico. Se realizaron comparaciones entre concentraciones de cada fibra, indicadas por los subíndices en las letras.

En cuanto al cambio en la viscosidad, al adicionar diferentes cantidades de compuestos prebióticos a la bebida (Gráfica 2-3), se observó que para el caso de los prebióticos comerciales Orafiti® P95 y Orafiti® ST Gel la viscosidad fue relativamente invariable sin presentar diferencias significativas con el aumento de concentración de prebiótico en la bebida, conservando un valor de viscosidad de  $0,0143 \pm 0,0002$  Pa·s. Por su parte, el Orafiti® GR sí indujo cambios relativamente abruptos en la viscosidad de la bebida. Este resultado puede deberse a la presentación de este prebiótico, el cual viene granulado, lo que pudo causar que la bebida preparada no quedara homogénea. Finalmente, para la harina de avena se observó un aumento de la viscosidad de la bebida al aumentar la concentración de ésta en la bebida con diferencias significativas (de  $0,0141 \pm 0,0001$  Pa·s para el control y  $0,0150 \pm 0,0001$  Pa·s para la bebida con 15 g/L de harina de avena), debiéndose posiblemente al alto contenido de almidones en la harina de avena, entre 40 y 80% (Herrera et al., 2016).



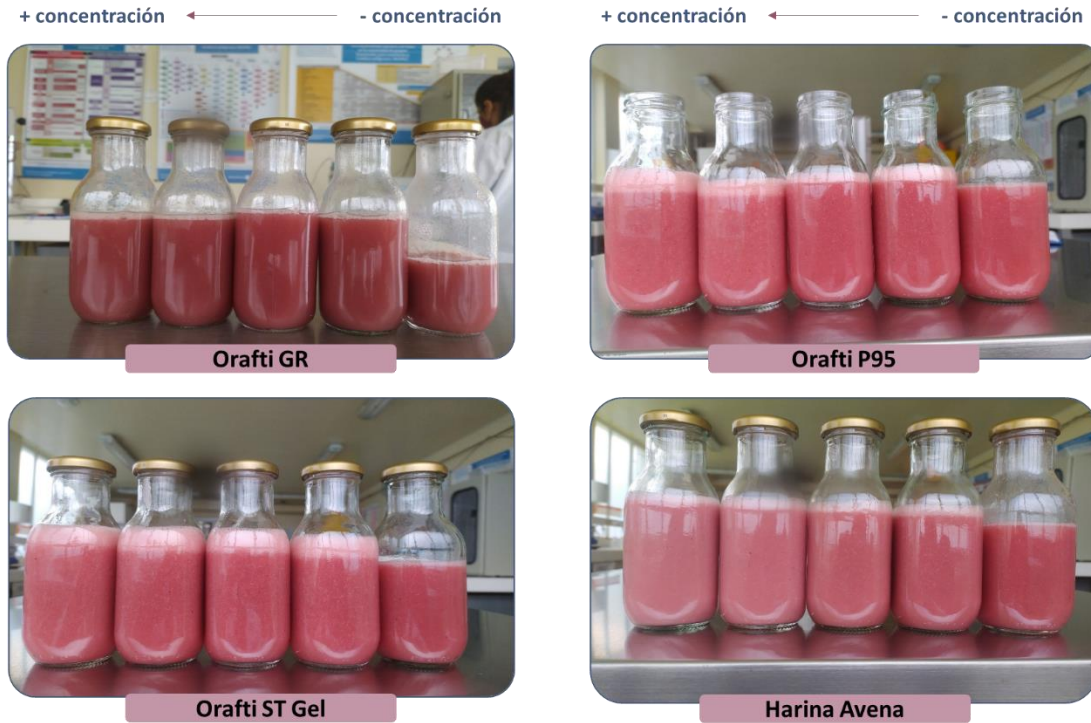
**Gráfica 2-3:** Cambio de viscosidad relativo a la bebida control al adicionar las fibras prebióticas en diferentes concentraciones.



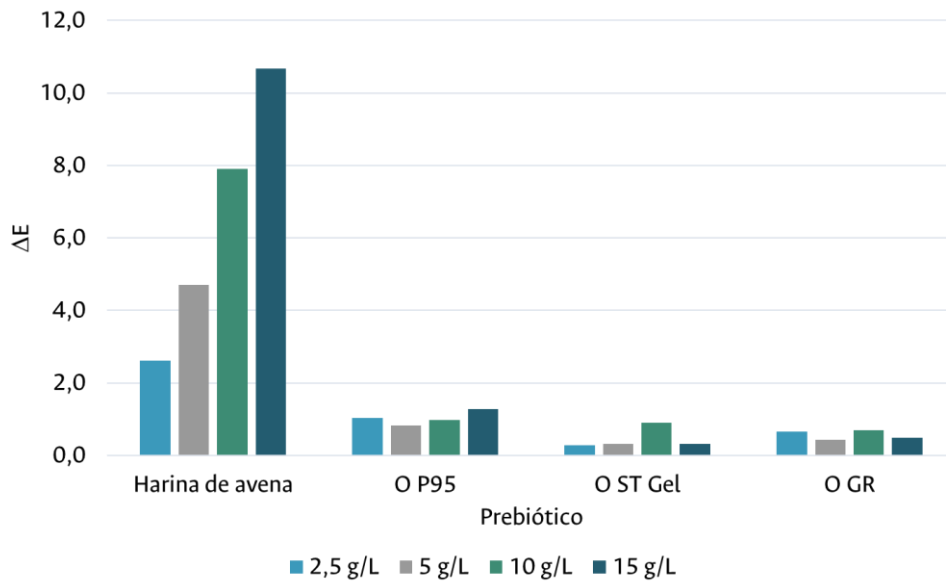
Letras diferentes representan diferencia significativa entre las concentraciones de prebiótico. Se realizaron comparaciones entre concentraciones de cada fibra, indicadas por los subíndices en las letras.

En la Figura 2-2 se presentan fotografías de las bebidas obtenidas. En cuanto al cambio de color de la bebida al adicionar diferentes cantidades de compuestos prebióticos (Gráfica 2-4), se observó que para los prebióticos comerciales el cambio de color fue mínimo e imperceptible al ojo humano según Režek Jambrak, Šimunek, & Djekic (2018), quienes afirman que cambios de colores correspondientes a valores de  $\Delta E$  de 2 pueden ser percibidos únicamente por observadores experimentados, valores entre 2 y 3,5 pueden ser percibidos por observadores promedio y valores superiores a 3,5 son claramente distinguidos. Así pues, para el caso de la adición de harina de avena el cambio de color sería notable por expertos a partir de la adición de 2,5 g/L y claramente notable para consumidores no entrenados a partir de la adición de 5 g/L.

**Figura 2-2:** Registro fotográfico de las bebidas con adición de las fibras prebióticas en sus diferentes concentraciones.



**Gráfica 2-4:** Efecto de la adición de fibras prebióticas en diferentes concentraciones sobre las diferencias de color de la bebida.



Como la adición de probióticos en la bebida causa inevitablemente cambios fisicoquímicos detectables que pueden afectar la aceptación del producto final, debido al metabolismo de estos microorganismos (di Cagno et al., 2011; Freitas et al., 2021; Wu et al., 2021), el uso de los compuestos prebióticos Orafti® P95 y Orafti® ST Gel sería más favorable para el desarrollo de la

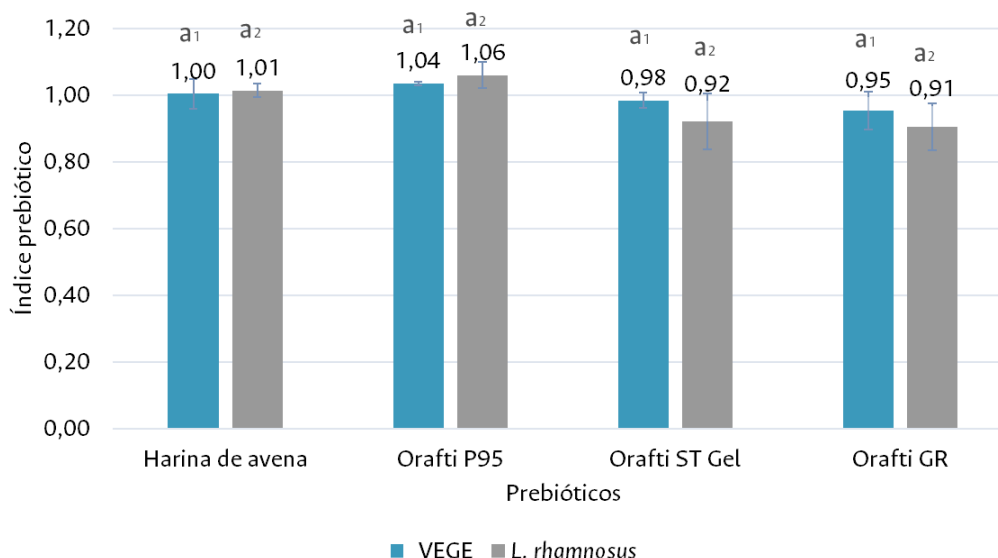
bebida pues generan un menor cambio en la viscosidad y color de la bebida en las concentraciones evaluadas al tiempo que permiten aumentar los sólidos solubles totales en la bebida que pueden favorecer el crecimiento de los microorganismos probióticos.

### 2.3.3. Selección de la mejor combinación de probiótico y prebiótico

Los prebióticos deben cumplir tres criterios: 1) tener la habilidad de resistir los procesos digestivos, es decir, ser resistentes al ácido gástrico, enzimas hidrolíticas y la absorción gastrointestinal; 2) ser fermentados por microorganismos intestinales; y 3) estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar del huésped (Gibson et al., 2017). La selectividad es primordial en este concepto pues los prebióticos deben estimular principalmente la proliferación de microorganismos benéficos y no otro tipo de microorganismos (Quigley, 2019). Puesto que el potencial prebiótico es cepa-dependiente, Huebner et al. (2008) y Figueroa-González et al. (2019) proponen evaluar la capacidad de un prebiótico para estimular el crecimiento de una cepa probiótica y su selectividad mediante la evaluación del índice y la actividad prebiótica.

El índice prebiótico refleja la capacidad de un sustrato de mejorar el crecimiento de un microorganismo probiótico en comparación con carbohidratos control, generalmente, glucosa o lactosa por ser los carbohidratos de preferencia por estos microorganismos (Huebner et al., 2008). Por su parte, la actividad prebiótica compara el crecimiento de un cultivo probiótico en presencia del compuesto prebiótico con el crecimiento de un microorganismo patógenos como la *E. coli* en presencia de dicho compuesto, usando como control la lactosa o la glucosa (Figueroa-González et al., 2019).

Para seleccionar cuál de las cuatro fibras prebióticas en estudio es adecuada para el crecimiento de dos cultivos probióticos, se determinó el índice y la actividad prebiótica *in vitro* de cada uno de los prebióticos. Un índice prebiótico superior a 1 significa que el carbohidrato evaluado tiene un efecto positivo en el crecimiento del probiótico y un índice prebiótico inferior a 1 indica una baja efectividad del carbohidrato evaluado (Figueroa-González et al., 2019). De esta forma y como se observa en la Gráfica 2-5, se podría afirmar que todos los ingredientes prebióticos evaluados presentaron un índice prebiótico adecuado y sin diferencias significativas entre ellos, estimulando en igual medida en comparación con la lactosa (carbohidrato control) el crecimiento tanto del cultivo probiótico axénico (*L. rhamnosus*) como el conglomerado (VEGE 092).

**Gráfica 2-5:** Índice prebiótico de las fibras utilizadas en el estudio sobre dos cultivos probióticos.

Letras diferentes representan diferencia significativa entre compuestos prebióticos para cada cultivo probiótico, diferenciados con los subíndices en las letras. Se usó prueba de Kruskal-Wallis con significancia de  $p=0,05$ .

Por su parte, una alta actividad prebiótica implica un buen crecimiento del cultivo probiótico, comparable con su crecimiento en presencia de lactosa, y un crecimiento de microorganismos patógenos bajo. Para el probiótico axénico (*L. rhamnosus*), Tabla 2-3, se observó un crecimiento con diferencia significativa respecto a la hora 0 únicamente usando el prebiótico Orafti® ST Gel. Para los demás prebióticos, e incluso la lactosa, no se observaron diferencias significativas entre la hora 0 y la hora 24 en el conteo de UFC de *L. rhamnosus*, por lo que estadísticamente la población del probiótico se mantuvo constante, excepto para Orafti® ST Gel. En cuanto al microorganismo patógeno, no se observaron diferencias significativas entre la población de *E. coli* a la hora 0 y a la hora 24, por lo que estadísticamente la población de *E. coli* se mantuvo constante en la presencia de todos los prebióticos evaluados, incluyendo a la lactosa. Así pues, para el cultivo probiótico *L. rhamnosus* es recomendable el uso de Orafti ST Gel como compuestos prebiótico pues fue la única fibra que estimuló su crecimiento de manera significativa a pesar de no presentar un efecto inhibitorio sobre el patógeno.

**Tabla 2-3:** Evaluación de la actividad prebiótica de los compuestos prebióticos en estudio frente al cultivo probiótico *L. rhamnosus*.

Prebiótico	Recuento a la hora 0 (Log UFC/mL)	Recuento a la hora 24 (Log UFC/mL)
<i>L. rhamnosus</i> (inóculo de $9,8 \pm 1,2$ log UFC/mL)		
Lactosa	$8,6 \pm 0,4^a$	$8,8 \pm 0,0^a$
Harina de avena	$8,1 \pm 0,1^a$	$8,0 \pm 0,0^a$
Orafti® P95	$8,0 \pm 0,1^a$	$7,8 \pm 0,1^a$
Orafti® ST Gel	$7,3 \pm 0,1^a$	$8,0 \pm 0,1^b$
Orafti® GR	$7,5 \pm 0,0^a$	$7,6 \pm 0,2^a$

<i>E. coli</i> (inóculo de $9,8 \pm 0,1$ log UFC/mL)		
Lactosa	$7,6 \pm 0,4^a$	$6,0 \pm 0,9^a$
Harina de avena	$7,6 \pm 0,1^a$	$8,0 \pm 0,3^a$
Orafti® P95	$7,2 \pm 0,6^a$	$7,8 \pm 0,4^a$
Orafti® ST Gel	$6,5 \pm 0,0^a$	$7,5 \pm 0,1^a$
Orafti® GR	$6,8 \pm 0,3^a$	$7,7 \pm 0,1^a$

Se hacen comparaciones entre filas con una prueba T-Student con significancia de  $p=0,05$

Para el cultivo probiótico conglomerado (VEGE 092), Tabla 2-4, se observó un crecimiento con diferencia significativa entre las horas 0 y 24 únicamente usando el carbohidrato control (lactosa) y el prebiótico Orafti P95. Para los demás prebióticos no se observaron diferencias significativas entre la hora 0 y la hora 24 en el conteo de log UFC/mL de VEGE 092, por lo que estadísticamente la población del probiótico se mantuvo constante usando los demás prebióticos. En cuanto al microorganismo patógeno, no se observaron diferencias significativas entre la población de *E. coli* a la hora 0 y a la hora 24, por lo que estadísticamente la población de *E. coli* se mantuvo constante en la presencia de todos los prebióticos evaluados, incluyendo la lactosa. Con esto, se pudo establecer que para el cultivo probiótico VEGE 092 es recomendable el uso de Orafti P95 como ingrediente prebiótico pues fue la única fibra que estimuló su crecimiento de manera significativa, a pesar de no presentar un efecto inhibitorio sobre el patógeno.

**Tabla 2-4:** Evaluación de la actividad prebiótica de los compuestos prebióticos en estudio frente al cultivo probiótico VEGE.

Prebiótico	Recuento a la hora 0 (Log UFC/mL)	Recuento a la hora 24 (Log UFC/mL)
<i>VEGE 092</i> (inóculo de $10,5 \pm 0,1$ log UFC/mL)		
Lactosa	$7,4 \pm 0,2^a$	$9,0 \pm 0,2^b$
Harina de avena	$7,7 \pm 0,1^a$	$8,3 \pm 0,9^a$
Orafti P95	$7,3 \pm 0,2^a$	$8,9 \pm 0,1^b$
Orafti ST Gel	$7,7 \pm 0,0^a$	$8,8 \pm 0,1^a$
Orafti GR	$7,6 \pm 0,1^a$	$8,7 \pm 0,0^a$
<i>E. coli</i> (inóculo de $10,3 \pm 0,1$ log UFC/mL)		
Lactosa	$6,6 \pm 0,1^a$	$6,6 \pm 0,1^a$
Harina de avena	$5,8 \pm 0,6^a$	$7,8 \pm 0,1^a$
Orafti P95	$5,9 \pm 0,8^a$	$7,3 \pm 0,4^a$
Orafti ST Gel	$5,8 \pm 0,2^a$	$6,1 \pm 0,1^a$
Orafti GR	$5,5 \pm 0,0^a$	$6,5 \pm 0,3^a$

Se hacen comparaciones entre filas con una prueba T-Student con significancia de  $p=0,05$

Puesto que Orafti P95 estimuló más el crecimiento de VEGE 092, con un crecimiento de 1,6 log UFC/mL, que Orafti ST Gel sobre *L. rhamnosus*, con un crecimiento de 0,7 log UFC/mL, se seleccionó Orafti P95 como la fibra soluble con potencial prebiótico y el cultivo probiótico conglomerado VEGE 092 como la combinación más apta para ser incluida en la bebida base formulada. Además, el uso de cultivos conglomerados puede mejorar la viabilidad durante su almacenamiento y en matrices con frutos rojos (di Cagno et al., 2011; Yan et al., 2019). De igual

forma, se ha reportado que algunas cepas de *L. acidophilus*, *L. paracasei* y *P. pentosaceus*, presentes en el cultivo probiótico VEGE 092, metabolizan y crecen más en presencia de FOS (componente principal del prebiótico comercial Orafti P95) como sustrato en comparación con la inulina (Mei et al., 2011; Watson et al., 2013).

### 2.3.4. Adaptación de probiótico y selección de la concentración de prebiótico óptima en la bebida

Habiendo establecido la composición de la bebida base, comprobado los cambios fisicoquímicos provocados por la adición de las fibras prebióticas y seleccionado la combinación de prebiótico y probiótico a usar se procedió a adicionar el cultivo probiótico seleccionado (VEGE 092) en la bebida. Speranza et al. (2020) recomiendan la adaptación de las cepas probióticas antes de incluirlas en el producto final con el objetivo de prolongar la viabilidad de éstas, uno de los métodos de adaptación recomendados consiste en suplementar el medio de cultivo con una porción de la matriz alimenticia en la cual se va a inocular dicho cultivo probiótico. La adaptación del cultivo probiótico VEGE 092 en el medio de cultivo con 10% de la bebida permitió obtener un conteo en placa de  $10,1 \pm 0,2$  log UFC/mL luego de su incubación a 37°C durante la noche, por lo que se puede decir que estos cultivos probióticos se adaptan adecuadamente en presencia de la bebida y se obtiene una buena población de probióticos para ser inoculado en la bebida base formulada.

Luego de la adaptación del cultivo probiótico seleccionada y habiendo seleccionado el prebiótico Orafti® P95, fue necesario establecer una concentración del prebiótico en la bebida que favoreciera el crecimiento del probiótico, esto con el objetivo de obtener una mejor viabilidad en el producto final. En la Tabla 2-5, se muestran los resultados del crecimiento, durante 24 horas en la bebida, del cultivo probiótico VEGE 092 adaptado, a diferentes concentraciones del prebiótico Orafti® P95. Se observó un crecimiento significativo en la bebida sin inclusión de prebiótico, con un crecimiento de 1,2 log UFC/mL, y en la bebida con una concentración de prebiótico de 10 g/L, con un crecimiento de 1,6 log UFC/mL. Al obtenerse un crecimiento del cultivo probiótico mayor en la bebida con una concentración 10 g/L de Orafti® P95 y con miras a garantizar una mayor viabilidad del cultivo probiótico durante el almacenamiento, se seleccionó la concentración 10 g/L de Orafti® P95 como la óptima para el desarrollo de la bebida con potencial simbiótico de frutos rojos.

**Tabla 2-5:** Evaluación del crecimiento durante 24 horas de VEGE 092 en la bebida de frutos rojos con la inclusión de diferentes concentraciones de la fibra prebiótica Orafti® P95.

Concentración de Orafti® P95	Recuento a la hora 0 (Log UFC/mL)	Recuento a la hora 24 (Log UFC/mL)
0 g/L	$8,5 \pm 0,1^a$	$9,7 \pm 0,1^b$
5 g/L	$8,0 \pm 0,2^a$	$9,4 \pm 0,7^a$
10 g/L	$9,0 \pm 0,2^a$	$10,6 \pm 0,3^b$
15 g/L	$8,8 \pm 0,7^a$	$10,0 \pm 0,2^a$

Se hacen comparaciones entre filas con una prueba T-Student con significancia de  $p=0,05$

De esta forma, se desarrolló exitosamente una bebida de frutos rojos con potencial simbiótico de tipo sinérgico pues los resultados indicaron que la fibra prebiótica seleccionada (Orafti® P95) estimuló

el crecimiento del cultivo probiótico VEGE 092, tanto en caldo de cultivo como en la bebida. Esto concuerda con varios estudios que comprueban la fermentación de FOS por parte de cepas de *L. acidophilus* (Kaplan & Hutkins, 2000), *L. paracasei* (Watson et al., 2013) y *P. pentosaceus* (Han et al., 2021). Sin embargo, otros estudios han demostrado que patógenos como la *E. coli* son capaces de metabolizar y crecer en presencia de FOS (Cummings et al., 2001; Gibson & Wang, 1994; Mao et al., 2015). De hecho, la inhibición de patógenos es un mecanismo complejo que puede deberse a la fermentación de los FOS por parte de las bacterias benéficas, con su consecuente producción de productos con potencial antimicrobiano como los son los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés) y bacteriocinas, que provocan el efecto selectivo de los compuestos prebióticos, estimulando el crecimiento de bacterias benéficas e inhibiendo el crecimiento de microorganismo patógenos (Chen et al., 2016). A pesar de esto, la selección del prebiótico se realizó con miras a mejorar la viabilidad del probiótico en la bebida, por lo que la selección del prebiótico y su concentración es la adecuada para el objetivo del presente estudio.

### **2.3.5. Selección del pretratamiento de conservación de la bebida con potencial simbiótico**

Hasta el momento, se definió la composición de la bebida base como 7% de pulpa de mora, 8% de pulpa de fresa, 15% de pulpa de banano y 0,05% de goma Xanthan como estabilizante; y se seleccionó Orafiti® P95 (constituido principalmente por FOS) como prebiótico a usar en la bebida basado en los pocos cambios fisicoquímicos que genera su adición en la bebida, su adecuado índice y actividad prebiótica sobre el cultivo probiótico VEGE 092 y la mayor estimulación del crecimiento del cultivo probiótico en la bebida con su adición en concentración de 10 g/L. Como etapa final para el desarrollo de la bebida con potencial simbiótico con antocianinas se realizó la selección del tratamiento de conservación de la bebida, previo a la inclusión del cultivo probiótico. Para esto se evaluó el efecto de los tratamientos de conservación (pasteurización, esterilización y ultrasonido) sobre la inocuidad microbiológica, las propiedades fisicoquímicas y el contenido y perfil de antocianinas de la bebida desarrollada.

#### **Comparación del efecto de los tratamientos de conservación sobre la inocuidad microbiológica de la bebida formulada.**

Como parte de la evaluación del bioproceso en desarrollo, se evaluó la calidad microbiológica del producto final empleando 5 tratamientos de conservación (pasteurización, esterilización y ultrasonido a 3 amplitudes diferentes), inoculando las bebidas tratadas con el probiótico adaptado, fermentando por 24 h a 37°C y almacenando en refrigeración por 7 días. Esto con el fin de seleccionar el tratamiento de conservación que permitiera obtener una calidad microbiológica adecuada según la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia, para refrescos de frutas, con el bioproceso desarrollado. El control fue una bebida sin tratar y sin inocular, pero incubada a 37°C por 24 horas. Es de resaltar que la calidad microbiológica de la bebida se hizo luego de la incubación a 37°C por 24 horas con miras a verificar, que luego del posterior proceso de inoculación, la bebida probiótica cumpliera con los estándares de

calidad microbiológica. La Tabla 2-6 muestra los resultados de la calidad microbiológica de las bebidas tratadas.

**Tabla 2-6:** Calidad microbiológica de las bebidas tratadas con 5 métodos de conservación.

Tratamiento	Control	US100	US80	US60	Pasteurización	Esterilización
Análisis						
NMP coliformes totales/mL	15	<3	<3	<3	<3	<3
NMP Coliformes fecales/mL	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Recuento de mohos y levaduras ufc/mL	12600	14900	8700	18000	<10	<10

Con estos resultados se observó que los tratamientos térmicos fueron los que efectivamente permiten obtener una bebida con buena calidad microbiológica pues eliminaron coliformes totales, mohos y levaduras. Por su cuenta, los tratamientos con ultrasonido solo fueron efectivos al eliminar coliformes totales. Por definición, los coliformes son bacilos anaerobios facultativos, Gram negativos, no formadores de esporas, capaces de fermentar lactosa con la producción de ácido y gas a 35 °C por 24 a 48 horas; generalmente, pertenecientes a los géneros *C. freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, y *Klebsiella pneumoniae* (Halkman & Halkman, 2014). Charoux et al. (2019) afirman que el ultrasonido es más efectivo frente a microorganismos Gram negativos seguido de Gram positivos. La forma del microorganismo también afecta la efectividad del ultrasonido como método de inactivación pues la forma de bacilo es más susceptible al ultrasonido que la forma de coco. En cuanto a los mohos y levaduras, se encuentra que generalmente son más resistentes que las bacterias vegetativas (Charoux et al., 2019).

Cassani et al. (2020) evaluaron la microbiota nativa de una bebida de fresa enriquecida con prebióticos (inulina y FOS) con y sin tratamiento ultrasónico (baño de ultrasonido por 15 y 30 min, 40 kHz, 180 W y 20°C sobre un volumen de 350 mL) durante 14 días de almacenamiento a 5°C. Durante la primera semana de almacenamiento se observó un descenso significativo en el conteo de bacterias mesófilas aeróbicas totales, bacterias psicrófilas y levaduras y mohos en la bebida tratada con ultrasonido, especialmente en las muestras tratadas por 30 min. Este estudio también comparó el efecto del ultrasonido en la bebida con y sin compuesto prebióticos, encontrando que, en la bebida enriquecida con prebióticos, a partir de la segunda semana, se observó un crecimiento en el conteo de microorganismos, pero la velocidad de crecimiento en este caso fue mucho menor que en las bebidas sin tratamiento. De este modo, la bebida sin tratamiento obtuvo una vida útil (carga microbiana menor a 7 log UFC) de 10 días mientras que la bebida tratada con ultrasonido logró una vida útil de 14 días, con prebiótico.

Los resultados del procesamiento de alimentos como método de conservación con ultrasonido dependen de varios factores críticos como: la naturaleza de las ondas ultrasónicas, el tiempo de exposición, el tipo de microorganismos, la carga microbiológica inicial, el volumen de alimento procesado, la composición del alimento, la temperatura y la presión (Charoux et al., 2019). El uso de la combinación de ultrasonido con temperatura y/o presión es generalmente recomendada para la inactivación de microorganismos. Zhu et al. (2017) evaluaron el efecto sobre *E. coli* O157:H7 en 50



mL jugo de arándanos de diferentes tratamientos: tratamiento térmico (HT: 80 °C), sonicación (SC: 280, 420, 560 y 700 W por 10 min), termosonicación (TS: 30, 40, 50, 60 °C, 280, 420, 560, and 700 W por 10 min), manosonicación (MS, 560 W y 350 MPa) y manotermosonicación (MTS, 560 W, 40 °C y 350 MPa). Este estudio encontró que el tratamiento con sonicación no era suficiente para la inactivación de *E. coli* sin importar la intensidad usada obteniéndose valores entre 0,1 y 0,3 log de reducción; por su parte el tratamiento térmico resultó con una reducción de 2,00 log; la termosonicación provocó reducciones entre 0,13 y 5,10 log donde las mayores reducciones se obtuvieron a mayores temperaturas e intensidades; la manosonicación presentó una reducción de 5,2 log y la manotermosonicación una reducción de 5,85 log, después de 5 minutos de tratamiento.

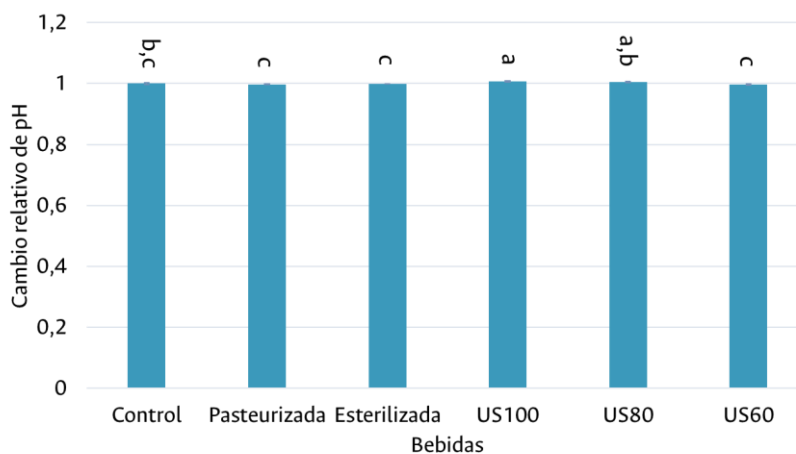
En este estudio en específico, los factores que pudieron influir más en la baja reducción de mohos y levaduras, además de la etapa de incubación, fueron el volumen tratado y la intensidad del tratamiento. El volumen tratado en el presente estudio fue de 700 mL de bebida, siendo este mucho más alto que la mayoría de los estudios realizados sobre los efectos de inactivación de microorganismos usando ultrasonido, los cuales se encuentran típicamente en rangos entre 1 y 200 mL. Este volumen de trabajo requirió, según el proveedor y el manual de uso del equipo, el uso de una sonda de diámetro más alto (25 mm) que el usado en este tipo de estudios (entre 10 y 19 mm), al aumentar el diámetro de la sonda también se reduce la intensidad de las ondas ultrasónicas, luego el equipo entregó entre 50 y 95 W sobre los 700 mL de bebida a tratar. Por esto, una posible alternativa para mejorar los resultados encontrados y reducir de manera más efectiva la carga de mohos y levaduras es reducir el volumen de bebida a tratar con un consecuente uso de una sonda de diámetro más pequeño. Entre más pequeño el volumen y más pequeño el diámetro de la sonda, mayor intensidad se obtiene y mayores temperaturas se alcanzan (Sonic & Materials, s.f.). Otra alternativa sería realizar una metodología en continuo y no en bache con lo que se puedan tratar volúmenes más pequeños. Sin embargo, para los propósitos y objetivos del presente estudio, un volumen inferior a 700 mL de bebida y un sistema en continuo no era factible pues había un mayor riesgo de contaminación, un mayor tiempo de procesamiento y no se contaba con el equipo necesario para hacer el tratamiento en continuo.

### **Cambios fisicoquímicos en la bebida causados por los tratamientos de conservación**

Luego de los diferentes tratamientos de conservación se obtienen las bebidas que se muestran en la Figura 2-3. A simple vista se observó una diferencia evidente entre la bebida tratada por esterilización y las demás bebidas, presentando la bebida esterilizada una tonalidad marrón y partículas en suspensión debiéndose posiblemente a procesos de caramelización por las altas temperaturas empleadas.

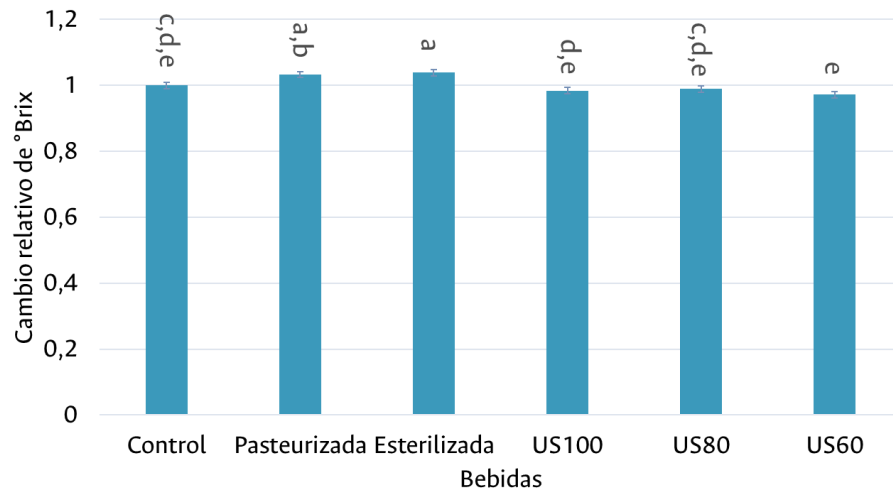
**Figura 2-3:** Fotografía de bebidas tratadas.

La bebida control presentó un pH de  $3,86 \pm 0,02$ , unos sólidos solubles totales de  $6,0 \pm 0,1^\circ\text{Brix}$  y una viscosidad de  $0,01386 \pm 0,00008$  Pa.s. El pH de las bebidas no se ve afectado por los tratamientos usados pues no se observan diferencias relevantes frente al control (Gráfica 2-6).

**Gráfica 2-6:** Cambio de pH relativo a la bebida control (sin tratamiento) de las bebidas tratadas.

Letras diferentes representan diferencia significativa usando ANOVA con significancia de  $p=0,05$  y una prueba Tukey.

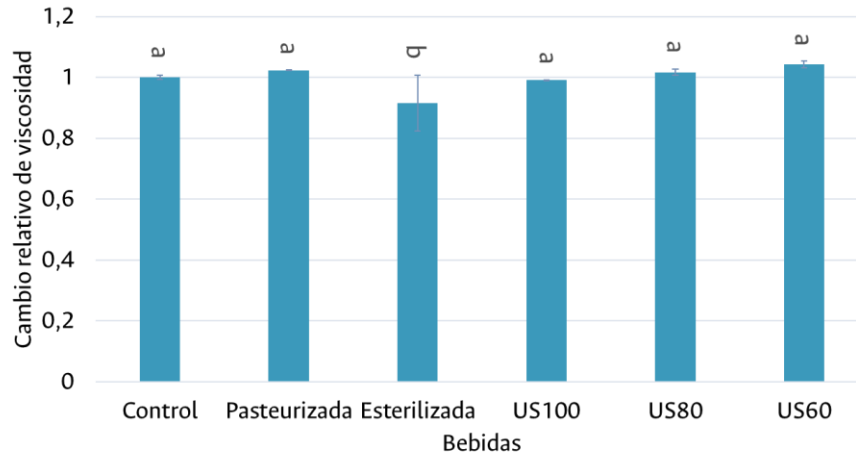
Los sólidos solubles totales en las bebidas, como se observa en la Gráfica 2-7, aumentaron ligeramente al ser tratadas por pasteurización y esterilización presentando diferencias significativas frente al control (bebida sin ningún tipo de tratamiento). Este aumento en los sólidos solubles totales fue atribuido a una ligera evaporación de agua durante estos tratamientos térmicos sobre la bebida. Los tratamientos con ultrasonido conservaron los sólidos solubles totales sin diferencias estadísticamente significativas frente al control.

**Gráfica 2-7:** Cambio de S.S.T. relativo a la bebida control (sin tratamiento) de las bebidas tratadas.

Letras diferentes representan diferencia significativa usando ANOVA con significancia de  $p=0,05$  y una prueba Tukey.

La viscosidad solo se vio afectada de manera significativa al emplear la esterilización como tratamiento (Gráfica 2-8). Esta variación en la viscosidad se debió a la inestabilidad que causa este tratamiento térmico intenso sobre la bebida, el cual generó la aparición de sólidos en suspensión y una bebida menos homogénea. Por su parte, las bebidas tratadas con ultrasonido conservaron su aspecto homogéneo, pero luego de un tiempo se observó una separación de fases indicando la inestabilidad de la goma xanthan usada con el propósito de estabilizar los sólidos en suspensión y conservar el aspecto homogéneo de la bebida por más tiempos. Respecto a la estabilidad de las gomas frente a tratamientos con ultrasonido, Tiwari et al. (2010) evaluaron la influencia sobre las características reológicas de tratamientos con ultrasonido (20 kHz, 3.7–10.1 Wcm<sup>-2</sup>, 25°C por 5 min) sobre dispersiones de goma guar, xanthan y pectina, encontrando una reducción significativa de la viscosidad aparente y una tendencia hacia un comportamiento de fluido newtoniano después del tratamiento con ultrasonido, especialmente en las dispersiones de goma guar y pectina. A pesar de que este estudio encuentra que la goma xanthan es más resistente debido a su estructura ramificada, aun se vio afectada por el ultrasonido. Por su parte, la pasterización no afectó la estabilidad proporcionada por la goma xanthan, permitiendo mantener un aspecto homogéneo en la bebida incluso luego de 7 días en almacenamiento, al igual que la bebida control.

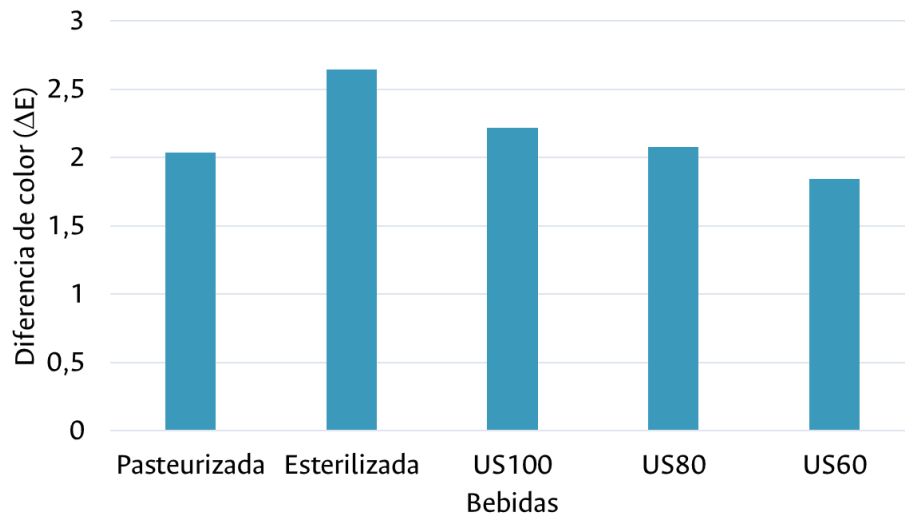
**Gráfica 2-8:** Cambio de viscosidad relativo a la bebida control (sin tratamiento) de las bebidas tratadas.



Letras diferentes representan diferencia significativa usando ANOVA con significancia de  $p=0,05$  y una prueba Tukey.

En cuanto a los cambios de color en la bebida (Gráfica 2-9), se observó que el cambio más pronunciado o que puede ser mayormente percibido fue el de la bebida tratada por esterilización según los valores de  $\Delta E$ . Sin embargo, según Režek Jambrak, Šimunek, & Djekic (2018), los valores de  $\Delta E$  de todos los tratamientos son percibidos por observadores promedio o no son percibidos, pero el cambio de color en el tratamiento con esterilización es claramente distinguible, como se observa en la Figura 2-3.

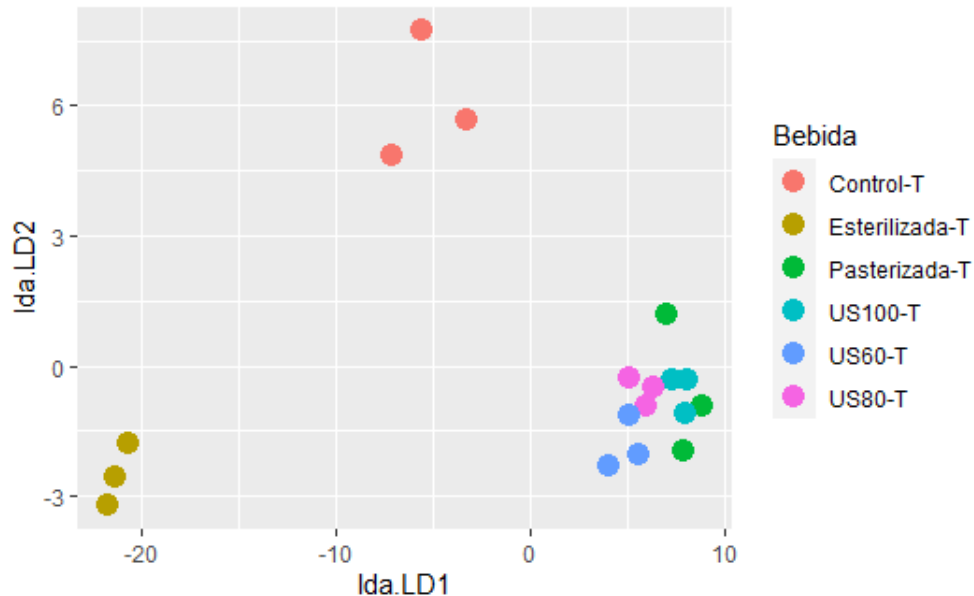
**Gráfica 2-9:** Efecto de los tratamientos sobre el color de la bebida.



Por tal razón, se realizó un análisis multivariado de las tres variables de color (l, a y b) ( $p$ -valor  $<0,001$ ), y se hizo un análisis de discriminación lineal para identificar diferencias estadísticas entre los tratamientos empleados en la bebida, encontrando una representación de los datos superior al 99% en las dos primeras dimensiones (LD1 y LD2), con lo que se obtiene la Gráfica 2-10. Del análisis de discriminación lineal del color se observó que las bebidas se agrupan en 3 grupos claros:

1) control; 2) pasteurizada, US100, US80 y US60; y 3) esterilizada. De este modo, se concluyó que los 5 tratamiento empleados modificaron el color de la bebida inicial (control), siendo la bebida esterilizada la que presentó una coloración diferente a todas las demás.

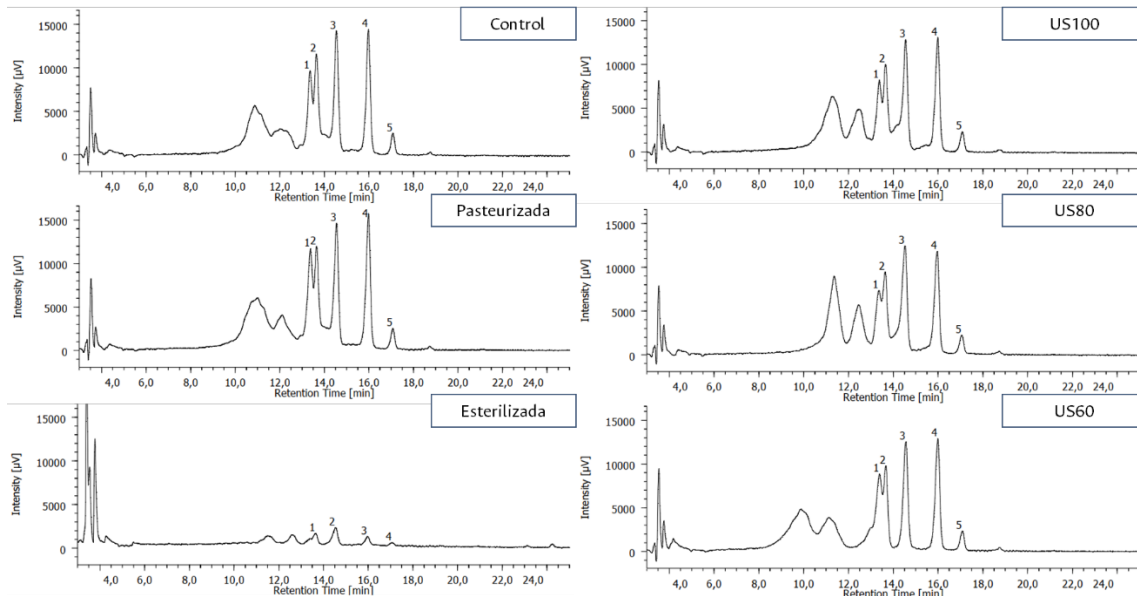
**Gráfica 2-10:** Análisis de discriminación lineal del color para identificar diferencias estadísticas entre los tratamientos empleados en la bebida.



#### Comparación del efecto de los tratamientos de conservación sobre el contenido y perfil de antocianinas de la bebida formulada

El perfil de antocianinas en la bebida se mantuvo constante durante el tratamiento térmico de pasteurización y los tres tratamientos con ultrasonido, como se observa en la Gráfica 2-11. Se identificaron, por UHPLC-MS, 6 antocianinas presentes en la bebida: Cianidina-3-O-glucósido (Cy-Glc) (pico 1), Cianidin-3-O-glucosa-Rhamnosa-X-Arabinosa (Cy-glc-Rha-X-Ara) (pico 2), Cianidin-3-O-glucosa-X-arabinosa (Cy-Glc-X-Ara) (pico no resultó entre el 1 y 2), Cianidin-3-O-rutinósido (Cy-Rut) (pico 3), Pelargonidin-3-O-glucósido (Pg-Glc) (pico 4) y Pelargonidin-3-O-glucósido-X-rhamnosa (Pg-Glc-X-Rha) (pico 5).

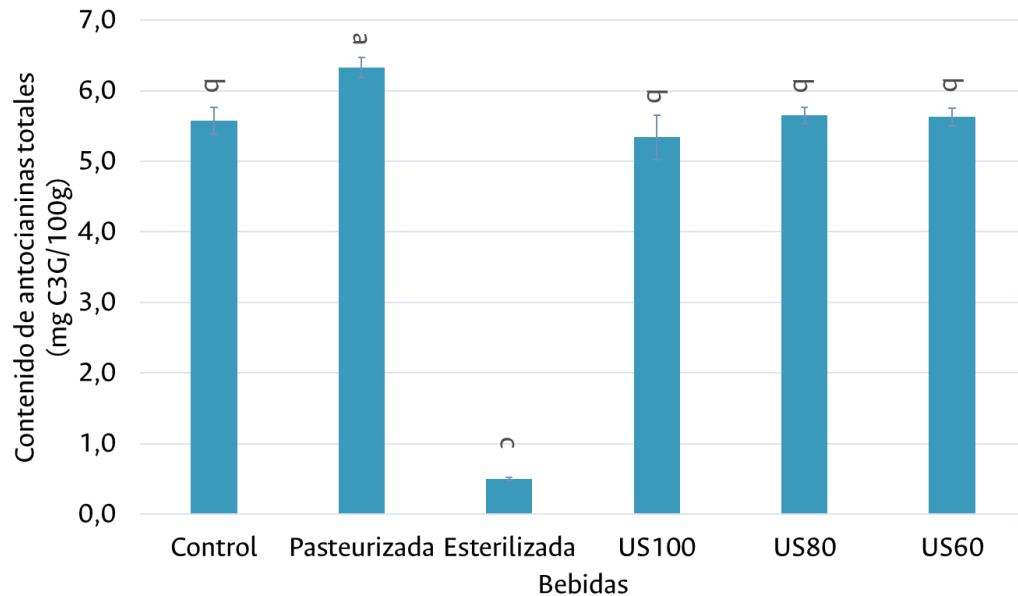
**Gráfica 2-11:** Perfiles de antocianinas de la bebida antes y después de cada uno de los tratamientos en estudio.



Se identifican las siguientes antocianinas: Cianidin-3-O-glucósido (Cy-Glc) (pico 1), Cianidin-3-O-glucosa-Rhamnosa-X-Arabinosa (Cy-glc-Rha-X-Ara) (pico 2), Cianidin-3-O-glucosa-X-arabinosa (Cy-Glc-X-Ara) (pico no resultó entre el 1 y 2), Cianidin-3-O-rutinósido (Cy-Rut) (pico 3), Pelargonidin-3-O-glucósido (Pg-Glc) (pico 4) y Pelargonidin-3-O-glucósido-X-rhamnosa (Pg-Glc-X-Rha) (pico 5). La X representa una posición no identificada en la unión del azúcar a la estructura de la correspondiente antocianidina.

Las antocianinas de cianidina fueron aportadas principalmente por la mora y las de pelargonidina fueron aportadas mayoritariamente por la fresa, especialmente la Pg-Glc. Esto está de acuerdo con Santacruz et al. (2012) quienes identificaron cianidin-3-O-glucósido, cianidin-3-O-rutinósido y cianidina-3-O-(6''-malonyl)-glucósido en Mora Pequeña (*R. megalococcus* Focke). Zhang et al. (2012) investigaron la composición de antocianinas en un jugo de mora encontrando como antocianina mayoritaria cianidin-3-O-glucósido y en menor proporción cianidin-3-O-arabinósido, cianidin-3-O-malonil-glucósido, cianidin-3-O-dioxalil-glucósido y un derivado de cianidina sin identificar. Por su parte, Canuto et al. (2016) y Ertan et al. (2020) identificaron como antocianina mayoritaria en fresa (*Fragaria* spp.) y néctares de fresa (*Fragaria ananassa*) a la Pelargonidin-3-O-glucósido (Pg-Glc) y en menor proporción reportaron Cianidin-3-O-glucósido y Pelargonidin-3-O-rutinósido.

Del contenido de antocianinas totales luego de cada tratamiento, no se observaron cambios significativos luego de los tres tratamientos con ultrasonido (Gráfica 2-12). Para el tratamiento con pasteurización se observó un ligero aumento en el contenido total de antocianinas en la bebida debido, probablemente, a la evaporación de agua durante este tratamiento. Para el caso de la esterilización, se observó la degradación y una reducción considerable en el contenido de antocianinas (degradación del 91% del contenido de antocianinas iniciales) y la aparición de compuestos que eluyen junto al frente del solvente (Gráfica 2-11) indicando un aumento en la polaridad de estas moléculas lo que puede indicar un rompimiento en la estructura de estos compuestos, producto de reacciones de hidrólisis u oxidación de los anillos antocianínicos (Jamar et al., 2017).

**Gráfica 2-12:** Efecto de los tratamientos sobre el contenido de antocianinas totales de la bebida.

Letras diferentes representan diferencia significativa usando ANOVA con significancia de  $p=0,05$  y una prueba Tukey.

Generalmente, cuando las antocianinas son expuestas a temperaturas superiores a  $30^{\circ}\text{C}$  se transforman en su forma chalcona más inestable y de ahí se degradan a compuestos marrones (Ngamwonglumlert et al., 2017). Los compuestos obtenidos como resultado de la degradación térmica de las antocianinas varían según el tipo de antocianina y sus sustituyentes, pero generalmente son derivados de aldehídos o ácidos benzoicos como el floroglucinaldehído y los ácidos 4-hidroxibenzoico, protocatecuico, gálico y sirínico (Oancea, 2021). Verbeyst et al. (2010) evaluaron la degradación térmica ( $80\text{--}130^{\circ}\text{C}$ ) de las antocianinas en una pasta de fresa, encontrando que el descenso en la concentración de antocianinas era función del tiempo y la degradación se aceleraba a mayores temperaturas. De igual forma, Wang & Xu (2007) evaluaron la estabilidad térmica ( $60\text{--}90^{\circ}\text{C}$ ) de las antocianinas en un jugo y concentrado de mora, logrando una buena estabilidad de las antocianinas empleando bajas temperaturas y periodos cortos de tiempo en el procesamiento de dichos jugos. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos, donde la pasteurización ( $85^{\circ}\text{C}$  x 5 min) permitió conservar el contenido de antocianinas en la bebida, en comparación al método de esterilización ( $120^{\circ}\text{C}$  x 15 min, 15 psi) con lo que se obtuvo una gran degradación de las antocianinas.

Los tratamientos con ultrasonido no suelen generar cambios fisicoquímicos en bebidas de frutas, como se comprueba en el presente estudio, donde los tratamientos de ultrasonido no modificaron de manera significativa el pH, los  $^{\circ}\text{Brix}$ , la viscosidad ni el contenido de antocianinas totales, solo se observó un pequeño cambio en la coloración de la bebida luego de los tres tratamientos con ultrasonido empleados. Por su parte, Cervantes-Elizarrarás et al. (2017) emplearon un tratamiento de termosonicación (20 kHz, 1500 W,  $50^{\circ}\text{C}$  por 17 min, sonda de 25 mm y 200 mL de muestra) en un jugo de mora logrando la completa inactivación de mesófilos, coliformes, levaduras y bacterias ácido lácticas, pero se observó un ligero aumento en los sólidos solubles totales y el pH de la bebida

tratada. En este estudio, se observó un descenso en el contenido de antocianinas al emplear el tratamiento con ultrasonido, pero en menor proporción que al emplear un tratamiento de pasteurización (90 °C por 15 s); lo que demuestra que un tratamiento de termosonicación puede ser una alternativa viable de los procesos de pasterización para la producción de jugos seguros y de alta calidad con un alto contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

Sin embargo, Feng et al. (2020) compararon los efectos de un tratamiento con ultrasonido (376 W, 10 min, 35 °C, sonda de 6 mm y pulsos de 2 s) con un tratamiento térmico (86 °C/1 min) sobre 50 mL de una bebida de fresa-manzana-limón, encontrando un descenso en el contenido de antocianinas de 16% para el tratamiento con US frente un descenso del 12% usando el tratamiento térmico. Este estudio también encontró que los sólidos solubles totales no se vieron afectados por ninguno de los dos tratamientos, el pH de la bebida aumentó ligeramente con el tratamiento con ultrasonido, pero se mantuvo sin cambios significativos con el tratamiento térmico, y el color presentó cambios imperceptibles con valores  $\Delta E$  de 0,40 y 2,20 para el tratamiento con ultrasonido y el tratamiento térmico, respectivamente.

Los cambios fisicoquímicos y la pérdida o no del contenido de antocianinas por tratamientos térmicos o con ultrasonido varían ampliamente, dependiendo éstos de las condiciones empleadas en estos tratamientos. Encontrándose, generalmente, que el ultrasonido no provoca cambios fisicoquímicos y permite retener el contenido de antocianinas, pero por sí solo puede que no sea efectivo para eliminar microorganismos y lograr la calidad microbiológica requerida para este tipo de productos. Por su parte, los tratamientos de pasteurización aplicados a bebidas con frutos rojos son efectivos en la eliminación de microorganismos con una mínima o ninguna pérdida de las propiedades fisicoquímicas ni el contenido de antocianinas de la bebida. Para el caso del presente estudio, el tratamiento por pasteurización es el más adecuado para lograr una buena calidad microbiológica de la bebida, conservando las propiedades fisicoquímicas de la bebida y el contenido de antocianinas en la bebida estable por lo menos durante 7 días de almacenamiento en refrigeración. Con este tratamiento se obtiene una bebida con inclusión de prebióticos y probióticos fermentada por 24 horas con un pH de  $3,54 \pm 0,01$ , unos sólidos solubles totales de  $6,1 \pm 0,1^\circ\text{Brix}$ , una viscosidad de  $0,0145 \pm 0,0001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  y un contenido de antocianinas totales de  $6,4 \pm 0,4 \text{ mg C3G/100g}$ , además de conservar la apariencia homogénea del producto.

## 2.4. Conclusiones

Como es necesario contar con un mínimo de unidades formadoras de colonias de microorganismos probióticos en el alimento a la hora de ser consumido para ejercer efectos benéficos de la salud, en el presente estudio se logró formular una bebida de frutos rojos con inclusión de probióticos y prebióticos empleando tres estrategias para garantizar la viabilidad del probiótico: adaptación, adición de prebióticos y uso de frutas menos ácidas para regular la acidez del sustrato. Luego, la fórmula de la bebida es 7% de pulpa de mora, 8% de pulpa de fresa, 15% de pulpa de banano, 1% de compuestos prebiótico Orafti® P95 y 0,05% de goma xathan. Se comprobó que la adaptación del cultivo probiótico conglomerado, VEGE 092, es adecuada y es capaz de crecer en la bebida formulada. Para garantizar la calidad microbiológica de la bebida, previa a la inclusión del cultivo probiótico adaptado, se emplea un tratamiento de pasteurización a 85°C por 5 min con lo que se



---

logra la eliminación de coliformes, hongos y levaduras, a la vez que se conservan las propiedades fisicoquímicas de la bebida como pH, sólidos solubles totales, viscosidad y contenido de antocianinas, con un mínimo cambio en el color. A pesar de la que pasteurización fue eficiente en el presente estudio y es el tratamiento más usado en la conservación de bebidas de frutas y verduras, los tratamientos con ultrasonido tienen potencial para obtener resultados similares a los obtenidos por la pasteurización. Para obtener resultados exitosos en la conservación de la bebida desarrollada empleando un tratamiento de ultrasonido, probablemente, sea necesario reducir el volumen de trabajo, disminuir el diámetro de la sonda y aumentar la temperatura y tiempo de trabajo. Así, la bebida desarrollada bajo las condiciones establecidas cumple con la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia para refrescos de frutas y la NTC 3549 que establece los requisitos y ensayos que deben cumplir las bebidas de frutas.



# **Capítulo 3. Evaluación de los cambios fisicoquímicos, microbiológicos y bioactivos de la bebida simbiótica durante su fermentación y almacenamiento**

## **3.1. Introducción**

Por definición, los probióticos deben ser microorganismos vivos por lo que un producto probiótico debería contener por lo menos  $10^6$ - $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC)/g, dosis mínima recomendada, de bacterias probióticas para garantizar sus efectos terapéuticos (Shori, 2016). Por tanto, en el desarrollo de productos probióticos es necesario tener en cuenta tanto las características de la cepa probiótica como las características de la matriz alimenticia, pues la cepa probiótica no solo enfrentará condiciones adversas al ser consumida sino también durante su procesamiento y almacenamiento (Flach et al., 2017). La viabilidad de una bacteria probiótica (capacidad de crecer y reproducirse) en matrices alimenticias puede verse afectada por el método de inoculación, el almacenamiento, la temperatura, el pH, la actividad metabólica del microorganismo, la actividad de agua, el contenido de oxígeno, el tipo de empaque, la presencia de otras bacterias, entre otros factores (Flach et al., 2017; Lillo-Pérez et al., 2021).

Adicionalmente, el metabolismo de los microorganismos probióticos causa una considerable disminución de nutrientes disponibles y del pH por la acumulación de ácido láctico, dificultando alcanzar la dosis mínima recomendada (Lillo-Pérez et al., 2021). El control de la temperatura durante el procesamiento y almacenamiento del producto puede ayudar a controlar la actividad metabólica de estos microorganismos. De esta forma, altas temperaturas aceleran la actividad metabólica y el crecimiento de las bacterias probióticas, mientras que bajas temperaturas disminuye la actividad metabólica e inhibe el crecimiento celular (Lillo-Pérez et al., 2021). Por lo anterior, se recomienda realizar una fermentación corta del producto inoculado con probióticos para promover el crecimiento celular y un almacenamiento del producto bajo condiciones de refrigeración para disminuir la actividad metabólica evitando un excesivo descenso del pH en la matriz y un cambio en el perfil sensorial del producto.

De las frutas empleadas en el desarrollo de bebidas funcionales con inclusión de probióticos llaman especialmente la atención aquellas frutas ricas en antocianinas, no solo por los beneficios a la salud aportados por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (de Souza et al.,

2018), sino también por su capacidad de modular y estimular el crecimiento de microorganismos probióticos a la vez que se generan metabolitos típicamente más bioactivos y bioaccesibles que las antocianinas precursoras (Tian et al., 2019). Sin embargo, la estabilidad de las antocianinas frente a diversas condiciones encontradas en el procesamiento y almacenamiento de bebidas es un limitante en el desarrollo de este tipo de productos.

La estabilidad de las antocianinas está principalmente influenciada por su estructura química, el pH, la temperatura de almacenamiento y la presencia de luz, oxígeno y algunas enzimas (Leong et al., 2018). La velocidad de degradación de las antocianinas varía ampliamente debido a la diversidad en sus estructuras, pues el tipo y número de sustituyentes tiene un marcado efecto en la estabilidad de éstas. Generalmente, el aumento en la hidroxilación de las antocianinas disminuye la estabilidad, mientras que el aumento en la metilación, glicosilación y acilación aumenta la estabilidad debido a que los grupos hidroxilos reactivos quedan bloqueados (Ngamwonglumlert et al., 2017). Por tal motivo, el color en los alimentos con altos contenidos en antocianinas como la pelargonidina, cianidina o delfinidina son menos estables que aquellos con alto contenido en petunidina, peonidina o malvidina (Fennema et al., 2008).

Dependiendo del pH, las antocianinas pueden encontrarse bajo diferentes formas químicas, con diferentes coloraciones, donde un pH menor a 4 proporciona una mayor estabilidad en el tono del color que proporcionan las antocianinas (Ngamwonglumlert et al., 2017). Las antocianinas muestran su color más intenso a un pH de aproximadamente 1 cuando las moléculas se encuentran mayoritariamente en su forma ionizada (catión flavilio) (Varo Santos, 2019). En general, las configuraciones estructurales que llevan a incrementar la estabilidad en el pH también llevan a incrementar la estabilidad térmica (Fennema et al., 2008). El procesamiento y almacenamiento a bajas temperaturas mejora la estabilidad de las antocianinas, induciendo una destrucción más lenta de los pigmentos. Cuando la temperatura aumenta a 30°C o más, las antocianinas se transforman en la forma chalcona más inestable y de ahí se degradan a compuestos marrones (Ngamwonglumlert et al., 2017).

La industria de las bebidas se centra en la elaboración de productos seguros, saludables y de alta calidad con una vida útil bien establecida. Por ende, el objetivo de esta parte del estudio fue analizar la viabilidad del cultivo probiótico y la calidad microbiológica, fisicoquímica y bioactiva de la bebida con antocianinas e inclusión de prebióticos y probióticos formulada bajo condiciones de fermentación (37°C, 24 horas) y almacenamiento refrigerado (4°C, 28 días). Se buscó verificar que, al final de los 28 días, el conteo de bacterias probióticas alcanzase o superase la dosis mínima recomendada para proveer efectos benéficos a la salud; la bebida cumpliera con los requisitos mínimos de calidad microbiológica referente a coliformes, mohos y levaduras; las propiedades fisicoquímicas de la bebida se mantuviesen durante su almacenamiento; la degradación de las antocianinas fuese lo más lenta posible, conservando su actividad antioxidante; y que la bebida fermentada con probióticos presentase una buena aceptabilidad frente a un panel sensorial no entrenado.

## 3.2. Metodología

### 3.2.1. Materiales y reactivos

#### Químicos y reactivos

El hidróxido de sodio, el ácido fórmico, el ácido sulfúrico, el cloruro de potasio, el acetato de sodio y el carbonato de sodio grado analítico fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España). El metanol, el etanol, el DPPH, el reactivo de folin-ciocalteu, la glucosa, la fructosa, el ácido málico, el ácido láctico, el ácido gálico y el ácido clorhídrico grado analítico fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). Para la separación cromatográfica se empleó agua purificada usando un equipo de intercambio iónico y microfiltración Milli-Q (Millipore, Molsheim, France).

#### Ingredientes y material vegetal

Se adquirió el compuesto prebiótico Orafti® P95 de BENEIO (Mannheim, Germany), ver Anexo 3: Fichas técnicas de sustancias prebióticas. Como microorganismo probiótico se empleó la cepa, de la línea comercial DANISCO-HOWARU®, VEGE 092 (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*), ver Anexo 2: Fichas técnicas de cepas probióticas comerciales. La cepa se obtuvo de la colección del laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA). La goma xanthan, usada como estabilizante, fue adquirida de Cimpa (Bogotá, Colombia).

Moras, fresas y bananos maduros fueron adquiridos de mercados locales. Para la obtención de pulpa de mora y fresa se usó una despulpadora y para la pulpa de banano un procesador de alimentos. La pulpa obtenida se almacenó en bolsas ziploc a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Se empleó una pulpa de mora con un pH de  $2,85 \pm 0,01$ , un contenido de sólidos solubles totales de  $7,9 \pm 0,1$  °Brix y una acidez titulable de  $2,37 \pm 0,04$  % ácido málico; una pulpa de fresa con un pH de  $3,66 \pm 0,01$ , un contenido de sólidos solubles totales de  $7,9 \pm 0,1$  °Brix y una acidez titulable de  $0,87 \pm 0,01$  % ácido málico; y bananos completamente maduros con un pH de  $5,26 \pm 0,02$ , un contenido de sólidos solubles totales de  $21,9 \pm 0,1$  °Brix y una acidez titulable de  $0,27 \pm 0,01$  % ácido málico.

### 3.2.2. Proceso de elaboración de la bebida

La fórmula de la bebida fue 7% de pulpa de mora, 8% de pulpa de fresa, 15% de pulpa de banano, 1% de compuestos prebiótico Orafti® P95 y 0,05% de goma xanthan. Antes de la inoculación se adaptó el cultivo probiótico VEGE 092, incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una noche en un medio de cultivo compuesto por caldo MRS (Oxoid®) y 10% de la bebida. Se realizó la inoculación del 1-2% del inóculo obtenido del medio de adaptación en 200 mL de bebida. La bebida fue pasteurizada a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min antes de ser inoculada. Se realizó la fermentación de la bebida por 24 h bajo incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y, luego de esto, se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3. Evaluación de la cinética de fermentación de la bebida

Se evaluó, por duplicado, el proceso de fermentación de la bebida con inclusión del cultivo probiótico VEGE 092 a cinco tiempos sucesivos de fermentación 0, 6, 12, 18 y 24 h. La unidad de trabajo fue de 200 mL de bebida, de cada unidad de trabajo se determinaron por duplicado la viabilidad del cultivo probiótico, el pH y la concentración de glucosa, fructosa, ácido málico y ácido láctico en el sustrato.

Para la viabilidad del cultivo probiótico se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en placa por siembra en profundidad en agar MRS (Oxoid®) a las 0, 6, 12, 18 y 24 horas de incubación a 37°C. Las placas fueron incubadas por 48 horas en condiciones de microaerobiosis a 37°C. Se calcula la velocidad máxima,  $V_{max}$ , de crecimiento según la Ecuación 3-1.

$$X = X_0 \cdot e^{V_{max} \cdot t} \quad \text{Ecuación 3-1}$$

Donde X es el número de microorganismos viables (UFC) al tiempo t y  $X_0$  es el número de microorganismos viables (UFC) al tiempo 0. El tiempo de duplicación,  $t_d$ , se calcula según la Ecuación 3-2.

$$t_d = \frac{\ln 2}{V_{max}} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Para la determinación del pH se tomaron asépticamente 10 mL de bebida en los tiempos estipulados (el tiempo 0 correspondió a las condiciones iniciales del sustrato), a los cuales se les determinó, por duplicado, el pH usando un potenciómetro Mettler Toledo SevenCompact.

#### Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos

De la alícuota de bebida tomada asépticamente, 1 a 2 g se extrajo con 4 mL de agua desionizada durante 2 min en vortex, centrifugando por 15 min a 1000 rpm (6000xg) dos veces recuperando y combinando los sobrenadantes cada vez y llevando a 10 mL con el mismo solvente de extracción. Posteriormente, los extractos fueron filtrados (filtros de jeringa PTFE de 0,22  $\mu$ m) e inyectados en equipo HPLC para determinar la concentración de glucosa, fructosa, ácido málico y ácido láctico en el sustrato.

Se empleó un cromatógrafo HPLC Jasco con detector de arreglo de diodos (DAD) e índice de refracción (IR) y una columna de exclusión iónica (Rezex™ ROA-Organic Acid H+ (8%), 300 x 7.8 mm), empleando como fase móvil ácido sulfúrico 5 mM con un flujo Isocrático de 0,5 mL, a una temperatura de 70°C y un volumen de inyección de 10  $\mu$ L, por duplicado. Se usó una longitud de onda de 210 nm para la detección de ácidos orgánicos y el IR para detectar azúcares. Se cuantificaron azúcares y ácidos orgánicos como mg por g de bebida (mg/g) usando estándar externo de glucosa (0,5 a 10 mg/mL,  $r^2=0,9986$ ), fructosa (0,5 a 10 mg/mL,  $r^2=0,9988$ ), ácido málico (5 a 250 mg/L,  $r^2=0,9903$ ) y ácido láctico (0,1 a 2 mg/mL,  $r^2=0,9969$ ).

### 3.2.4. Evaluación del almacenamiento en refrigeración de la bebida

Las bebidas fueron almacenadas a 4°C, luego de su fermentación por 24 h a 37°C, y se realizaron los ensayos especificados a continuación a los 0, 1, 7, 14, 21 y 28 días. Como control se utilizó la misma bebida, pero sin la inclusión del cultivo probiótico.

#### Evaluación de la viabilidad de VEGE 092 en la bebida durante su almacenamiento

Para la viabilidad del cultivo probiótico en la bebida durante el almacenamiento se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por conteo en placa por siembra en profundidad en agar MRS (Oxoid®), a los tiempos estipulados. Las placas fueron incubadas por 48 horas en condiciones de microaerobiosis a 37°C.

#### Cambios fisicoquímicos en la bebida durante su almacenamiento

A cada una de las bebidas se les determinó, por triplicado, el pH usando un potenciómetro Mettler Toledo SevenCompact, el cambio de color ( $\Delta E$ ) empleando un colorímetro Minolta CR-400 y la viscosidad usando un HAAKE Viscotester 550. La viscosidad aparente se reportó como la pendiente de la gráfica del esfuerzo vs el gradiente de velocidad usando un sensor de viscosidad media (MV) y un gradiente de velocidad de 0 a 1000 1/s en 10 min a 20°C.

Además, se determinó el contenido de glucosa, fructosa, ácido málico y ácido láctico en la bebida durante su almacenamiento por métodos cromatográficos como se describió en la sección 3.2.3.

#### Efecto del almacenamiento sobre el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos y la actividad antioxidante

Para la determinación del contenido de antocianinas en la bebida a lo largo de su almacenamiento, 3-5 g de bebida se extrajo con 3 mL de metanol con 1% de ácido fórmico durante 15 min en un baño de ultrasonido, centrifugando por 20 min a 1000 rpm (6000xg) tres veces, recuperando y combinando los sobrenadantes cada vez y llevando a 10 mL con el mismo solvente de extracción. Las antocianinas de dichos extractos se analizaron por métodos espectrofotométricos. Para el método de pH-diferencial, 3 mL del extracto se llevaron a 10 mL con buffer de pH 4,5 de acetato de sodio/HCl y otros 3 mL del extracto se llevaron a 10 mL buffer de pH 1 de KCl/HCl, con lo que la absorción real por parte de las antocianinas en la muestra se calculó según la Ecuación 3-3 (Horbowicz et al., 2008):

$$A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

**Ecuación 3-3**

Donde  $A_{\lambda_{\max}}$  es la absorbancia en la longitud de onda máxima (510 nm) y  $A_{700}$  es la absorbancia a 700 nm. El contenido de antocianinas se expresó como mg de equivalentes de cianidina-3-glucosido por 100g de bebida (mg C3G/100g), usando un coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) de 26900 L x cm<sup>-1</sup> x mol<sup>-1</sup> y un peso molecular (MW) de 449,2 g/mol (Pérez-Grijalva et al., 2018), en la Ecuación 3-4 teniendo en cuenta el factor de dilución (DF):

$$\frac{\text{mg C3GE}}{100\text{g}} = \frac{A}{\epsilon b} \times MW \times DF \times \frac{100\text{g}}{\text{g muestra}} \quad \text{Ecuación 3-4}$$

Los compuestos fenólicos fueron determinados por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante por el método de DPPH. Para esto, entre 2 a 3 g de bebida se extrajo con 4 mL de agua desionizada durante 2 min en vortex, centrifugando por 15 min a 1000 rpm (6000xg) dos veces recuperando y combinando los sobrenadantes cada vez y llevando a 10 mL con el mismo solvente de extracción.

Para la determinación de compuestos fenólicos se mezclaron 15 mL de agua desionizada, 1 mL de extracto y 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se contabilizaron 6 min luego de la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu y se adicionaron 3 mL de carbonato de sodio 20%. Posteriormente se incubó a 30°C por 2h. Al final de este periodo se midió la absorbancia de la solución a 765 nm. Se cuantificaron los compuestos fenólicos como mg ácido gálico por 100 g de bebida (mg GA/100g) usando estándar externo de ácido gálico (44 a 220 mg/L,  $r^2=0,999$ ).

Para la determinación de la actividad antioxidante se mezclaron 800  $\mu\text{L}$  de DPPH 0,1mM, 100  $\mu\text{L}$  de etanol y 100  $\mu\text{L}$  de extracto. La solución se mantuvo en la oscuridad y luego de 20 min de la adición del extracto se midió la absorbancia de la solución a 517 nm. Se cuantificó la actividad antioxidante como mg ácido gálico por 100 g de bebida (mg GA/100g) usando estándar externo de ácido gálico (4 a 22 mg/L,  $r^2=0,998$ ).

#### **Evaluación de la inocuidad microbiológica de la bebida durante su almacenamiento en refrigeración.**

Se realizaron los siguientes ensayos microbiológicos, según la resolución 3929 del 2013 (refrescos) y NTC 3549.

- Coliformes totales según el método NMP INVIMA N. 13. Se prepararon las diluciones adecuadas de la bebida en tubos con solución salina estéril y se pipetearon 1 mL de cada una de las diluciones en tubos con caldo lactosado bilis verde brillante (Oxoid®) al 2%, utilizando tres tubos por cada dilución, se agitaron los tubos y se incubaron a 37°C por 48 horas. Luego de 48 h se anotaron los tubos que mostraron producción de gas y se hizo una prueba de confirmación. Con la prueba de confirmación se determinó si los organismos identificados pertenecían al grupo de coliformes. Así, se realizó un sembrado por estría de cada uno de los tubos con producción de gas en la superficie de una placa de agar eosina azul de metileno (EMB) (Oxoid®) y se incubó a 35-37°C por 24 horas. Pasado este tiempo se hizo la lectura de las colonias típicas de coliformes y se anotó el número de tubos confirmados como positivos para organismos coliformes en cada dilución y se obtuvo el NMP.
- Recuento de mohos y levaduras según el método de recuento en placa INVIMA N. 7. Se prepararon las diluciones adecuadas de la bebida en tubos con solución salina estéril y se adicionó 1 mL de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de Petri y se adicionaron 15 mL de agar oxitetraciclina glucosa extracto de levadura (OGY) (Oxoid®) y se incubó a 22°C por 5-7 días. Luego de este tiempo se hizo el conteo en placa y se reportaron las



unidades formadoras de colonias/mL de bebidas (UFC/mL) teniendo en cuenta las diluciones evaluadas.

### 3.2.5. Análisis sensorial

Se realizó una prueba de aceptabilidad de la bebida con inclusión de probióticos y sin la inclusión de éstos. 90 panelistas no entrenados (54 mujeres y 36 hombres) evaluaron las dos muestras presentadas de manera aleatoria con códigos de tres dígitos en copas de plástico (15 mL). Adicionalmente, se les entregó agua potable para lavar el paladar entre muestras. Cada panelista evaluó la apariencia, el olor, la textura, el sabor y la aceptabilidad general de las muestras usando una escala hedónica de 7 puntos (7 - Me gusta extremadamente, 6 - Me gusta mucho, 5 - Me gusta, 4 - Ni me gusta ni me disgusta, 3 - Me disgusta, 2 - Me disgusta mucho, 1 - Me disgusta extremadamente). Adicionalmente, se les pidió a los panelistas identificar las frutas en el olor y sabor de las bebidas.

### 3.2.6. Análisis estadístico

Como análisis estadístico se hizo un análisis de varianza y prueba de Tukey con el 95% de confianza en el software libre R para determinar diferencias significativas. Para el análisis sensorial se realizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon con un 95% de confianza en el software libre R para determinar diferencias significativas.

## 3.3. Resultados y discusiones

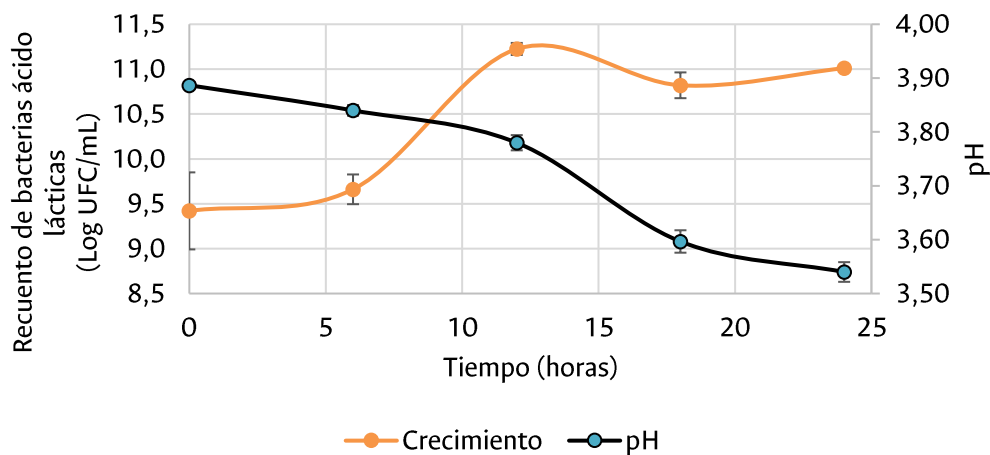
### 3.3.1. Evaluación de la cinética de fermentación de la bebida

La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias ácido lácticas (Harzallah & Belhadj, 2013), es decir, son bacterias Gram positivas, catalasa negativas, en forma de bacilos o cocos las cuales producen ácido láctico como producto final único o mayoritario en la fermentación de carbohidratos con un metabolismo anaerobio (Axelsson & Ahrné, 2000). Los microorganismos del cultivo conglomerado probiótico usado en el presente estudio, VEGE 092 (*P. pentosaceus*, *L. acidophilus* y *L. paracasei*), son considerados bacterias ácido lácticas, homofermentativas y ácido tolerantes (Anjum et al., 2014; Axelsson, 2004; Chiang & Pan, 2011). De esta forma, es probable que el cultivo probiótico VEGE 092 siga el camino fermentativo de la glicólisis de Embden-Meyerhof-Parnas, resultando en la producción casi exclusiva de ácido láctico bajo condiciones estándar (Axelsson, 2004).

Durante la fermentación del cultivo probiótico en la bebida de frutos rojos con inclusión de probióticos y prebióticos formulada, se observó un crecimiento exponencial entre las 0 y 12 horas, seguido de una fase estacionaria en donde no se observaron diferencias significativas en el recuento de microorganismos, alcanzando los  $11,01 \pm 0,01$  log UFC/mL para las 24 horas de fermentación, como se observa en la Gráfica 3-1. La velocidad máxima de crecimiento durante el periodo de la

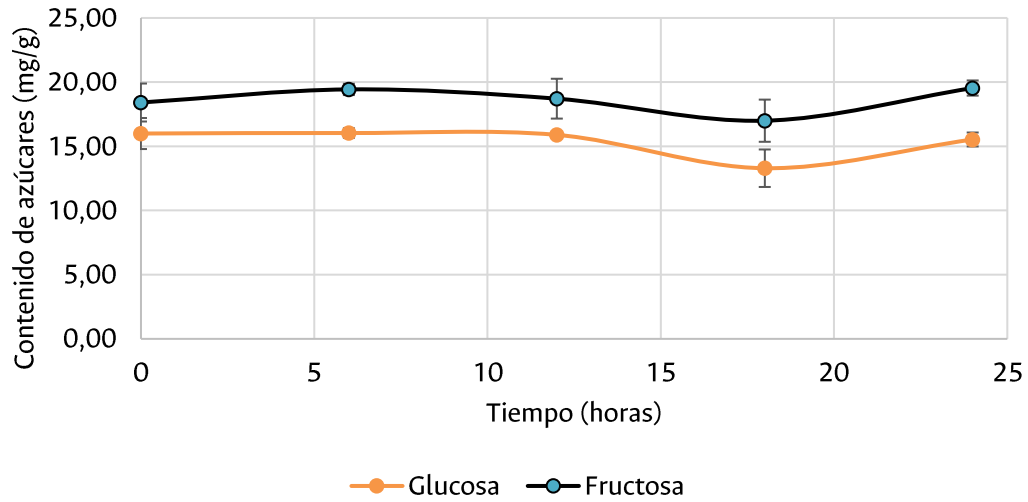
fase exponencial corresponde a un valor de  $0,33 \text{ h}^{-1}$  ( $r^2=0,989$ ), con un lapso entre dos duplicaciones sucesivas (tiempo de duplicación) de 2,1 h. Además, en las 24 horas de fermentación se dio un descenso del pH con diferencias estadísticas significativas, con una acidificación del 9% a una velocidad de  $0,016 \text{ h}^{-1}$  ( $r^2=0,943$ ), correspondiente a la pendiente de la gráfica de acidificación (Gráfica 3-1). Estos parámetros cinéticos pueden indicar un crecimiento y metabolismo lento pues Coman et al. (2018) reportan un tiempo de duplicación entre 1 y 1,5 horas en caldo MRS para cepas de *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, una mezcla de ambas y *L. plantarum*, incluso obtuvieron tiempos de duplicación similares al adicionar al caldo MRS extractos de frutas ricas en antocianinas como uva, ciruela y saúco.

**Gráfica 3-1:** Curva de crecimiento y acidificación del cultivo VEGE 092 en la bebida inoculada con adición de 1% de FOS.



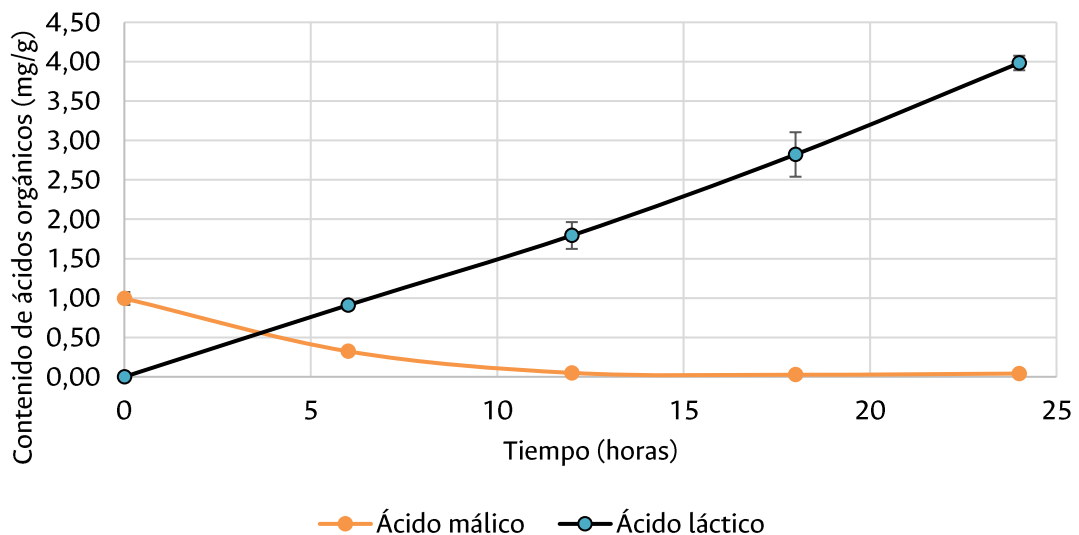
Respecto al consumo de carbohidratos durante la fermentación del cultivo probiótico en la bebida simbiótica, no se observaron diferencias significativas en el contenido de glucosa y fructosa en el sustrato a través del tiempo de fermentación (Gráfica 3-2). Estos resultados indican que la glucosa y la fructosa, aportadas por las frutas incluidas en la bebida, no son consumidas por el cultivo probiótico, lo que puede indicar el metabolismo del compuesto prebiótico (FOS) incluido en la bebida. Esto está de acuerdo con lo reportado en literatura donde se observa un consumo y crecimiento en medios con FOS por parte de cepas de *P. pentosaceus*, *L. acidophilus* y *L. paracasei* (de Figueiredo et al., 2020; Farias et al., 2019; Kaplan & Hutkins, 2003).

**Gráfica 3-2:** Contenido de glucosa y fructosa en el sustrato durante la fermentación de la bebida con adición de 1% de FOS empleando el cultivo probiótico VEGE 092.



En cuanto al contenido de ácido málico y ácido láctico en el sustrato, se observó una producción de ácido láctico con una velocidad de 0,1647 mg/h ( $r^2=0,9966$ ), correspondiente a la pendiente de la gráfica de contenido de ácido láctico (Gráfica 3-3), con lo que se produjeron  $3,98 \pm 0,09$  mg de ácido láctico por gramo de bebida en 24 horas de fermentación. Por su parte, se observó una disminución de la concentración de ácido málico, que indica un consumo de este ácido, con un comportamiento asintótico al alcanzar las 12 horas de fermentación, la velocidad de consumo fue de 0,079 mg/h ( $r^2=0,9444$ ), correspondiente a la pendiente entre 0 y 12 h de la gráfica de contenido de ácido málico (Gráfica 3-3), hasta alcanzar los  $0,04 \pm 0,01$  mg de ácido málico por gramo de bebida luego de 24 horas.

**Gráfica 3-3:** Contenido de ácido málico y ácido láctico en el sustrato durante la fermentación de la bebida con adición de 1% de FOS empleando el cultivo probiótico VEGE 092.



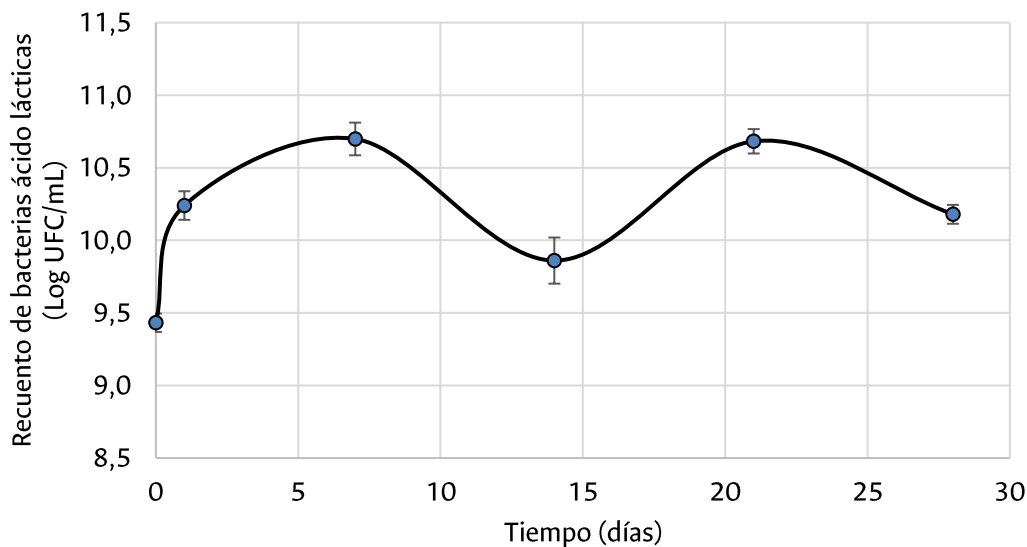
Algunas bacterias ácido lácticas, además de la fermentación de carbohidratos, también son capaces de llevar a cabo la fermentación malo-láctica, en donde se metaboliza el ácido málico produciendo ácido láctico y  $\text{CO}_2$  (Axelsson, 2004). La cofermentación de carbohidratos y ácido málico por parte de estas bacterias aumenta la velocidad de crecimiento, produce mayor energía para ser usado en el metabolismo bacteriano y genera una menor acidificación del medio pues el ácido málico presenta un pKa menor al ácido láctico, lo que hace al ácido málico un ácido más fuerte (Axelsson, 2004). Lo anterior explica el descenso de pH observado (Gráfica 3-1), donde el pH desciende de manera más lenta durante las primeras 12 h por el consumo de ácido málico de manera simultánea con la producción ácido láctico y a partir de las 12 h el descenso del pH es más rápido, donde solo se da la producción de ácido láctico.

### 3.3.2. Evaluación del almacenamiento en refrigeración de la bebida

#### Evaluación de la viabilidad de VEGE 092 en la bebida durante su almacenamiento

En la Gráfica 3-4 se muestra el número de microorganismos probióticos viables en la bebida inoculada a lo largo de su almacenamiento en condiciones de refrigeración. Se observó un crecimiento del cultivo probiótico hasta el día 7, luego de esto se observó un crecimiento fluctuante, en donde el conteo de microorganismos disminuye y vuelve a aumentar, alcanzándose  $10,2 \pm 0,1$  log UFC/mL a los 28 días de almacenamiento en refrigeración, lo cual es superior a la dosis mínima recomendada para proveer beneficios a la salud. También se observó un crecimiento de  $9,4 \pm 0,1$  a  $10,2 \pm 0,1$  log UFC/mL ( $0,8$  log UFC/mL) durante las 24 horas de fermentación, en comparación de un crecimiento de  $9,4 \pm 0,4$  a  $11,01 \pm 0,01$  log UFC/mL ( $1,6$  log UFC/mL) durante las 24 horas de fermentación evaluada con anterioridad (Gráfica 3-1), esto puede deberse a diferencias en el pH del sustrato como se discutirá más adelante.

**Gráfica 3-4:** Viabilidad de VEGE 092 en la bebida inoculada durante su almacenamiento.



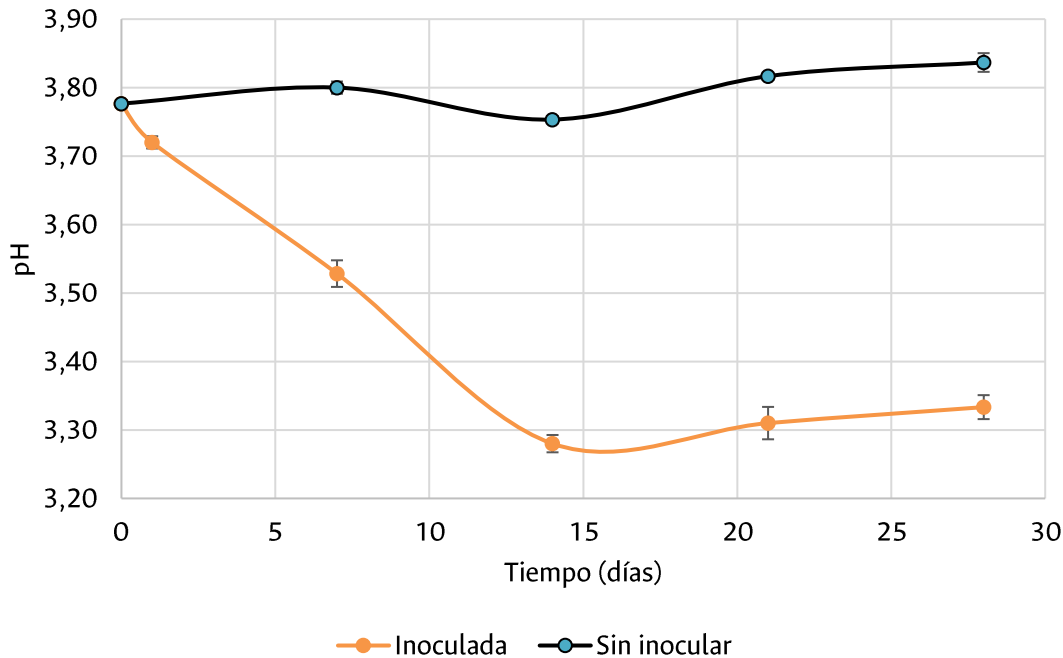
En el presente estudio no se observó una reducción de microorganismos probióticos, como se reporta en algunos de los estudios realizados en bebidas de frutas ricas en antocianinas inoculadas con probióticos si no un aumento de microorganismos al final de tiempo de almacenamiento en estudio. Por ejemplo, de Oliveira et al. (2020) desarrollaron una bebida probiótica no fermentada usando pulpa de banana, fresa y juçara (40%, 40% y 20%, respectivamente, y con un pH inicial de 4,0). En este estudio se encontró que una cepa de *L. acidophilus* mostró una reducción de la población de celular durante 90 días de almacenamiento en refrigeración, presentando una reducción de menos de 1 log CFU/mL durante los primeros 30 días, de casi 2 log CFU/mL para el día 60 y de más de 2 log CFU/mL para el día 90. Este mismo estudio reportó una tendencia similar al inocular cepas de *L. casei* y *L. plantarum* en la bebida descrita.

Por su parte, di Cagno et al. (2011) evaluaron la viabilidad de un cultivo conglomerado de bacterias ácido lácticas (*P. pentosaceus*, *L. plantarum* y *W. cibaria*) en una bebida fermentada de cereza, tomates, mora, ciruelas, uva y Aloe vera (26%, 8%, 5%, 31%, 20% y 10%, respectivamente, y con un pH inicial de 3,5) almacenada en refrigeración por 30 días. Este estudio observó un aumento en el número de células ácido lácticas al fermentar la bebida por 24 horas a 25°C y una conservación de esta población celular a los largo de su almacenamiento, con un descenso de solo 1,5 log UFC/mL, pero aun con un conteo superior al inóculo inicial, alcanzando los 8,0 log UFC/mL al final del almacenamiento. Por tanto, la fermentación de la bebida permite incrementar el conteo de microorganismos probióticos obteniéndose, como resultado, una mejor viabilidad que cuando no se hace el proceso fermentativo de las bebidas.

### **Cambios fisicoquímicos en la bebida durante su almacenamiento**

De la evaluación del cambio de pH durante el almacenamiento de las bebidas se observó un descenso del pH en la bebida inoculada con microorganismos probióticos en contraste con la bebida sin inocular, cuyos valores no presentaron diferencias significativas a lo largo del almacenamiento (Gráfica 3-5). En la bebida inoculada, el pH disminuye hasta el día 14, a partir del cual se estabiliza en un pH de 3,3. El día 14 corresponde al día en que se observó un descenso en el conteo de microorganismos probióticos en la bebida lo que puede implicar un efecto negativo en la viabilidad del microorganismo, sin embargo, se observa que el cultivo se adapta a estas condiciones y vuelve a crecer y el pH se estabiliza. De igual forma se observa un descenso en el pH menor al evidenciado en la evaluación de la cinética fermentación pasando de  $3,78 \pm 0,01$  a  $3,72 \pm 0,01$  en 24 horas de fermentación, en comparación a un cambio de  $3,89 \pm 0,01$  a  $3,54 \pm 0,01$  en 24 horas de fermentación en la evaluación de la cinética de fermentación.

**Gráfica 3-5:** Cambio de pH durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).

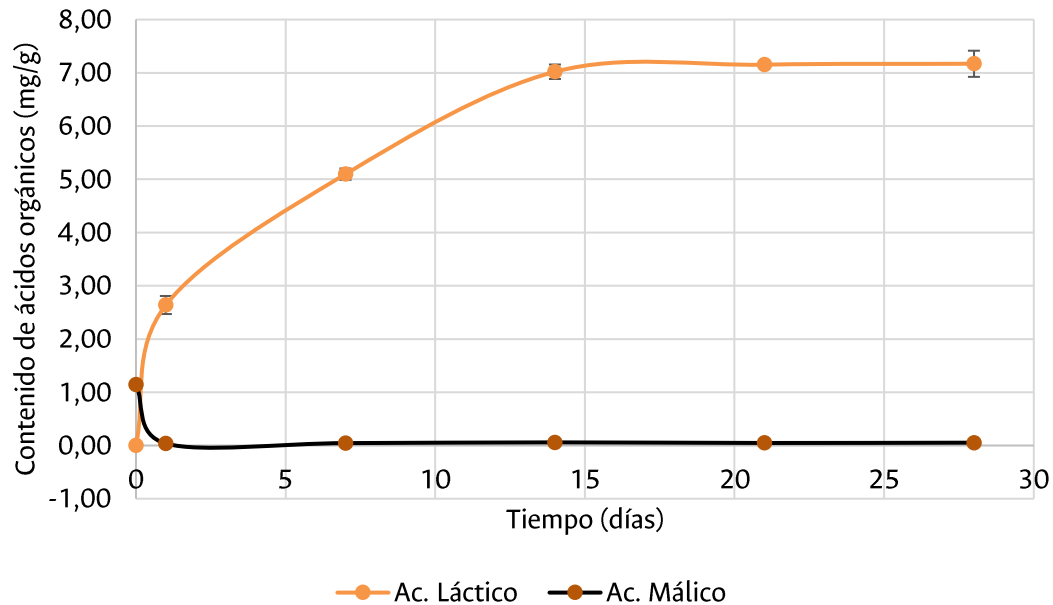


El pH es un factor que influye notablemente en la viabilidad de los cultivos probióticos en bebidas de frutas. Por ejemplo, Nematollahi et al. (2016) observaron una reducción en la viabilidad de cepas de *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. casei* en un jugo de cereza de pH 2,6, llegando a una población de cero a los 7 días de almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, al ajustar el pH del jugo a 3,5, la cepa *L. rhamnosus* perdió su viabilidad por completo después de 21 días de almacenamiento y una cepa de *L. casei* mantuvo su viabilidad hasta los 28 días de almacenamiento. Recientemente, Perjéssy et al. (2022) estudiaron la incorporación de cepas del género *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* y *L. fermentum*) como cultivos iniciadores de la fermentación ácido láctica de jugos de cereza, encontrando que el ajuste del pH inicial del jugo (3,01-3,34) hasta un pH más neutro (5,6) permite aumentar la viabilidad de los cultivos en casi una unidad logarítmica (de 7,47 a 8,25 log UFC/mL). Además, Reale et al. (2015) evidenciaron que cepas de *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. paracasei* presentan un buen crecimiento luego de 24 h de incubación a un pH de 3,5, con un incremento de biomasa superior a 0,4 OD<sub>595</sub> unidades y Wanna et al. (2021) reportan un conteo de microorganismos viables de 4-6 log UFC/mL de una cepa de *P. pentosaceus* en medio de cultivo con un pH de 3. Así, el pH inicial de la bebida fue adecuado para la incorporación del cultivo probiótico en estudio pues permitió obtener un buen conteo de microorganismos viables al final de 28 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

Por otro lado, el pH del medio también se vio afectado por el metabolismo del cultivo probiótico y viceversa. Más específicamente, se observó una producción de ácido láctico en la bebida inoculada con el cultivo probiótico en estudio hasta el día 14, luego de lo cual se mantuvo constante (Gráfica 3-6). Por otra parte, se observó un consumo de ácido málico hasta alcanzar los  $0,04 \pm 0,01$  mg de ácido málico por gramo de bebida en 24 horas de fermentación, luego de dicho tiempo este contenido

se mantuvo constante. Estas observaciones están de acuerdo con lo observado en el comportamiento de la cinética de fermentación (Gráfica 3-3).

**Gráfica 3-6:** Cambios en el contenido de ácido láctico y ácido málico durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092.

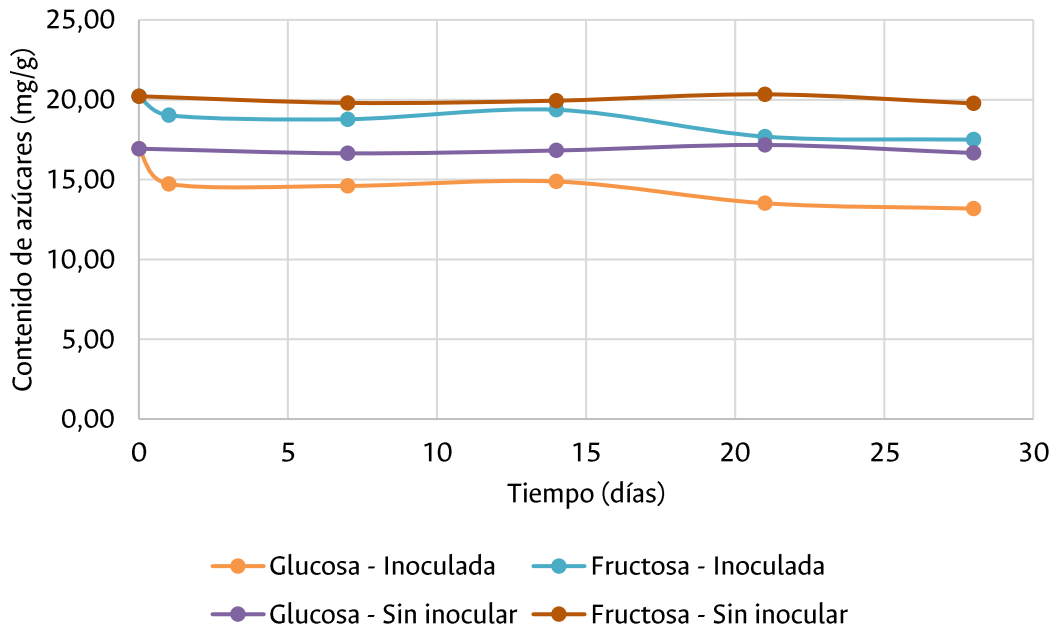


Adicionalmente, el metabolismo del cultivo probiótico pareció ser más lento cuando se realizó la evaluación de cambios fisicoquímicos en almacenamiento que al evaluar la cinética de fermentación pues, además de observar un descenso de pH y un crecimiento menor, se observó una producción de ácido láctico menor ( $2,64 \pm 0,01$  mg/g en comparación a  $3,98 \pm 0,09$  mg/g). Tanto para la evaluación de cambios fisicoquímicos en almacenamiento como para la evaluación de la cinética de fermentación se realizó una inoculación que permitió obtener un conteo inicial de microorganismo (hora 0) de  $9,4 \log$  UFC/mL. Sin embargo, el sustrato para la evaluación de cambios fisicoquímicos en almacenamiento tenía un pH inicial de  $3,78 \pm 0,01$ , mientras que para la evaluación de la cinética de fermentación el sustrato tenía un pH  $3,89 \pm 0,01$ , es decir, que el pH en el sustrato al evaluar los cambios fisicoquímicos en almacenamiento fue ligeramente menor. De esta forma el pH de la bebida, además de afectar la viabilidad del cultivo probiótico, afecta la cinética de fermentación. Así, el metabolismo del cultivo probiótico fue más lento a pH más bajo ( $3,78 \pm 0,01$ ). Lo anterior puede ser favorable pues genera menos cambios fisicoquímicos y sensoriales que puedan afectar la aceptabilidad del producto final.

En cuanto al contenido de fructosa y glucosa en las bebidas se observó que éstos se mantienen constante a lo largo del tiempo en la bebida sin inocular, sin presentar diferencias significativas a lo largo del almacenamiento (Gráfica 3-7). Por su parte, para la bebida inoculada se observó un ligero descenso inicial en el contenido de fructosa y glucosa durante las 24 horas de fermentación, luego se mantiene constante hasta el día 14, seguido de un descenso en su contenido. Sin embargo, esta tendencia no explica del todo la producción de ácido láctico, pues el posible consumo de glucosa solo se da en la fermentación y luego de 14 días. Generalmente se reporta un descenso en el contenido

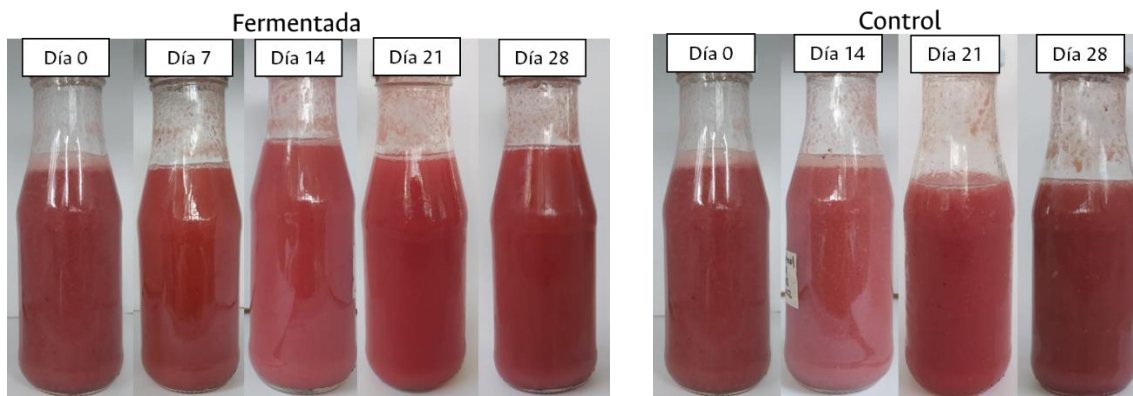
de azúcares, especialmente glucosa y fructosa, en este tipo de productos (di Cagno et al., 2011; Mousavi et al., 2011; Mustafa et al., 2019), estos resultados sugieren el consumo del compuesto prebiótico en la bebida durante los primeros 14 días como fuente energética con la consecuente producción de ácido láctico, como se discutió anteriormente. Así, la bebida desarrollada puede ser considerada como una bebida simbiótica con una buena viabilidad al final de su almacenamiento en refrigeración.

**Gráfica 3-7:** Cambios en el contenido de glucosa y fructosa durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).



La apariencia de las bebidas durante su almacenamiento en refrigeración se muestra en la Figura 3-1.

**Figura 3-1:** Registro fotográfico de las bebidas inoculada y sin inocular (control) durante su almacenamiento.

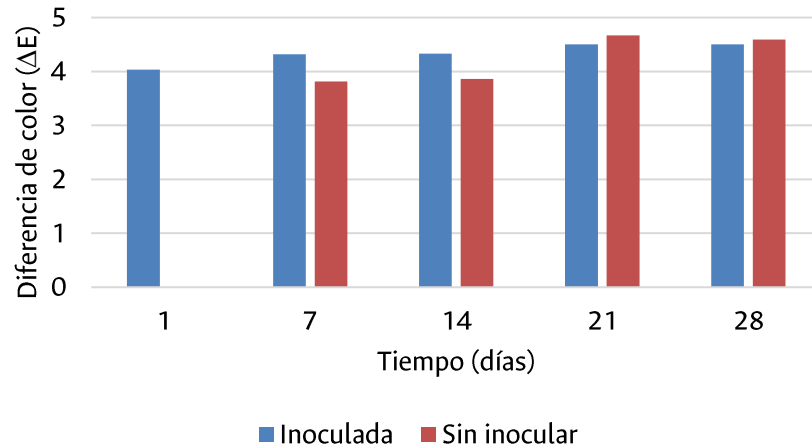


Durante el almacenamiento de las bebidas se observó un cambio de color, tanto para la bebida inoculada con el cultivo probiótico como la bebida sin inocular (control), con valores  $\Delta E$  respecto al día 0 superiores a 3,5, como se observa en la Gráfica 3-8. Lo anterior implica que, según Režek



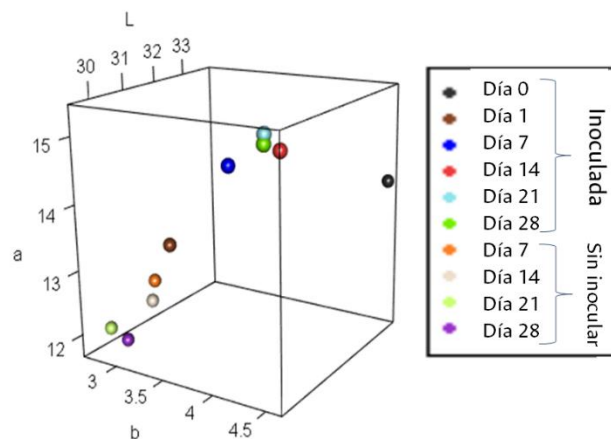
Jambrak, Šimunek, & Djekic (2018), el cambio de color observado en las bebidas es claramente distinguible.

**Gráfica 3-8:** Cambios en el color de la bebida inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control) durante 28 días de almacenamiento.



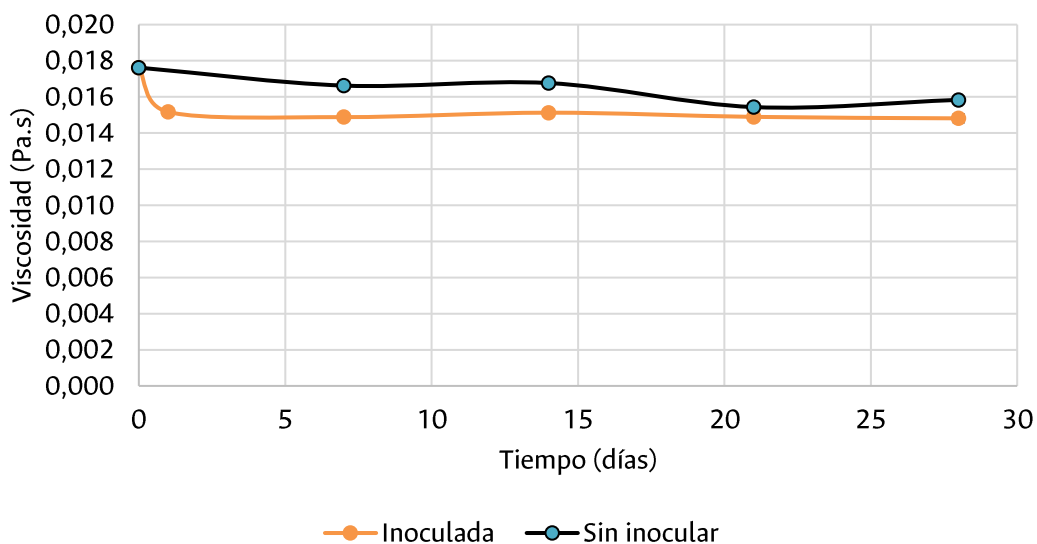
El cambio del color en el sistema CIELab se presenta la Gráfica 3-9. Se observa que incluso desde el día 1 y 7 se presentó un descenso en la variable de luminosidad para ambas bebidas. La bebida inoculada presentó un aumento en las coordenadas a y b, mientras que la bebida sin inocular presentó una disminución en ambas coordenadas. Lo anterior implica que la bebida inoculada permite conservar los tonos rojos y amarillos, en contraste con la bebida sin inocular, en la cual se observa una pérdida de estos tonos (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). Estos cambios de tonalidad en la bebida pueden ser observados en la Figura 3-1. Este resultado indica que la inclusión de los microorganismos probióticos tiene un efecto positivo en términos de la pigmentación y está probablemente relacionado con la acidificación provocada por el metabolismo de cultivo probiótico y el contenido de antocianinas, como se discutirá más adelante.

**Gráfica 3-9:** Representación gráfica del sistema CIELab de las bebidas inoculadas con VEGE 092 y sin inocular (control) a lo largo de su almacenamiento.



Respecto a la viscosidad de la bebida, se observó un ligero descenso en este parámetro en ambas bebidas a lo largo del tiempo de almacenamiento (Gráfica 3-10). El descenso de viscosidad fue mayor para la bebida inoculada con el cultivo probiótico, especialmente durante el proceso fermentativo, que para la bebida sin inocular. Esto pudo deberse al metabolismo del cultivo probiótico, el cual interactúa con los componentes en la bebida aportados por las frutas que aportan viscosidad a ésta, como lo son los carbohidratos, la fibra dietaria y los almidones (Giampieri et al., 2012; Kaume et al., 2011; Singh et al., 2016). No obstante, es interesante que luego de esta disminución inicial, a lo largo del tiempo de almacenamiento la viscosidad de la bebida con microorganismos probióticos se mantuvo constante, mientras que la viscosidad de la bebida sin inocular presentó más fluctuaciones, tal vez por las partículas en suspensión que se observan en esta bebida en específico, lo cual indica que la inclusión de los probióticos favoreció una mayor estabilidad reológica durante el almacenamiento.

**Gráfica 3-10:** Cambios en la viscosidad durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).

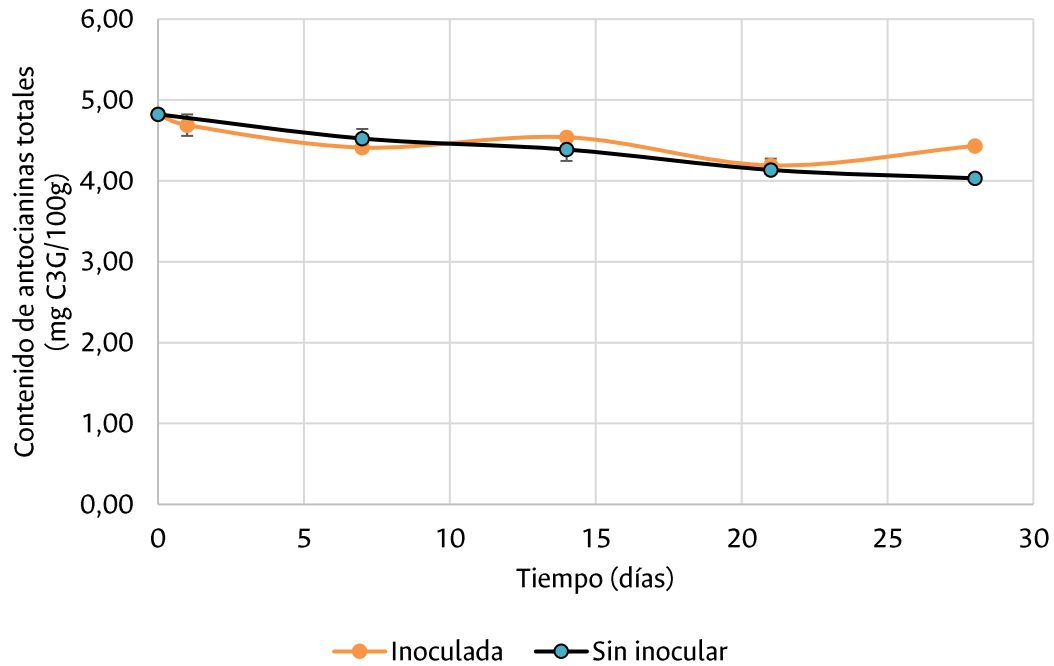


### **Efecto del almacenamiento sobre el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos y la actividad antioxidante**

En el contenido de antocianinas se observó un descenso similar en ambas bebidas durante los primeros 7 días de almacenamiento, pero a partir del día 14 la bebida inoculada con el cultivo probiótico mantuvo un contenido de antocianinas mayor, alcanzando los  $4,43 \pm 0,02$  mg C3G/100g (degradación del 8%), en comparación a los  $4,03 \pm 0,04$  mg C3G/100g (degradación del 16%) en la bebida sin inocular, como se ve en la Gráfica 3-11. Esto implica que la fermentación de la bebida favoreció la estabilidad de las antocianinas en almacenamiento. Esto se relaciona con el cambio de color discutido anteriormente: la pérdida del contenido de antocianinas provocó una disminución de los tonos rojos y amarillos en la bebida sin inocular, mientras que el valor de estos tonos aumentó en la bebida inoculada. También es de destacar que la fermentación de la bebida y la consecuente generación de ácido láctico protegió a las antocianinas frente a la degradación causadas por su

exposición a temperaturas de incubación (37°C). De esta forma, se observó un contenido de antocianinas luego de 24 horas de fermentación a 37°C de  $4,69 \pm 0,13$  mg C3G/100g (degradación del 3%) frente a un  $4,21 \pm 0,02$  mg C3G/100g (degradación del 13%) en una bebida sin inocular almacenada a 37°C por 24 horas.

**Gráfica 3-11:** Contenido de antocianinas totales durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).

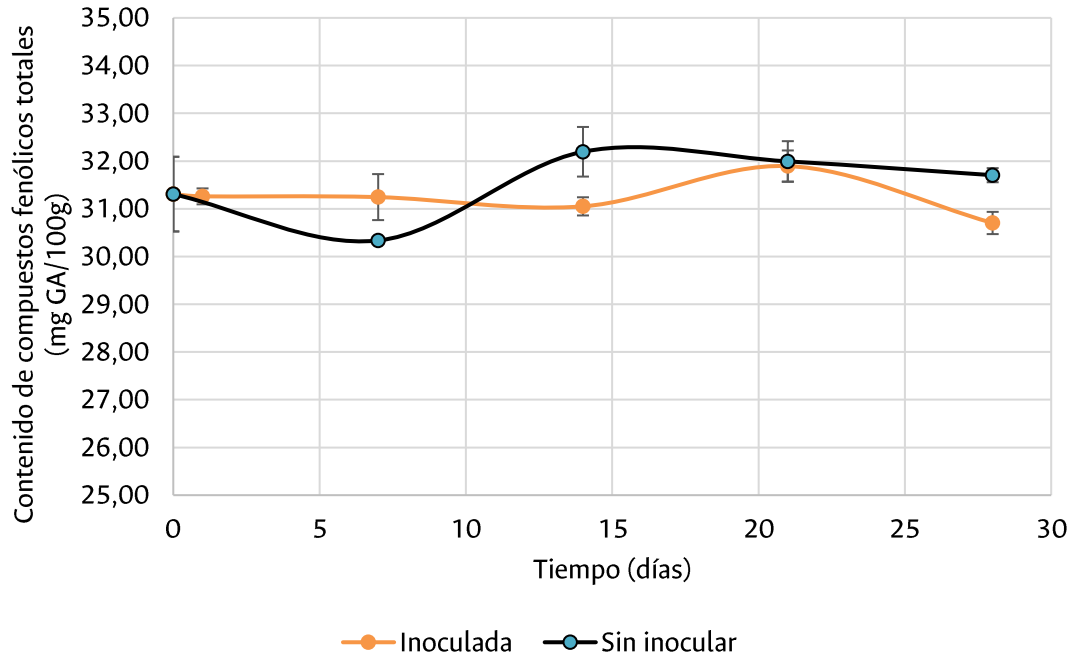


Como se mencionó anteriormente, la estabilidad de las antocianinas observada y el cambio en la coloración de la bebida se relacionan también con el descenso de pH observado en la bebida inoculada. Dependiendo del pH, las antocianinas pueden encontrarse bajo diferentes formas químicas, con diferentes coloraciones, donde un pH menor a 4 proporciona una mayor estabilidad en el tono del color que proporcionan las antocianinas (Ngamwonglumlert et al., 2017). Las antocianinas muestran su color más intenso a un pH de aproximadamente 1 cuando las moléculas se encuentran mayoritariamente en su forma ionizada (catión flavilio), a pH de 2 y 4 predomina la base quinoidal, de tonalidades azul-morado-rojo, y a pH de 5 y 6 se presentan especies incoloras (Varo Santos, 2019). En general, las configuraciones estructurales que llevan a incrementar la estabilidad en el pH también llevan a incrementar la estabilidad térmica (Fennema et al., 2008; Oancea, 2021). Luego, el procesamiento y almacenamiento a bajas temperaturas mejora la estabilidad de las antocianinas, induciendo una destrucción más lenta de los pigmentos (Ngamwonglumlert et al., 2017), como se evidenció en el presente estudio.

Algunas bacterias ácido lácticas encontradas en la microbiota intestinal humana son capaces de metabolizar las antocianinas (Jamar et al., 2017) y los metabolitos mayoritariamente generados son compuestos fenólicos como el ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatequico, ácido gálico, ácido vainílico y ácido siríngico (Tian et al., 2019). En el presente estudio no se observó una relación clara entre la fermentación de la bebida y el contenido de compuesto fenólicos. Se observó un aumento

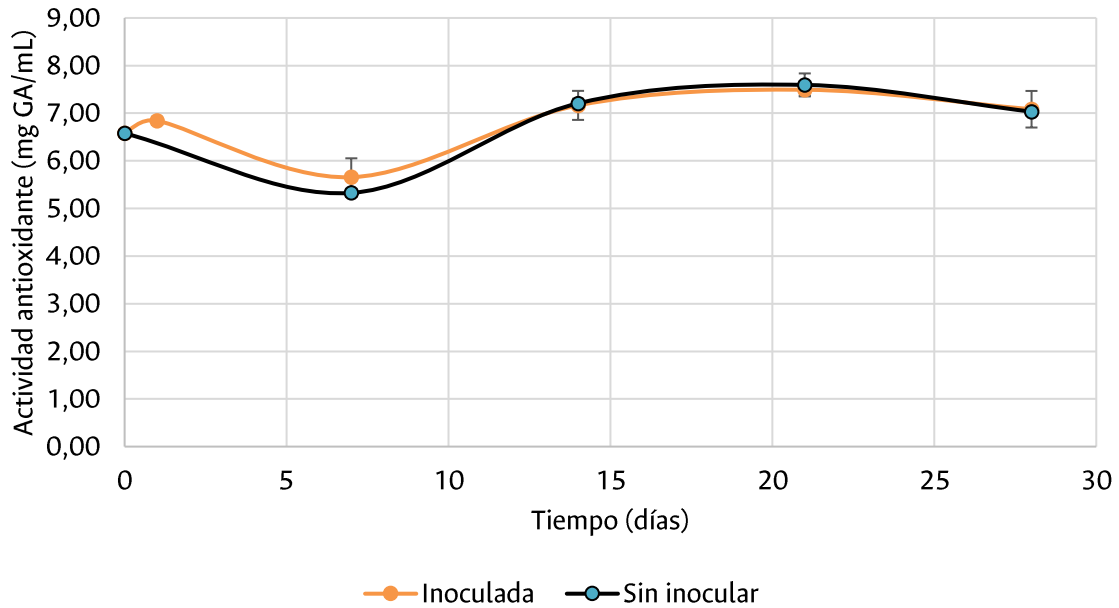
de compuestos fenólicos a partir del día 7 en la bebida sin inocular y un único aumento durante el día 21 en la bebida inoculada, como se observa en la Gráfica 3-12. El aumento en el contenido de compuestos fenólicos observado pudo deberse a la degradación de las antocianinas durante su almacenamiento, que también pudo generar el rompimiento del anillo antocianico y la consecuente generación de compuestos fenólicos más pequeños, más que al metabolismo de las antocianinas por parte del cultivo probiótico.

**Gráfica 3-12:** Contenido de compuestos fenólicos totales durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).



El contenido de antocianinas y compuestos fenólicos estuvo relacionado con la actividad antioxidante del producto. De hecho, se observó un aumento en la actividad antioxidante luego de la fermentación, pero sin diferencias significativas, a partir del día 7 en almacenamiento, como se observa en la Gráfica 3-13. Sin embargo, este aumento de la actividad antioxidante no parece obedecer al metabolismo del cultivo probiótico, pues la bebida sin inocular presentó resultados similares. Los valores de la actividad antioxidante, además de variar según la matriz y el procesamiento, también varía según el método empleado y hay diferentes maneras de presentar los resultados por lo que la comparación entre resultados es difícil de hacer. Sin embargo, según de Souza et al. (2014) se puede afirmar que las bebidas desarrolladas, ya sea inoculada o sin inocular, presentan una actividad antioxidante intermedia pues, 2-3 g de bebida, fueron capaces de inhibir el radical DPPH entre un 40 y 55% a lo largo de su almacenamiento.

**Gráfica 3-13:** Actividad antioxidante durante el almacenamiento de la bebida con adición de 1% de FOS inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).



A diferencia de los resultados encontrados en el presente estudio, varios estudios reportan la capacidad de metabolizar las antocianinas de varias cepas probióticas, generando un aumento en el contenido de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante. Coman et al. (2018) observaron una mayor actividad antioxidante, por DPPH, en extractos etanólicos ricos en antocianinas de frutos rojos (ciruela, uva y saúco) fermentados con cepas probióticas (*L. rhamnosus*, *L. paracasei*, una combinación de ambos y *L. plantarum*) que los extractos por sí solos, indicando la habilidad de estos probióticos para mejorar las propiedades antioxidantes de los extractos en estudio, además de estimular el crecimiento de las cepas probióticas. Por su parte, Yan et al. (2019) evaluaron el efecto de la fermentación por parte de microorganismos probióticos (cepas *L. rhamnosus* y *L. plantarum*) de una bebida de arándanos (polvo de arándanos en agua en relación 1:20) con un pH ajustado hasta 6,2, encontrando un incremento en el contenido de compuestos fenólicos (de 1,07 a 4,27 mg GA/mL), un descenso en el contenido de antocianinas (de 15,41 a 5,44  $\mu\text{g/mL}$ ) y un aumento en la actividad antioxidante, por FRAP (de 205,15 a 269,82 mM trolox) y TRP (de 489,00 a 662,86 mM trolox), de la bebida de arándanos fermentada. Wu et al. (2021) observaron un aumento en el conteo de células viables de tres cepas con potencial probiótico (*L. plantarum*, *S. thermophilus* y *B. bifidum*) al fermentar por 48 h jugos de mora y arándanos, con pH ajustado, así como un descenso de cerca del 30% en el contenido de cianidin-3-glucosido y peonidin-3-glucosido. Este estudio también observó un aumento en el contenido de ácido siríngico, ferúlico, gálico y láctico durante la fermentación y un descenso en el contenido de ácido p-cumarico, protocatecuico, clorogénico, cítrico y málico, así como un aumento en la actividad antioxidante por ABTS (de 40% a 60%).

Respecto a los efectos en el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del almacenamiento en condiciones de refrigeración, di Cagno et al. (2011) observaron que el contenido de compuestos fenólicos en una bebida de frutos rojos (26% cereza, 8% tomate, 5% mora, 31% ciruela, 20% uva y 10% Aloe vera) inoculada y sin inocular con una mezcla de

bacterias ácido lácticas (*P. pentosaceus*, *L. plantarum*, y *W. cibaria*) se mantuvo constante durante la fermentación y almacenamiento en refrigeración durante los primeros 15 días, luego de este tiempo se dio un descenso en su contenido, presentando la bebida inoculada con contenido de compuestos fenólicos ligeramente mayor. Este estudio también observó un descenso en la actividad antioxidante por el método de DPPH durante la fermentación y durante el almacenamiento de las bebidas, siendo mayor el descenso de la actividad antioxidante en la bebida sin inocular que en la inoculada.

A pesar de las observaciones de los anteriores estudios, el aumento en la actividad antioxidante de la bebida no necesariamente está relacionado con el metabolismo del cultivo probiótico, como se demostró en el presente estudio. El cultivo probiótico en estudio parece no metabolizar las antocianinas en la bebida, sin embargo, esto se puede deber a la disponibilidad de otros compuestos para su consumo como el prebiótico incorporado en la bebida, los azúcares y fibras aportados por las frutas, además de una posible interacción entre las antocianinas y las proteínas existentes en este tipo de bebidas que generan un efecto protector sobre éstas (Ávila et al., 2009). Con y sin metabolización de antocianinas, la inclusión de microorganismos probióticos para la obtención de bebidas de frutos ricos en antocianinas fermentadas ciertamente protege la degradación de las antocianinas durante el almacenamiento debido al descenso del pH, así como permite conservar mejor el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en este tipo de bebidas.

#### **Evaluación de la inocuidad microbiológica de la bebida durante su almacenamiento en refrigeración.**

Para verificar que la bebida desarrollada es adecuada para consumo, se evaluó su inocuidad durante el almacenamiento. Tanto la bebida inoculada con probióticos como la bebida sin inocular presentaron un conteo de coliformes totales/mL y un recuento de mohos y levaduras  $<3$  durante todo el tiempo de almacenamiento, lo que implica que las bebidas cumplen las condiciones microbiológicas y se mantienen inocuas, por lo menos, durante 28 días en almacenamiento en refrigeración. De este modo, los procesos de pasteurización y posterior inoculación (para el caso de la bebida fermentada) son adecuados para la producción de este tipo de productos y cumplen con la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia, para refrescos de frutas.

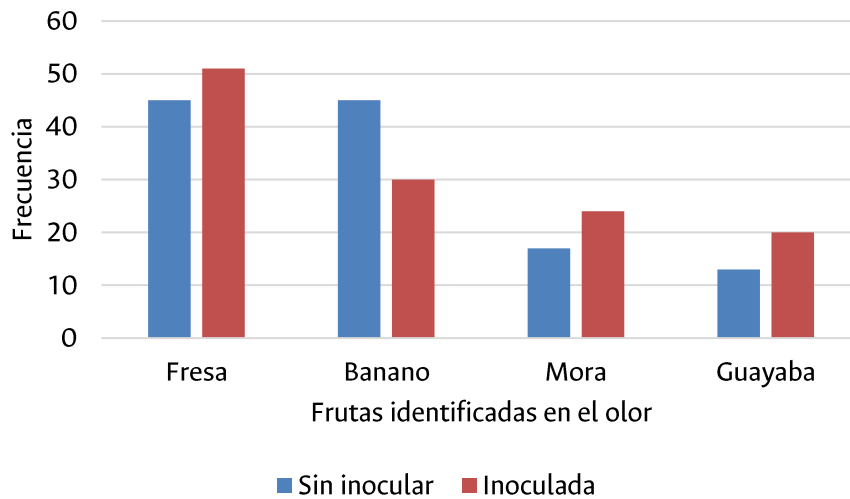
#### **3.3.3. Análisis sensorial**

De los atributos evaluados solo se presentaron diferencias significativas, usando una prueba de Wilcoxon con el 95% de confianza, en la apariencia de la bebida, prestando un promedio de 5,3 para la bebida inoculada con el cultivo probiótico y de 4,7 para la bebida sin inocular. Sin embargo, se puede decir que todos los atributos evaluados presentaron una mediana de 5 (equivalente a “me gusta”), por lo que tanto la bebida inoculada como la bebida sin inocular presentaron una buena aceptación en los atributos de apariencia, olor, textura, sabor y gusto general.

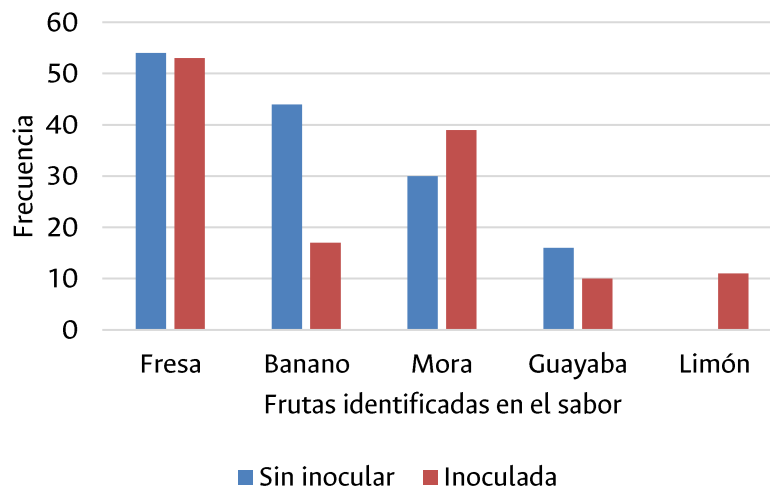
Adicionalmente, se quiso evidenciar qué sabores y olores eran más predominantes en las bebidas. De esta forma, se les solicitó a los panelistas identificar las frutas en el sabor y el olor de las bebidas,

dichos resultados se presentan en las Gráfica 3-14 y Gráfica 3-15. Las frutas mayormente identificadas en el olor y sabor son la fresa, banano, mora y guayaba. Al fermentar la bebida, el olor a fresa y mora se identificó con mayor frecuencia y el del banano con menor frecuencia. Un efecto similar se observó en el sabor, donde se identificó con mayor frecuencia el sabor a mora y con menos frecuencia el sabor a banano. Esto indica que en la bebida inoculada predominaron los sabores de frutos rojos esperados. El olor y sabor a guayaba identificados por algunos panelistas se puede atribuir a la similitud en apariencia de la bebida respecto a bebidas de esta fruta, lo cual pudo generar confusión en los panelistas, mientras que el sabor a limón identificado en la bebida inoculada se puede atribuir a la acidez causada por el ácido láctico producido durante la fermentación.

**Gráfica 3-14:** Frecuencia de frutas identificadas en el olor de la bebida inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).



**Gráfica 3-15:** Frecuencia de frutas identificadas en el sabor de la bebida inoculada con VEGE 092 y sin inocular (control).



### 3.4. Conclusiones

La bebida desarrollada mostró ser un vehículo adecuado para la incorporación y fermentación con el cultivo probiótico VEGE 092, el cual mantuvo una alta viabilidad hasta los 28 días de almacenamiento en refrigeración. El proceso fermentativo del cultivo probiótico permitió mejorar la viabilidad de estos microorganismos durante su almacenamiento. En este estudio se demostró que un pH inicial de la bebida entre 3,89 y 3,78, una temperatura de 37°C y un tiempo de fermentación de 24 h fueron adecuados para el desarrollo de este producto. La adición de los microorganismos probióticos favoreció una mayor estabilidad de la viscosidad y una conservación de las tonalidades características de las frutas durante el almacenamiento. Adicionalmente, la acidificación de la bebida, generada por el metabolismo del cultivo probiótico, fue favorable para la estabilidad de las antocianinas en la bebida en el periodo de almacenamiento en refrigeración, presentándose una degradación de solo el 8%, en comparación a un 16% en la bebida sin inocular. Tanto la bebida con inclusión de probióticos como la bebida sin su inclusión conservaron su contenido de compuestos fenólicos y aumentaron ligeramente su actividad antioxidante durante el almacenamiento, por lo que se concluye que este aumento en la actividad antioxidante no es atribuible a la incorporación del cultivo probiótico. A pesar de los cambios fisicoquímicos en la bebida inoculada, ésta obtuvo una buena aceptabilidad en cuanto a su apariencia, olor, textura, sabor y gusto general, predominando los sabores y olores a fresa y mora con un toque ácido, siendo dicha aceptabilidad similar a la de la bebida sin inocular. En suma, se desarrolló con éxito una bebida simbiótica empleando frutos ricos en antocianinas segura, funcional y con buena aceptabilidad, que cumple con la mínima dosis recomendada de microorganismos probióticos durante 28 días de almacenamiento.



# Conclusiones y recomendaciones

## Conclusiones

Las condiciones para la obtención de una bebida simbiótica a partir de matrices vegetales fuente de antocianinas fueron establecidas en el presente trabajo comparando la aptitud de pretratamientos térmicos y no térmicos (ultrasonido), seleccionando el tratamiento térmico como mejor opción para garantizar la calidad microbiológica y conservar las propiedades fisicoquímicas de la bebida. La bebida se desarrolló a partir de una formulación base con 7% de pulpa de mora, 8% de pulpa de fresa, 15% de pulpa de banano y 0,05% de goma xanthan, la cual permitió tener unas condiciones adecuadas de acidez (pH entre 4,0 y 3,7), así como un contenido significativo de antocianinas ( $4,43 \pm 0,02$  mg C3G/100g). Como cultivo probiótico y fibra prebiótica, se seleccionaron el conglomerado VEGE 092 (*P. pentosaceus*, *L. acidophilus* y *L. paracasei*) y la fibra prebiótica Orafiti® P95 (fructooligosacáridos), respectivamente, como resultado de la evaluación del índice y actividad prebiótica, cuyos resultados sugirieron un posible simbiotismo entre ambos. Con base en la evaluación de parámetros fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos, se seleccionó, para la formulación de la bebida una adición de 1% del ingrediente prebiótico y 1-2% de inóculo de cultivo probiótico VEGE 092. A fin de garantizar la inocuidad del producto, un tratamiento de pasteurización a 85°C por 5 min de la bebida con todos los ingredientes, previo a la inoculación del cultivo, demostró ser adecuado en términos de la reducción de la carga microbiológica inicial a niveles adecuados para una bebida. Para la inclusión del cultivo probiótico a la bebida, se encontró que una adaptación previa del mismo en un medio compuesto por caldo MRS y 10% de la bebida e incubado a 37°C durante una noche, seguido por la inoculación en la bebida y la inducción de un proceso fermentativo mediado por el cultivo probiótico por 24 h a 37°C, fue favorable para la viabilidad del cultivo probiótico, debido al crecimiento celular inicial.

El uso de tres estrategias para garantizar la viabilidad del cultivo probiótico seleccionado (a saber, adaptación, adición de prebióticos y uso de frutas menos ácidas) en la bebida formulada permitió obtener conteos superiores a 10 log UFC/mL del cultivo probiótico al final de 28 días de almacenamiento en refrigeración de la bebida, es decir, valores entre dos y tres órdenes de magnitud superiores a los mínimos establecidos para garantizar un efecto probiótico por el consumo del producto. Además, se determinó que el proceso fermentativo del cultivo probiótico en la bebida por 24 h a 37°C fue favorable, no solamente en términos de la viabilidad de los microorganismos probióticos, sino también para la conservación del contenido de antocianinas en el producto final, debido a la acidificación que este bioproceso induce en la bebida. Un bajo consumo de la glucosa y fructosa disponibles en la bebida durante la fermentación y el almacenamiento sugirió un consumo

de los FOS del prebiótico por parte de los microorganismos, lo cual constituye una evidencia adicional de simbiosis entre el cultivo probiótico VEGE 092 y el compuesto prebiótico Orafiti® P95, que se suma al índice y actividad prebiótica encontrados. La cinética de fermentación del cultivo probiótico se vio afectada por el pH de la bebida, donde un descenso de 0,1 unidades de pH redujo la velocidad de crecimiento y acidificación. Aun así, se comprobó que un pH inicial (previo a la fermentación) de 3,8 fue adecuado para el desarrollo de este producto, ya que no afectó la viabilidad del cultivo probiótico durante su almacenamiento, a pesar de la acidificación del medio, y permitió obtener una bebida con cambios fisicoquímicos, pero con una buena aceptabilidad frente a su apariencia, olor, textura, sabor y gusto general. Finalmente, se determinó que la inclusión de los microorganismos probióticos y la fermentación no fomentaron una disminución del contenido de compuestos fenólicos ni de la actividad antioxidante de la bebida.

Con esto es posible concluir que se desarrolló con éxito una bebida con potencial simbiótico (presencia de microorganismos probióticos y fibra prebiótica con varias evidencias de simbiosis), adaptable a dietas veganas, con contenido de antocianinas, inocua, con múltiples funcionalidades y con buena aceptabilidad, que cumple con la mínima dosis recomendada de microorganismos probióticos durante 28 días de almacenamiento. Además, la bebida desarrollada, bajo las condiciones establecidas, cumple con la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia para refrescos de frutas y la NTC 3549 que establece los requisitos y ensayos que deben cumplir las bebidas de frutas.

## Recomendaciones

Para el desarrollo de productos alimenticios similares se recomienda tener en cuenta las condiciones del proceso fermentativo como el pH, la temperatura y el tiempo de fermentación pues éstos permiten controlar el crecimiento del cultivo probiótico y la excesiva acidificación del medio, la cual pueda afectar negativamente la supervivencia del probiótico en el medio. A pesar de generar cambios fisicoquímicos, especialmente la acidificación del medio, se recomienda llevar a cabo un proceso fermentativo para permitir el crecimiento de los microorganismos probióticos y garantizar una buena viabilidad en almacenamiento.

Para explorar de manera más profunda el posible uso de ultrasonido como método de conservación en este tipo de productos se recomienda trabajar volúmenes pequeños, entre 50 y 200 mL, disminuir el diámetro de la sonda, entre 10 y 19 mm, y/o aumentar la temperatura, entre 40 a 60°C si se va a trabajar en bache, o emplear un método con ultrasonido en continuo donde se trabajan volúmenes pequeños de manera continua.

Finalmente, para poder etiquetar el producto como probiótico, prebiótico o simbiótico es necesario evaluar su supervivencia a lo largo de su paso por el sistema gastrointestinal y comprobar su funcionalidad y los beneficios a la salud del consumidor que puede proveer, ya sea por métodos *in vitro* o *in vivo*.

# **Anexos**

## **Anexo 1: Productos académicos**

### **Presentaciones**

- Presentación oral titulada “Development of an anthocyanin-rich fruit beverage with probiotic and prebiotic inclusion”. 11th International Conference on Nutrition and Food Sciences (ICNFS 2022). Septiembre 2-4 de 2022. Realizado en modalidad virtual.
- Presentación oral titulada “Desarrollo de una bebida natural con potencial simbiótico empleando frutos ricos en antocianinas”. III Simposio virtual de estudiantes y egresados en biotecnología y áreas afines. Septiembre 20-22 de 2022. Realizado en modalidad virtual.
- Presentación de poster titulada “Effect of thermal and non-thermal pretreatment on the physicochemical, sensory, microbiological, and bioactive features of an anthocyanin-rich beverage containing a prebiotic fiber” 10th Shelf Life International Meeting (SLIM 2022). Noviembre 28 – diciembre 1 de 2022. Realizado presencialmente en Bogotá

### **Artículos publicados**

- Marcela Palencia-Argel, Hawer Rodríguez-Villamil, Camila Bernal-Castro, Consuelo Díaz-Moreno & Carlos Alberto Fuenmayor (2022): Probiotics in anthocyanin-rich fruit beverages: research and development for novel synbiotic products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2022.2104806

## Anexo 2: Fichas técnicas de cepas probióticas comerciales

CULTURES DIVISION  
www.danisco.com

Página 1 / 2

Fecha de actualización: 26 de mayo de 2017

**DANISCO**

First you add knowledge...

### PRODUCT DESCRIPTION - PD 225973-5.0ES

Código del producto 1250491

**HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU**  
HOWARU® Premium Probiotics

#### Descripción

Cultivo concentrado liofilizado para inoculación directa en tina  
cultivo mono-cepa

#### Instrucciones de uso

Desinfectar el área de abertura con etanol (aprox. 70 %) antes de abrir el envase. Cortar y adicionar el cultivo a la leche bajo condiciones asepticas Hay que considerar que el total contenido del sobre tiene que aplicarse para asegurar la constante calidad del producto.  
No aceptamos ninguna responsabilidad en caso de aplicaciones indebidas.

#### Composición

Lactobacillus rhamnosus HN001

#### Características

Después de la proyección de importantes propiedades in vitro, HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU ha sido seleccionada a partir de 2000 cepas. La cepa se ha demostrado en varios estudios con animales y humanos para fortalecer los aspectos importantes del sistema inmune. La seguridad de HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU para el consumo humano fue asegurada por varios estudios in vitro y en animales.

#### Especificaciones microbiológicas

Control de calidad Microbiológico-metodos y valores estandar.

Recuento celular	>= 4.0E+12 CFU/bolsa**
Bacteria no ácido láctico	< 500 CFU/g
Enterobacterias	< 10 CFU/g
Levaduras y Moldes	< 10 CFU/g
Enterococci	< 100 CFU/g
Coagulase-positive staphylococci	< 10 CFU/g
Salmonella spp	neg. / 25 g
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g

Los métodos analíticos estan disponibles por la petición  
\*\* 1 DCU = 1.0E+11 CFU (Unidad Formadora de Colonias)

#### Almacenamiento

18 meses desde la fecha de producción a <=-18°C  
6 meses de la fecha de envase a +4°C

#### Embalaje

folio laminado PE,PET Al

#### Cantidad

Contenido >= 40 DCU / bolsita

#### Pureza y legislación

HOWARU® Rhamnosus LYO 40 DCU responde a las exigencias impuestas por la legislación de la Unión Europea.

Las regulaciones locales deben ser siempre consultadas en relación al estatus del producto, ya que la legislación sobre el uso del producto en alimentación puede variar de país en país.

#### Seguridad y manipulación

La ficha de seguridad está disponible bajo petición.

Los datos que se incluyen en esta publicación son el resultado de nuestros propios trabajos de investigación y desarrollo y son fiables, a nuestro leal saber y entender. No obstante, los usuarios deberían realizar sus propios ensayos para determinar la adecuación de nuestros productos a sus objetivos concretos y la situación legal para el uso previsto. La información aquí recogida no debe considerarse como garantía alguna, expresa o implícita, y no se acepta responsabilidad alguna por infracciones de ninguna patente.

CULTURES DIVISION  
www.danisco.com

Page 1 / 2

Valid from: October 16, 2019

**DANISCO**

First you add knowledge...

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 274560-3.0EN**

**Material no. 91092**

**DANISCO® VEGE 092 LYO 100 DCU**  
DANISCO® VEGE Cultures

**Description**

A blend of defined strains of lactic acid bacteria for direct vat inoculation and fermentation of plant-based food and beverages.

The culture is a freeze-dried powder.

**Usage levels**

Product	Dose
Vegetal/Plants	10 - 20 DCU / 100 l

The quantities of inoculation indicated should be considered as guidelines.  
We do not accept any liability in case of undue application.  
Supplement cultures may be required depending on technology, protein, fat content and product properties desired.

**Directions for use**

Sanitize sachet with chlorinated water or appropriate sanitizer before opening (blot dry with a paper towel if necessary to prevent clumping around sachet opening).

Once the sachet is open, pour the culture directly to the pasteurized mix.

Agitate for approximately 15 to 30 minutes on low speed to avoid foam and air introduction.

The whole content of the sachet has to be applied in order to guarantee constant product quality.

**Composition**

Pediococcus pentosaceus  
Lactobacillus paracasei  
Lactobacillus acidophilus (NCFM®)

**Microbiological specifications**

Microbiological quality control - standard values

Total cell count	>= 1.0E+13 cfu/sachet
Non-lactic acid bacteria	< 500 CFU/g
Enterobacteriaceae	< 10 CFU/g
Yeasts and Moulds	< 10 CFU/g
Enterococci	< 100 CFU/g
Clostridia Spores	< 10 CFU/g
Coagulase-positive staphylococci	< 10 CFU/g
Salmonella spp.	neg. / 25 g
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g

Analytical methods available upon request

**Storage**

12 months from date of production at <= 4°C

**Packaging**

Sachets made with three layers of material (polyethylene, aluminium, polyester).

**Quantity**

Selling unit: 1 carton containing 50 sachets.

**Purity and legal status**

DANISCO® VEGE 092 LYO 100 DCU meets the specification laid down by the EU legislation.

Local regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food may vary from country to country.

**Safety and handling**

SDS is available on request.

#####

## Anexo 3: Fichas técnicas de sustancias prebióticas

### Product Sheet

DOC.A4-03/003, Orafti®GR, 1/4



### Orafti®GR

- Description**
- Orafti®GR is a food ingredient consisting mainly of inulin derived from chicory. Orafti®GR is a GRanulated powder.
  - Inulin consists of oligo- and polysaccharides composed of fructose units linked together by  $\beta$ -(2,1)-linkages. Almost every fructose chain is terminated by a glucose unit. The number of fructose and glucose units in inulin (Degree of Polymerization = DP) ranges mainly between 2 and 60.

### Specifications

#### Physical and Chemical Parameters

Parameter	Limit	Unit	Reference method <sup>1</sup>	Frequency
Inulin	min 90	g/100 g d.m.	AOAC 997.08	Each batch <sup>2</sup>
Glucose + fructose + sucrose	max 10	g/100 g d.m.	AOAC 997.08	Each batch <sup>2</sup>
Dry matter (d.m.)	97 ± 2	g/100 g	Vacuum (<35 mbar, 70 °C, 20 h)	Each batch
pH (10 g/100 g)	6 ± 1		Potentiometric (20 °C)	Each batch
Conductivity (15 g/100 g)	max 250	µS/cm	ICUMSA GS2/3/9-17, adapted	Each batch
Ash (sulphated)	max 0.2	g/100 g d.m.	ICUMSA GS3/4/7/8-11, adapted	Monitoring
Arsenic (total)	max 0.03	mg/kg	ICP-MS	Monitoring
Lead	max 0.02	mg/kg	ICP-MS	Monitoring
Mercury	max 0.01	mg/kg	ICP-MS	Monitoring
Cadmium	max 0.01	mg/kg	ICP-MS	Monitoring

<sup>1</sup> or validated equivalent

<sup>2</sup> CoA: % carbohydrates (HPLC)



## Product Sheet

DOC-A4-02/005, Orafit®ST-Gel, 1/4



## Orafit®ST-Gel

- Description**
- Orafit®ST-Gel is a food ingredient consisting mainly of inulin derived from chicory. Orafit®ST-Gel is a special instant powder.
  - Inulin consists of oligo- and polysaccharides composed of fructose units linked together by  $\beta$ -(2,1)-linkages. Almost every fructose chain is terminated by a glucose unit. The number of fructose and glucose units in inulin (Degree of Polymerization = DP) ranges mainly between 2 and 60.

## Specifications

### Physical and Chemical Parameters

Parameter	Limit	Unit	Reference method <sup>1</sup>	Frequency
Inulin	min 90	g/100 g d.m.	AOAC 997.08	Each batch <sup>2</sup>
Glucose + fructose + sucrose	max 10	g/100 g d.m.	AOAC 997.08	Each batch <sup>2</sup>
Dry matter (d.m.)	97 ± 2	g/100 g	Vacuum (<35 mbar, 70 °C, 20 h)	Each batch
pH (10 g/100 g)	6 ± 1		Potentiometric (20 °C)	Each batch
Conductivity (15 g/100 g)	max 250	µS/cm	ICUMSA GS2/3/9-17, adapted	Each batch
Ash (sulphated)	max 0.2	g/100 g d.m.	ICUMSA GS3/4/7/8-11, adapted	Monitoring
Arsenic (total)	max 0.03	mg/kg	ICP-MS	Monitoring
Lead	max 0.02	mg/kg	ICP-MS	Monitoring
Mercury	max 0.01	mg/kg	ICP-MS	Monitoring
Cadmium	max 0.01	mg/kg	ICP-MS	Monitoring

<sup>1</sup> or validated equivalent

<sup>2</sup> CoA: % carbohydrates (HPLC)

# Hoja de Especificaciones

## Orafti® P95

DOC/CHA3-04\*10/11

### Especificación

#### Descripción

- Orafti® P95**
- es un polvo que contiene principalmente oligofruktosa producida por hidrólisis enzimática parcial de inulina de achicoria.
  - es un ingrediente alimenticio compuesto de oligofruktosa, fructosa, glucosa y sacarosa.
- Oligofruktosa**
- es una mezcla de oligosacáridos compuestos de unidades de fructosa unidas entre sí mediante enlaces β(2-1). Parte de estas moléculas terminan con una unidad de glucosa. El recuento de unidades de fructosa o glucosa (=grado de polimerización o DP) de la gama de inulinas de achicoria se halla principalmente entre 2 y 8.

#### Especificaciones de composición

Métodos analíticos: ver nuestros folletos técnicos.

Oligofruktosa*	≥ 93.2 g/100g
Glucosa + fructosa + sacarosa*	≤ 6.8 g/100g
Materia seca (grav.)	(97 ± 2) g/100g
Contenido en carbohidratos*	> 99.5 g/100g
Cenizas (sulfatadas)*	< 0.2g/100g
Conductividad (w = 28g/100g)	< 250 µS/cm
Metales pesados*	Pb ≤ 0.02 mg/kg As ≤ 0.03 mg/kg Cd, Hg cada uno ≤ 0.01 mg/kg
pH (w = 50G/100G DM)	5.0 a 7.0

\* expresados sobre materia seca (grav.).

#### Especificaciones microbiológicas

Todos los valores se expresan sobre materia seca.

Métodos analíticos: ver nuestros folletos técnicos.

Aerobios mesófilos – recuento total	max. 1000 cfu por g
Levaduras	max. 20 cfu por g
Mohos	max. 20 cfu por g
Esporas aerobias termófilas	max. 1000 cfu por g
Esporas termófilas anaeróbicas productoras de H <sub>2</sub> S	max. 25 cfu por g
Enterobacteriaceae	negativo en 1g
Bacillus cereus	max. 100 cfu por g
Staphilococci coagulasa positivo	negativo en 0.1 g
Escherichia coli	negativo en 1g
Clostridia	negativo en 1g
Salmonella	negativo en 250g
Listeria	negativo en 25g



## Bibliografía

- Aadil, R., Zeng, X., Han, Z., & Sun, D. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, *141*(3), 3201–3206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.008>
- Ah-Hen, K., Mathias-Rettig, K., Gómez-Pérez, L., Riquelme-Asenjo, G., Lemus-Mondaca, R., & Muñoz-Fariña, O. (2018). Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity in murta (*Ugni molinae* T.) berries juices. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(1), 602–615. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9673-4>
- Alqurashi, R., Alarifi, S., Walton, G., Costabile, A., Rowland, I., & Commane, D. (2017). In vitro approaches to assess the effects of açai (*Euterpe oleracea*) digestion on polyphenol availability and the subsequent impact on the faecal microbiota. *Food Chemistry*, *234*, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.164>
- Alves Filho, E., Cullen, P., Frias, J., Bourke, P., Tiwari, B., Brito, E., Rodrigues, S., & Fernandes, F. (2016). Evaluation of plasma, high-pressure and ultrasound processing on the stability of fructooligosaccharides. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(9), 2034–2040. <https://doi.org/10.1111/IJFS.13175>
- Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., & Momin, A. (2014). *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(9), 1241–1251. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.621169>
- Ashaolu, T. (2020). Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *130*, 110625. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110625>
- Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & Pascual-Teresa, S. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and *Lactobacillus*. *Food Research International*, *42*(10), 1453–1461. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.07.026>
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In S. Salminen & A. von Wright (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780824752033/LACTIC-ACID-BACTERIA-SEPPO-SALMINEN-ATTE-VON-WRIGHT>

- Axelsson, L., & Ahrné, S. (2000). Lactic Acid Bacteria. In F. G. Priest & M. Goodfellow (Eds.), *Applied Microbial Systematics* (pp. 367–388). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-4020-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4020-1_13)
- BCC Research. (2022, June). Global Functional Foods and Beverages Market Size Analysis Report. <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/functional-food-market.html>
- Bernal Castro, C., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista Chile Nutricion*, 44(4), 383–392. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400383>
- Bernal-Castro, C., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés, C. (2019). Inclusion of prebiotics on the viability of a commercial *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* culture in a tropical fruit beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 987–994. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-03565-w>
- Bhadekar, R., & Bhola, J. (2019). Nonconventional Preservation Techniques: Current Trends and Future Prospects. In *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages: Volume 15: The Science of Beverages* (Vol. 15, pp. 115–147). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00004-5>
- Bhat, R., Kamaruddin, N., Min-Tze, L., & Karim, A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1295–1300. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.04.002>
- Biswas, D., Wideman, N., O'Bryan, C., Muthaiyan, A., Lingbeck, J., Crandall, P., & Ricke, S. (2012). Pasteurized blueberry (*vaccinium corymbosum*) juice inhibits growth of bacterial pathogens in milk but allows survival of probiotic bacteria. *Journal of Food Safety*, 32(2), 204–209. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00369.x>
- Boto-Ordóñez, M., Urpi-Sarda, M., Queipo-Ortuño, M., Tulipani, S., Tinahones, F., & Andres-Lacueva, C. (2014). High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: A randomized clinical trial. *Food and Function*, 5(8), 1932–1938. <https://doi.org/10.1039/c4fo00029c>
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutienė, I., Stackevičenė, E., Nikolajevs, L., & Janulis, V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits - PubMed. *Acta Polonicae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 66(4), 399–408. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19702172/>
- Canuto, G., Oliveira, D., da Conceição, L., Farah, J., & Tavares, M. (2016). Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, 192, 566–574. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.06.095>

- Cassani, L., Tomadoni, B., & del Rosario Moreira, M. (2020). Green ultrasound-assisted processing for extending the shelf-life of prebiotic-rich strawberry juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(15), 5518–5526. <https://doi.org/10.1002/JSFA.10604>
- Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S., Cueto-Wong, M., & Ramos-Clamont, G. (2019). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22(0), 1–17. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173>
- Cervantes-Elizarrarás, A., Piloni-Martini, J., Ramírez-Moreno, E., Alanís-García, E., Güemes-Vera, N., Gómez-Aldapa, C., Zafra-Rojas, Q., & Cruz-Cansino, N. (2017). Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 371–379. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.06.009>
- Charoux, C., Inguglia, E., O'Donnell, C., & Tiwari, B. (2019). Ultrasonic Waves: Inactivation of Foodborne Microorganisms Using Power Ultrasound. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22930-2>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, G., Li, C., & Chen, K. (2016). Fructooligosaccharides: A Review on Their Mechanisms of Action and Effects. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 48, pp. 209–229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63602-7.00006-0>
- Cheng, L., Soh, C., Liew, S., & Teh, F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104(4), 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.001>
- Chiang, S., & Pan, T. (2011). Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 903–916. <https://doi.org/10.1007/S00253-011-3753-X>
- Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural Product Communications*, 6(1), 149–156. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600136>
- Coman, M., Oancea, A., Verdenelli, M., Cecchini, C., Bahrim, G., Orpianesi, C., Cresci, A., & Silvi, S. (2018). Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. *European Food Research and Technology*, 244(4), 735–745. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2997-9>
- Costa, M., Fonteles, T., de Jesus, A., & Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product

- stability. *Food Chemistry*, 139(1–4), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.059>
- Cummings, J., Macfarlane, G., & Englyst, H. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 415s–420s. <https://doi.org/10.1093/AJCN/73.2.415S>
- Cunningham, M., Azcarate-Peril, M., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Petrova, M., Steinert, R., Swanson, K., van Sinderen, D., Vulevic, J., & Gibson, G. (2021). Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 29(8), 667–685. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2021.01.003>
- D’Amico, D., Silk, T., Wu, J., & Guo, M. (2006). Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69(3), 556–563. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.3.556>
- de Figueiredo, F., de Barros Ranke, F., & de Oliva-Neto, P. (2020). Evaluation of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides on digestive enzymes hydrolysis and as a nutrient for different probiotics and *Salmonella typhimurium*. *LWT*, 118, 108761. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108761>
- de Oliveira, A., dos Santos, F., Olbrich, K., Martins, V., Castro, D., Pessanha, M., Conte, C., de Oliveira, S., de Oliveira, L., de Oliveira, R., & Miranda, E. (2020). Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. *LWT*, 118, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756>
- de Souza, E., Rodrigues, T., dos Santos, A., Lacerda, N., & de Brito, J. (2018). Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1645–1659. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425285>
- de Souza, V., Pereira, P., da Silva, T., de Oliveira Lima, L., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.125>
- di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C., de Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28(5), 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.011>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Novellino, E., Daliu, P., & Santini, A. (2019). Fruit-based juices: Focus on antioxidant properties—Study approach and update. *Phytotherapy Research*, 33(7), 1754–1769. <https://doi.org/10.1002/ptr.6380>
- Ercan, S., & Soysal, Ç. (2013). Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science*, 5, 5–13. <https://doi.org/10.4236/ns.2013.58A2002>

- Ertan, K., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2020). Color and stability of anthocyanins in strawberry nectars containing various co-pigment sources and sweeteners. *Food Chemistry*, *310*, 125856. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125856>
- Faria, A., Fernandes, I., Norberto, S., Mateus, N., & Calhau, C. (2014). Interplay between anthocyanins and gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(29), 6898–6902. <https://doi.org/10.1021/jf501808a>
- Farias, D., Fernandes, F., Neri-Numa, I., & Pastore, G. (2019). Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology*, *93*, 23–35. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.09.004>
- Feng, X., Zhou, Z., Wang, X., Bi, X., Ma, Y., & Xing, Y. (2020). Comparison of High Hydrostatic Pressure, Ultrasound, and Heat Treatments on the Quality of Strawberry–Apple–Lemon Juice Blend. *Foods*, *9*(2), 218. <https://doi.org/10.3390/FOODS9020218>
- Fennema, O., Parkin, K., & Damodaran, S. (2008). *Fennema's Food Chemistry* (4th ed.). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Fernandes, A., & Rodrigues, S. (2018). Turning Fruit Juice Into Probiotic Beverages. In *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis* (pp. 279–287). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00015-1>
- Ferrario, M., Alzamora, S., & Guerrero, S. (2015). Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. *Food Microbiology*, *46*, 635–642. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.06.017>
- Figuroa-González, I., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. *Food Science and Technology*, *39*(3), 747–753. <https://doi.org/10.1590/fst.07318>
- Flach, J., van der Waal, M., van den Nieuwboer, M., Claassen, E., & Larsen, O. (2017). The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(15), 2570–2584. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1334624>
- Flores, G., Ruiz del Castillo, M., Costabile, A., Klee, A., Bigetti Guergoletto, K., & Gibson, G. (2015). In vitro fermentation of anthocyanins encapsulated with cyclodextrins: Release, metabolism and influence on gut microbiota growth. *Journal of Functional Foods*, *16*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.022>
- Fonteles, T., Costa, M., de Jesus, A., Fontes, C., Fernandes, F., & Rodrigues, S. (2013). Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(10), 2860–2869. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0962-y>

- Fратиани, F., Cardinale, F., Russo, I., Iuliano, C., Tremonte, P., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2014). Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae boulardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Microencapsulation*, *31*(3), 299–305. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.871361>
- Freitas, H., dos Santos, A., Rodrigues, S., Abreu, V., Narain, N., Lemos, T., Gomes, W., & Pereira, A. (2021). Synbiotic açai juice (*Euterpe oleracea*) containing sucralose as noncaloric sweetener: Processing optimization, bioactive compounds, and acceptance during storage. *Journal of Food Science*, *86*(3), 730–739. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15617>
- Gabriel, A. (2014). Inactivation behaviors of foodborne microorganisms in multi-frequency power ultrasound-treated orange juice. *Food Control*, *46*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.05.012>
- Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of Ultrasound in Food Science and Technology: A Perspective. *Foods*, *7*(164). <https://doi.org/10.3390/foods7100164>
- Gancel, A., Feneuil, A., Acosta, O., Pérez, A., & Vaillant, F. (2011). Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Research International*, *44*(7), 2243–2251. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.06.013>
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J., Quiles, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, *28*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2011.08.009>
- Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R., Salminen, S., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K., Cani, P., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *14*(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G., & Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, *77*(4), 412–420. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1994.TB03443.X>
- Gomes, W., Tiwari, B., Rodriguez, Ó., de Brito, E., Fernandes, F., & Rodrigues, S. (2017). Effect of ultrasound followed by high pressure processing on prebiotic cranberry juice. *Food Chemistry*, *218*, 261–268. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.132>
- Guergoletto, K., Costabile, A., Flores, G., Garcia, S., & Gibson, G. (2016). In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. *Food Chemistry*, *196*, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.048>
- Guimarães, J., Silva, E., Alvarenga, V., Costa, A., Cunha, R., Sant'Ana, A., Freitas, M., Meireles, M., & Cruz, A. (2018). Physicochemical changes and microbial inactivation after high-intensity ultrasound processing of prebiotic whey beverage applying different ultrasonic power

- levels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 251–260. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.02.012>
- Halkman, H., & Halkman, A. (2014). Indicator Organisms. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition, pp. 358–363). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00396-7>
- Han, D., Shi, R., Yan, Q., Shi, Y., Ma, J., & Jiang, Z. (2021). Global transcriptomic analysis of functional oligosaccharide metabolism in *Pediococcus pentosaceus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(4), 1601–1614. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11120-5>
- Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50732>
- Herrera, M., Gao, J., Vasanthan, T., Temelli, F., & Henderson, K. (2016).  $\beta$ -Glucan content, viscosity, and solubility of Canadian grown oat as influenced by cultivar and growing location. *Canadian Journal of Plant Science*, 96(2), 183–196. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2014-0440/ASSET/IMAGES/CJPS-2014-0440TAB6.GIF>
- Hesam, F., Tarzi, B., Honarvar, M., & Jahadi, M. (2020). Valorization of sugarcane bagasse to high value-added xylooligosaccharides and evaluation of their prebiotic function in a synbiotic pomegranate juice. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01095-0>
- Hidalgo, G., & Almajano, M. (2017). Red fruits: Extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: A review. *Antioxidants*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
- Hidalgo, M., Oruna-Concha, M., Kolida, S., Walton, G., Kallithraka, S., Spencer, J., Gibson, G., & de Pascual-Teresa, S. (2012). Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), 3882–3890. <https://doi.org/10.1021/jf3002153>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B., Morelli, L., Canani, R., Flint, H., Salminen, S., Calder, P., & Sanders, M. (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hu, J., Zhang, L., Lin, W., Tang, W., Chan, F., & Ng, S. (2021). Review article: Probiotics, prebiotics and dietary approaches during COVID-19 pandemic. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.009>

- Huebner, J., Wehling, R., Parkhurst, A., & Hutkins, R. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, *18*(3), 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.08.013>
- Hurtado-Romero, A., del Toro-Barbosa, M., Garcia-Amezquita, L., & García-Cayuela, T. (2020). Innovative technologies for the production of food ingredients with prebiotic potential: Modifications, applications, and validation methods. *Trends in Food Science & Technology*, *104*, 117–131. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.08.007>
- Igwe, E., Charlton, K., Probst, Y., Kent, K., & Netzel, M. (2019). A systematic literature review of the effect of anthocyanins on gut microbiota populations. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, *32*(1), 53–62. <https://doi.org/10.1111/jhn.12582>
- Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., & Medvidović-Kosanović, M. (2007). Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, *103*(8), 369–378.
- Jamar, G., Estadella, D., & Pisani, L. (2017). Contribution of anthocyanin-rich foods in obesity control through gut microbiota interactions. *BioFactors*, *43*(4), 507–516. <https://doi.org/10.1002/biof.1365>
- Juraga, E., Šalamon, B., Herceg, Z., & Jambrak, A. (2011). Application of high intensity ultrasound treatment on *Enterobacteriae* count in milk. *Mljekarstvo*, *61*((2)), 125–134.
- Kaplan, H., & Hutkins, R. (2003). Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(4), 2217–2222. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2217-2222.2003/ASSET/B25AC0C1-7C3C-4E1E-A718-A9FC95662AFA/ASSETS/GRAPHIC/AM0431745003.JPEG>
- Kaplan, H., & Hutkins, R. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2682–2684. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2682-2684.2000/ASSET/B7AD68D7-1E9E-4E90-839E-A7469249A238/ASSETS/GRAPHIC/AM0601981002.JPEG>
- Kaume, L., Howard, L., & Devareddy, L. (2011). The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/JF203318P>
- Konić-Ristić, A., Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Juranić, Z., Menković, N., & Stanković, I. (2011). Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chemistry*, *125*(4), 1412–1417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.018>
- Lacombe, A., & Wu, V. (2017). The potential of berries to serve as selective inhibitors of pathogens and promoters of beneficial microorganisms. *Food Quality and Safety*, *1*, 3–12. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx001>
- Lacombe, A., Wu, V., White, J., Tadepalli, S., & Andre, E. (2012). The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne



- pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiology*, *30*(1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.006>
- Lai, K., How, Y., & Pui, L. (2020). Storage stability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in hawthorn berry tea with flaxseed mucilage. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(12), e14965. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14965>
- Lavefve, L., Howard, L., & Carbonero, F. (2020). Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health. *Food and Function*, *11*(1), 45–65. <https://doi.org/10.1039/c9fo01634a>
- Lebaka, V., Wee, Y., Narala, V., & Joshi, V. (2018). Development of New Probiotic Foods-A Case Study on Probiotic Juices. In *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods* (pp. 55–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00004-2>
- Leong, H., Show, P., Lim, M., Ooi, C., & Ling, T. (2018). Natural red pigments from plants and their health benefits: A review. *Food Reviews International*, *34*(5), 463–482. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1326935>
- Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., & Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030064>
- Liao, X., Li, J., Suo, Y., Chen, S., Ye, X., Liu, D., & Ding, T. (2018). Multiple action sites of ultrasound on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Human Wellness*, *7*(1), 102–109. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2018.01.002>
- Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., & Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. *LWT*, *151*, 112106. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112106>
- Liu, K. (2014). Fractionation of oats into products enriched with protein, beta-glucan, starch, or other carbohydrates. *Journal of Cereal Science*, *60*(2), 317–322. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2014.06.002>
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In Corporación Universitaria Lasallista (Ed.), *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.%20129-162.pdf>
- Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., & Delahunty, C. (2006). Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite*, *47*(3), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2006.04.006>
- Majid, I., Nayik, G., & Nanda, V. (2015). Ultrasonication and food technology: A review. *Cogent Food & Agriculture*, *1*(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1071022>

- Mantzourani, I., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Bekatorou, A., & Plessas, S. (2019). Production of a potentially synbiotic fermented Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) beverage using *Lactobacillus paracasei* K5 immobilized on wheat bran. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *17*, 347–351. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.021>
- Mantzourani, I., Terpou, A., Bekatorou, A., Mallouchos, A., Alexopoulos, A., Kimbaris, A., Bezirtzoglou, E., Koutinas, A., & Plessas, S. (2020). Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst. *Food Chemistry*, *308*, 125658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125658>
- Mao, B., Li, D., Zhao, J., Liu, X., Gu, Z., Chen, Y., Zhang, H., & Chen, W. (2015). In vitro fermentation of fructooligosaccharides with human gut bacteria. *Food & Function*, *6*(3), 947–954. <https://doi.org/10.1039/C4FO01082E>
- Marhuenda, J., Alemán, M., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., Mulero, J., & Zafrilla, P. (2016). Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and in Vitro Availability of Four Different Berries. *Journal of Chemistry*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/5194901>
- Marín-Arango, Z., Cortes-Rodríguez, M., Montoya-Campuzano, O., & Arango-Tobón, J. (2019). Viability of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and properties in andean blackberry suspensions with probiotic and prebiotic characteristics. *DYNA*, *86*(210), 179–186. <https://doi.org/10.15446/dyna.v86n210.72929>
- Marinho, J., da Silva, M., Mazzocato, M., Tulini, F., & Favaro-Trindade, C. (2019). Probiotic and Synbiotic Sorbets Produced with Jussara (*Euterpe edulis*) Pulp: Evaluation Throughout the Storage Period and Effect of the Matrix on Probiotics Exposed to Simulated Gastrointestinal Fluids. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(1), 264–272. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9346-y>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, *9*, 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, *42*(2), 57–66. <https://doi.org/10.4206/AGROSUR.2014.V42N2-07>
- Mathur, R., & Barlow, G. (2015). Obesity and the microbiome. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, *9*(8), 1087–1099. <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1051029>
- Mei, G., Carey, C., Tosh, S., & Kostrzynska, M. (2011). Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, *57*(10), 857–865. <https://doi.org/10.1139/W11-077>
- Min, M., Bunt, C., Mason, S., & Hussain, M. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(16), 2626–2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462760>

- Molan, A., Liu, Z., & Kruger, M. (2010). The ability of blackcurrant extracts to positively modulate key markers of gastrointestinal function in rats. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1735–1743. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0352-4>
- Molan, A., Liu, Z., & Plimmer, G. (2014). Evaluation of the effect of blackcurrant products on gut microbiota and on markers of risk for colon cancer in humans. *Phytotherapy Research*, 28(3), 416–422. <https://doi.org/10.1002/ptr.5009>
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R., Gibson, G., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463–6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>
- Morales-de la Peña, M., Welti-Chanes, J., & Martín-Belloso, O. (2016). Application of Novel Processing Methods for Greater Retention of Functional Compounds in Fruit-Based Beverages. *Beverages*, 2(2), 14. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES2020014>
- Mousavi, Z., Mousavi, S., Razavi, S., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 123–128. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0436-1>
- Mustafa, S., & Chua, L. (2020). Green technological fermentation for probioticated beverages for health enhancement. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* (Vol. 19, pp. 407–434). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00013-8>
- Mustafa, S., Chua, L., & El-Enshasy, H. (2019). Effects of agitation speed and kinetic studies on probiotication of pomegranate juice with *lactobacillus casei*. *Molecules*, 24(13), 2357. <https://doi.org/10.3390/molecules24132357>
- Navas, M., Jiménez-Moreno, A., Bueno, J., Sáez-Plaza, P., & Asuero, A. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part IV: Extraction of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(4), 313–342. <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.680343>
- Nematollahi, A., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A., & Jazaeri, S. (2016). Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 49–53. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2016.03.001>
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2017). Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3243–3259. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1109498>

- Nualkaekul, S., Cook, M., Khutoryanskiy, V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53(1), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.019>
- Nualkaekul, S., Salmeron, I., & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*, 129(3), 1037–1044. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.071>
- Oancea, S. (2021). A Review of the Current Knowledge of Thermal Stability of Anthocyanins and Approaches to Their Stabilization to Heat. *Antioxidants*, 10(9), 1337. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091337>
- Ojha, K., Mason, T., O'Donnell, C., Kerry, J., & Tiwari, B. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 410–417. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.06.001>
- Ospina-Corral, S., Cardona, C., & Orrego, C. (2019). Prebiotics in Beverages: From Health Impact to Preservation. In *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages: Volume 15: The Science of Beverages* (Vol. 15, pp. 339–373). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00011-2>
- Park, Y., Biswas, R., Phillips, R., & Chen, J. (2011). Antibacterial Activities of Blueberry and Muscadine Phenolic Extracts. *Journal of Food Science*, 76(2), M101–M105. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01974.x>
- Pérez-Grijalva, B., Herrera-Sotero, M., Mora-Escobedo, R., Zebadúa-García, J., Silva-Hernández, E., Oliart-Ros, R., Pérez-Cruz, C., & Guzmán-Gerónimo, R. (2018). Effect of microwaves and ultrasound on bioactive compounds and microbiological quality of blackberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.059>
- Perjéssy, J., Hegyi, F., Nagy-Gasztonyi, M., & Zalán, Z. (2022). Effect of the lactic acid fermentation by probiotic strains on the sour cherry juice and its bioactive compounds. *Food Science and Technology International*, 28(5), 408–420. <https://doi.org/10.1177/10820132211018044>
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. (2015). Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. *Beverages*, 1(2), 95–103. <https://doi.org/10.3390/beverages1020095>
- Perricone, M., Corbo, M., Sinigaglia, M., Speranza, B., & Bevilacqua, A. (2014). Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. *Journal of Functional Foods*, 10, 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.020>
- Petersen, C., Wankhade, U., Bharat, D., Wong, K., Mueller, J., Chintapalli, S., Piccolo, B., Jalili, T., Jia, Z., Symons, J., Shankar, K., & Anandh Babu, P. (2019). Dietary supplementation with strawberry induces marked changes in the composition and functional potential of the gut

- microbiome in diabetic mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 66, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.004>
- Pimentel, T., Klososki, S., Rosset, M., Barão, C., & Marcolino, V. (2019). Fruit juices as probiotic foods. In *Sports and Energy Drinks* (Vol. 10, pp. 483–513). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00014-0>
- Pisoschi, A., & Negulescu, G. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1(1). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494–507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x>
- Quigley, E. (2019). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.028>
- Raccach, M. (2014). *Pediococcus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (pp. 1–5). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00247-0>
- Ramírez-Moreno, E., Zafra-Rojas, Q., Arias-Rico, J., Ariza-Ortega, J., Alanís-García, E., & Cruz-Cansino, N. (2018). Effect of ultrasound on microbiological load and antioxidant properties of blackberry juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), e13489. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13489>
- Ramírez-Sucre, M., Gastélum-Martínez, E., Ayora-Talavera, T., Pacheco-López, N., Sánchez-Contreras, M., & Rodríguez-Buenfil, I. (2019). Process and Impact of the Addition of Biocompounds on the Development of Pasteurized Healthy Juices. In *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages: Volume 15: The Science of Beverages* (Vol. 15, pp. 273–307). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816685-7.00009-4>
- Ranadheera, C., Vidanarachchi, J., Rocha, R., Cruz, A., & Ajlouni, S. (2017). Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 67. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040067>
- Ranadheera, R., Baines, S., & Adams, M. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- Reale, A., di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 721–728. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.10.022>

- Režek Jambrak, A., Šimunek, M., & Djekic, I. (2018). Total quality index of ultrasound-treated blueberry and cranberry juices and nectars. *Food Science and Technology International*, 24(5), 434–446. <https://doi.org/10.1177/1082013218764962>
- Režek Jambrak, A., Šimunek, M., Evačić, S., Markov, K., Smoljanić, G., & Frece, J. (2018). Influence of high power ultrasound on selected moulds, yeasts and *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple, cranberry and blueberry juice and nectar. *Ultrasonics*, 83, 3–17. <https://doi.org/10.1016/J.ULTRAS.2017.02.011>
- Rodríguez-Daza, M., Pulido-Mateos, E., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., & Roy, D. (2021). Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Frontiers in Nutrition*, 8, 347. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.689456/BIBTEX>
- Ruiz, L., Zamora, V., Pescuma, M., van Nieuwenhove, C., Mozzi, F., & Sánchez, J. (2021). Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Research International*, 140, 109854. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109854>
- Sánchez León, D. (2012). Estudio del potencial antioxidante de la mora (*Rubus glaucus benth*) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Santacruz, L., Carriazo, J., Almanza, O., & Osorio, C. (2012). Anthocyanin Composition of Wild Colombian Fruits and Antioxidant Capacity Measurement by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1397–1404. <https://doi.org/10.1021/JF2042533>
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., & Somasundram, C. (2013). Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1276–1282. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.005>
- Seyed Ahmadi, M., Alizadeh, A., & Soofi, M. (2020). Effect Of Ultrasound Treatment On The Viability Of Probiotics And Physicochemical Properties Of Synbiotic Carrot Juice. *Iranian Journal Of Food Science And Technology*, 16(96), 15–25. <https://www.sid.ir/EN/JOURNAL/ViewPaper.aspx?ID=746576>
- Sheehan, V., Ross, P., & Fitzgerald, G. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(2), 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.01.007>
- Shori, A. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2015.11.001>
- Silva, E., Arruda, H., Pastore, G., Meireles, M., & Saldaña, M. (2020). Xylooligosaccharides chemical stability after high-intensity ultrasound processing of prebiotic orange juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104942. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2019.104942>

- Singh, B., Singh, J., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. *Food Chemistry*, 206, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.033>
- Singla, M., & Sit, N. (2021). Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105506. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105506>
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673–24706. <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Sonic & Materials. (n.d.). *Probes for VC 505, VC 750, VCX 500 and VCX 750*. Retrieved July 8, 2022, from <https://www.spectratech.gr/Web/Sonics/pdf/VCX-505.pdf>
- Speranza, B., Campaniello, D., Petruzzi, L., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., & Corbo, M. (2020). The inoculation of probiotics in vivo is a challenge: Strategies to improve their survival, to avoid unpleasant changes, or to enhance their performances in beverages. *Beverages*, 6(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/beverages6020020>
- Srisukchayakul, P., Charalampopoulos, D., & Karatzas, K. (2018). Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. *Food Research International*, 111, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.018>
- Sun, X., Zhou, T., Wei, C., Lan, W., Zhao, Y., Pan, Y., & Wu, V. (2018). Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*, 94, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.012>
- Swanson, K., Gibson, G., Hutkins, R., Reimer, R., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K., Holscher, H., Azad, M., Delzenne, N., & Sanders, M. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020 17:11, 17(11), 687–701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>
- Tian, L., Tan, Y., Chen, G., Wang, G., Sun, J., Ou, S., Chen, W., & Bai, W. (2019). Metabolism of anthocyanins and consequent effects on the gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6), 982–991. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1533517>
- Tiwari, B., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C., & Cullen, P. (2010). Rheological Properties of Sonicated Guar, Xanthan and Pectin Dispersions. *International Journal of Food Properties*, 13(2), 223–233. <https://doi.org/10.1080/10942910802317610>

- Tiwari, B., O'Donnell, C., Patras, A., Brunton, N., & Cullen, P. (2009). Stability of anthocyanins and ascorbic acid in sonicated strawberry juice during storage. *European Food Research and Technology*, 228(5), 717–724. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0982-z>
- Topolska, K., Florkiewicz, A., & Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5327. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18105327>
- Tsuda, T. (2016). Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants*, 5(2), 13. <https://doi.org/10.3390/antiox5020013>
- Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., & Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.009>
- Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J., & Frutos, M. (2020). Non-Dairy Fermented Beverages as Potential Carriers to Ensure Probiotics, Prebiotics, and Bioactive Compounds Arrival to the Gut and Their Health Benefits. *Nutrients*, 12(6), 1666. <https://doi.org/10.3390/NU12061666>
- Varo Santos, M. (2019). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos rojos y bebidas elaboradas a partir de ellos. Universidad de Córdoba. <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/17657>
- Verbeyst, L., Oey, I., van der Plancken, I., Hendrickx, M., & van Loey, A. (2010). Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chemistry*, 123(2), 269–274. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.04.027>
- Villamiel, M., García-Pérez, J., Montilla, A., & Benedito, J. (2017). *Ultrasound in Food Processing* (First edit). Wiley Blackwell.
- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R., & Jayabalan, R. (2019). Effect of probiotification with *Lactobacillus plantarum* MCC 2974 on quality of Sohiong juice. *LWT*, 108, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.046>
- Wang, J., Wang, J., Ye, J., Vanga, S., & Raghavan, V. (2019). Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food Control*, 96, 128–136. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.09.007>
- Wang, W., & Xu, S. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82(3), 271–275. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2007.01.018>
- Wanna, W., Surachat, K., Kaitimonchai, P., & Phongdara, A. (2021). Evaluation of probiotic characteristics and whole genome analysis of *Pediococcus pentosaceus* MR001 for use as probiotic bacteria in shrimp aquaculture. *Scientific Reports*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96780-z>



- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M., van Neerven, R., Nauta, A., & van Sinderen, D. (2013). Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(4), 1132–1146. <https://doi.org/10.1111/JAM.12105>
- White, J., & Hekmat, S. (2018). Development of probiotic fruit juices using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 fortified with short chain and long chain inulin fiber. *Fermentation*, *4*(2), 27. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020027>
- Wordon, B., Mortimer, B., & McMaster, L. (2012). Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20kHz) and heat for the application of hurdle technology. *Food Research International*, *47*(2), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.038>
- Wu, J., Gamage, T., Vilku, K., Simons, L., & Mawson, R. (2008). Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.07.007>
- Wu, V., Qiu, X., Bushway, A., & Harper, L. (2008). Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(10), 1834–1841. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.001>
- Wu, Y., Li, S., Tao, Y., Li, D., Han, Y., Show, P., Wen, G., & Zhou, J. (2021). Fermentation of blueberry and blackberry juices using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of probiotics, metabolism of phenolics, antioxidant capacity in vitro and sensory evaluation. *Food Chemistry*, *348*, 129083. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129083>
- Xavier-Santos, D., Bedani, R., Lima, E., & Saad, S. (2020). Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103666. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103666>
- Yahia, E. (2017). Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health: Second edition. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health: Second Edition* (2nd ed., Vol. 1). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119158042>
- Yan, Y., Zhang, F., Chai, Z., Liu, M., Battino, M., & Meng, X. (2019). Mixed fermentation of blueberry pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the active ingredient, antioxidant activity and health-promoting benefits. *Food and Chemical Toxicology*, *131*, 110541. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.049>
- Yang, B., & Kortessniemi, M. (2015). Clinical evidence on potential health benefits of berries. *Current Opinion in Food Science*, *2*, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.002>

- Yang, H., Hewes, D., Salaheen, S., Federman, C., & Biswas, D. (2014). Effects of blackberry juice on growth inhibition of foodborne pathogens and growth promotion of *Lactobacillus*. *Food Control*, 37(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.042>
- Zafra-Rojas, Q., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., & Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1283–1288. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.021>
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A., & da Cruz, A. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103–123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>
- Zhang, L., Zhou, J., Liu, H., Khan, M., Huang, K., & Gu, Z. (2012). Compositions of anthocyanins in blackberry juice and their thermal degradation in relation to antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 235(4), 637–645. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1796-6>
- Zhou, L., Xie, M., Yang, F., & Liu, J. (2020). Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. *LWT*, 117, 108621. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108621>
- Zhu, J., Wang, Y., Li, X., Li, B., Liu, S., Chang, N., Jie, D., Ning, C., Gao, H., & Meng, X. (2017). Combined effect of ultrasound, heat, and pressure on *Escherichia coli* O157:H7, polyphenol oxidase activity, and anthocyanins in blueberry (*Vaccinium corymbosum*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 251–259. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2017.01.017>
- Žuntar, I., Petric, Z., Kovacević, D., & Putnik, P. (2020). Safety of probiotics: Functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods*, 9(7), 947. <https://doi.org/10.3390/foods9070947>