



Producto potencialmente simbiótico a partir de mora de castilla (*Rubus glaucus*) aplicando impregnación a vacío

Potentially synbiotic product based on Andean blackberry (*Rubus glaucus*) by applying vacuum impregnation

Rodríguez-Barona, Sneyder^{1,*}; Zuluaga-Pava, Yenni²; Cruz-Ríos, David³

¹ Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia

² Departamento de Ciencias Biológicas Universidad de Caldas- Manizales -Colombia

³ Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales- Colombia.

Recibido 22 diciembre 2011; aceptado 10 noviembre 2012

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un producto potencialmente simbiótico impregnando al vacío láminas de mora de castilla (*Rubus glaucus*) con tres soluciones; zumo de mora, solución de Fructooligosacáridos (FOS), y una mezcla de zumo de mora y solución de FOS, todas inoculadas con *Lactobacillus casei* ATCC 393 (10^9 UCF/mL). Las láminas de mora impregnadas con la mezcla de zumo más FOS y con solución de FOS, contenían más de 10^8 UCF/g luego de 72 horas de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración y más de 0,0022g de FOS por cada 100g de muestra impregnada. Los resultados indican que la presencia de FOS en la solución de impregnación aumentaría la viabilidad del microorganismo y que en efecto, es viable la obtención de un alimento potencialmente simbiótico a partir de mora de castilla mediante la impregnación de su matriz porosa con microorganismos benéficos y sustancias prebióticas.

Palabras clave: Mora (*Rubus glaucus*), fructo-oligosacáridos, prebiótico, probiótico, simbiótico.

Abstract

The aim of this study was to develop a product potentially symbiotic by applying vacuum impregnating over Andean blackberry slices immersed in three solutions: a solution of fructooligosaccharides (FOS), natural blackberry juice, and a mixture of fruit juice and solution of FOS, inoculated with *Lactobacillus casei* ATCC 393 with 10^9 UCF/mL. The blackberry slices impregnated with the mixture of fruit juice and FOS, and with just the FOS solution, they were found to contain 10^8 UCF/g and over 0.0022 g of FOS per 100g of impregnated sample after being stored for 72 hours under refrigeration conditions. The results indicate that the presence of FOS in the impregnation solution increases the viability of the microorganisms and it can be concluded that it is feasible to obtain a potentially symbiotic food from Andean blackberry by means of the impregnation of its porous matrix with beneficial microorganisms and prebiotic substances.

Keywords: Andean Blackberry (*Rubus glaucus*), fructo-oligosaccharides, prebiotics, probiotics, synbiotic.

1. Introducción

Los alimentos funcionales son alimentos o ingredientes que además de aportar nutrientes, han demostrado poseer beneficios adicionales por encima del valor nutricional normal y que conjuntamente, ejercen un papel preventivo reduciendo los factores de riesgo que provocan las

enfermedades (Dykes *et al.*, 2003; Alzamora *et al.*, 2005; Mei-Fang, 2011; Jiménez-Colmenero *et al.*, 2010). Entre los alimentos funcionales se incluyen, los probióticos, prebióticos y simbióticos. Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al hospedador mediante la estimulación

* Autor para correspondencia

Email: snrodriguezba@unal.edu.co (S. Rodríguez-Barona)

selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del hospedador (Glenn y Roberfroid 1995; Pérez, 2003; González, 2007; Glenn, 2004). Los probióticos son definidos como organismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas, ejercen un beneficio para la salud del hospedador (Betoret *et al.*, 2003; Aureli *et al.*, 2011; Quigley, 2010). Debido al potencial sinérgico entre probióticos y prebióticos, los alimentos que presentan en su composición una combinación de estos ingredientes son llamados simbióticos (Pérez, 2003; Röbke *et al.*, 2010). La interacción entre probióticos y prebióticos podría favorecer la adaptación de los probióticos a un sustrato alimenticio previo a su consumo (Martínez-Villaluenga y Gómez, 2007). Una amplia variedad de probióticos con fibra prebiótica han sido incorporados en alimentos a fin de favorecer la supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y obtener los beneficios de estos alimentos en la salud (Capela *et al.*, 2006; Cardarelli *et al.*, 2008)

Mediante la aplicación de la técnica de impregnación a vacío (IV) es posible incorporar componentes fisiológicamente activos (CFA) en la estructura porosa de los alimentos (Fito *et al.*, 2001). Este mecanismo es definido como un proceso de transporte de materia en un sistema sólido-poroso-líquido a presiones sub-atmosféricas donde mediante la acción hidrodinámica y los mecanismos promovidos por los cambios de presión, el poro es llenado de la solución vehículo con el componente bioactivo (Fito *et al.*, 2001; Betoret *et al.*, 2003). La aplicación de esta tecnología en frutas y hortalizas para la obtención de un alimento potencialmente simbiótico podría convertirse en una alternativa a los productos probióticos de origen lácteo de consumo restringido para intolerantes a la lactosa.

La mora (*Rubus glaucus*) es un fruto apreciado por su valor nutricional y por ser

una excelente fuente natural de compuestos antioxidantes, sin embargo es altamente perecedera, situación que hace necesaria la búsqueda de alternativas de procesamiento que permitan mantener sus propiedades nutricionales y generen valor agregado al producto. La técnica de IV con la incorporación de componentes bioactivos (probióticos y prebióticos), podría ser una opción para la obtención de un ingrediente alimentario con cualidades simbióticas para su uso en cereales de desayuno, postres, *snacks*, entre otros.

El presente estudio plantea la obtención de un producto potencialmente simbiótico mediante la incorporación de un fructo-oligosacarido (FOS) y el probiótico *Lb. casei* en matrices de mora, cuya mezcla favoreciera la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento.

2. Material y Métodos

Cultivos bacterianos. La cepa liofilizada de *Lactobacillus casei* ATCC 393 fue adquirida a través de una casa comercial; activada en caldo MRS (Scharlou) e incubada a 37°C durante 48 horas en condiciones aerobias. Durante la experiencia fue conservada en crioviales hasta su uso.

Material fresco. Moras de castilla (*Rubus glaucus*) fueron obtenidas a través de un proveedor de la zona rural del municipio de Manizales, Caldas en Colombia.

Tratamiento de las muestras. Las moras fueron seleccionadas considerando la homogeneidad del material y apariencia sana. Sometidas a un proceso de higienización y cortadas en láminas de 2,02±0,1cm de diámetro con 0,59±0,06cm de espesor.

Caracterización físico-química. Los sólidos solubles fueron medidos en unidades Brix y determinados con refractómetro (*Brixco Instruments*) a 20°C, el valor de pH fue medido con un

potenciómetro (*Schott*). La actividad de agua fue determinada usando un higrómetro de punto de rocío (*Thermo-Constanter Novasina*) y la humedad fue cuantificada hasta peso constante según el método AOAC 934.06 (AOAC, 1999). La viscosidad y densidad de las soluciones de impregnación fueron obtenidas mediante el uso de un viscosímetro de *Ubbelohde* y picnómetro respectivamente. El contenido de FOS en las muestras impregnadas fue determinado empleando el método enzimático espectrofotométrico basado en el método 999.03 de la AOAC (2003). Cada valoración fue realizada por triplicado.

Soluciones de impregnación (SI). Se consideraron tres soluciones vehículo en las pruebas de impregnación: zumo natural de mora (ZM), obtenido con un extractor doméstico clarificado y esterilizado por filtración. Solución estéril de fructo-oligosacáridos (FOS) (Nutraflora® con productos Andina) y una mezcla de zumo natural y solución de FOS (ZM+FOS); todas las soluciones fueron isotónicas con respecto a la mora fresca.

Inoculación de soluciones de impregnación. La biomasa de *Lb. casei* obtenida en caldo MRS fue recuperada por centrifugación a 8000 rpm (*Hettich Universal 320*) durante 15 minutos y adicionada a las soluciones de impregnación hasta una concentración de microorganismos de 10^9 UFC/mL según escala Mc Farland.

Impregnación a vacío (IV). Las láminas de mora debidamente identificadas fueron pesadas y sumergidas en la SI, llevadas al dispositivo de impregnación y sometidas a una presión de vacío de 50 mbar durante 10 minutos a 20°C; una vez restablecida la presión atmosférica las muestras continuaron sumergidas 10 minutos más. Se evaluó la evolución de la masa de las muestras impregnadas, el recuento de UFC/g, la humedad y el contenido de FOS.

Se determinaron los parámetros de impregnación: fracción volumétrica de impregnación X_{MF} ($m^3 SI/m^3$ mora fresca) y X_{IV} (kgFOS/kg.mora.impregnada) considerando los modelos matemáticos siguientes:

$$X_{MF} = \frac{M_f - M_i}{\rho_{dis} \left(\frac{M_i}{\rho_{apm}} \right)} \quad (1)$$

$$X_{IV} = \frac{(M_f - M_i) * \frac{M_{FOS}}{100ml}}{M_f * \rho_{dis}} \quad (2)$$

Donde: M = masa, ρ_{dis} = densidad de SI, ρ_{apm} = densidad aparente de la mora.

Recuentos microbianos y viabilidad del microorganismo en las muestras impregnadas. Las muestras impregnadas fueron almacenadas en refrigeración (6°C) durante 72 horas. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) cada 24 horas mediante siembra en placa, incubación y conteo sobre agar MRS. Los recuentos en cada caso fueron realizados por triplicado.

El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando pruebas de ANOVA a un nivel de significancia del 5% usando el paquete Startgraphics plus 2.1.

3. Resultados y discusión

Caracterización físico-química de las soluciones de impregnación

La incorporación de componentes bioactivos en una matriz vegetal está condicionada por diversos factores, entre ellos la porosidad del producto y las características físico-químicas de la solución vehículo, las cuales no deberían afectar considerablemente la composición celular ni el proceso de impregnación de los componentes bioactivos en los poros de la fruta (Martínez-Monzó *et al.*, 1998).

La Tabla 1 muestra la caracterización físico-química de las soluciones isotónicas de impregnación considerando el pH, la viscosidad y la densidad. Los valores de densidad obtenidos para cada una de las

soluciones vehículo no superaron los 1,05 kg/m³ ni presentaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$). Las viscosidades determinadas se hallan en un rango entre (1,2 mPa.s y 1,4 mPa.s); comparando estos valores con los reportados en la literatura para ensayos de impregnación con soluciones no isotónicas se puede considerar que el proceso de IV en este caso no fue perturbado por estos parámetros (Martínez-Monzó *et al.*, 1998). El valor de pH es bajo para las soluciones con zumo de mora y aproximadamente neutro para las soluciones de FOS, este valor podría llegar a ser clave en la supervivencia del microorganismo.

Tabla 1

Caracterización físico-química de las soluciones isotónicas de impregnación inoculadas.

SI	pH	Viscosidad (mPa.s)	Densidad (kg/m ³)
ZM	2,92 ± 0,01	1,259 ± 0,001	1040,01 ± 1,60
ZM+FOS	3,10 ± 0,01	1,325 ± 0,008	1042,25 ± 1,50
FOS	6,80 ± 0,01	1,308 ± 0,021	1042,57 ± 0,10

Caracterización físico-química de las muestras impregnadas

La Tabla 2 muestra la caracterización físico-química realizada a las muestras frescas e impregnadas con las soluciones descritas. Se observa en todos los casos como el proceso de impregnación incrementa el valor de humedad y de

actividad de agua en las muestras al sustituir el aire contenido en los poros por solución de IV. Con respecto a la variación de masa de las muestras impregnadas no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Parámetros calculados para la impregnación a vacío

Los parámetros de impregnación calculados se muestran en la Tabla 3. Se calculó una porosidad de 3,68% con lo cual se podría considerar que es este, el espacio real a ser ocupado por la solución vehículo tras la IV, sin embargo, existen diversos factores que podrían variar esta predicción, entre ellos la deformación de la matriz durante el proceso, las características inherentes a las soluciones de impregnación, que pueden afectar los mecanismos de transferencia de masa en el interior de la fruta (Fito y Pastor, 1994; Cortés, 2007). Estos parámetros de impregnación y la composición de la solución hacen posible predecir la composición final de las muestras impregnadas en lo que a la concentración de prebiótico se refiere. Los porcentajes de X_{IV} para las muestras impregnadas con soluciones de FOS y ZM+FOS fueron de 0,44% y 0,18% respectivamente. Estas cifras comparadas con los datos experimentales reportados en la Tabla 2 de 0,45% y 0,22% para soluciones de FOS y ZM+FOS, evidencian la precisión entre los datos calculados con respecto a los valores reales encontrados.

Tabla 2

Caracterización físico-química de la mora fresca e impregnada.

	Humedad (%)	Sólidos solubles (°Brix)	a_w	pH	FOS (%)	ΔM
Mora Fresca (MF)	87,7 ± 2,3	8,5 ± 0,7	0,981 ± 0,001	3,0 ± 0,01	-	-
Mora impregnada (MI)						
ZM	91,128 ± 0,6	8,55 ± 0,5	0,982 ± 0,001	3,24 ± 0,01	-	0,054 ± 0,003
ZM+FOS	91,122 ± 0,2	8,75 ± 0,1	0,986 ± 0,001	2,76 ± 0,02	0,22	0,048 ± 0,001
FOS	91,140 ± 0,1	8,58 ± 0,1	0,980 ± 0,001	3,10 ± 0,02	0,45	0,057 ± 0,003

Supervivencia de *Lb. casei* en moras impregnadas

La viabilidad de *Lb. casei* fue evaluado en muestras de mora impregnadas en las diferentes soluciones y almacenadas bajo refrigeración (6°C) durante 72 horas. Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 1.

Las muestras recién impregnadas contenían aproximadamente 10^9 UFC/g. Durante el periodo de almacenamiento se observa una drástica disminución de la viabilidad en las muestras impregnadas con ZM, mientras en las muestras impregnadas con ZM+FOS y solución de FOS la viabilidad se mantiene hasta las 72 horas con una reducción de menos de dos unidades logarítmicas. No se encontraron diferencias significativas entre los recuentos para las muestras impregnadas con ZM+FOS y solución de FOS. Ésta observación evidencia el efecto benéfico que tiene el prebiótico en la viabilidad de la cepa impregnada en la matriz de la fruta.

Tabla 3

Parámetros de impregnación considerados en el sistema.

	Porosidad real (ϵ) (m ³ aire/m ³ MF)	$X_{MF} \cdot 10^2$ (m ³ SI/m ³ M)	$X_{IV} \cdot 10^3$ (kgFOS/kgM)
MF	0,036 ± 0,007	-	-
ZM	-	5,26 ±0,3	-
ZM+FOS	-	4,58 ±0,3	1,8 ±0,00
FOS	-	5,55 ±0,2	4,4 ±0,00

En la actualidad existen pocos reportes sobre estudios de adición de prebióticos y probióticos en matrices vegetales, sin embargo distintos autores han realizado pruebas sobre otros productos alimenticios, demostrando en algunos casos efectos benéficos sobre la supervivencia de microorganismos probióticos en productos

lácteos con la adición de sustancias prebióticas (Capela *et al.*, 2006; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006; Cardarelli *et al.*, 2008), otros investigadores como Nazzaro y colaboradores no reportaron un efecto benéfico de FOS e inulina sobre la viabilidad de *Lb. rhamnosus* en jugos de zanahoria (Nazzaro *et al.*, 2008).

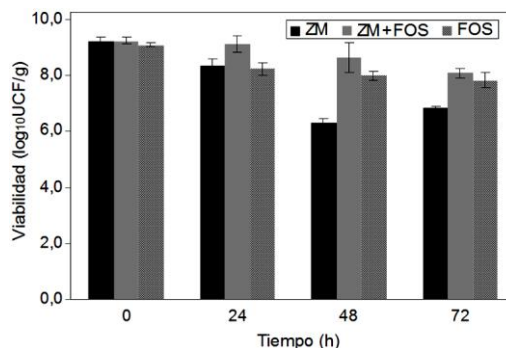


Figura 1. Efecto de la adición de FOS sobre la viabilidad de *Lb. Casei* en muestras refrigeradas.

Aunque la viabilidad del microorganismo en condiciones de refrigeración se ve bastante favorecida en las moras impregnadas con solución de FOS, la estabilidad del azúcar en condiciones ácidas, de alta humedad y a tiempos largos de almacenamiento de acuerdo con los proveedores no es favorable, es posible entonces considerar la aplicación de un proceso de estabilización a las muestras, de tal forma que la actividad de agua sea reducida, favoreciendo el tiempo de vida útil del producto potencialmente simbiótico obtenido.

4. Conclusiones

Este estudio muestra que la adición de prebiótico en las soluciones de impregnación en frutas favorece la viabilidad de la cepa *Lb casei*. Esta mezcla y una adecuada estabilización del producto, permitirá obtener un alimento con características potencialmente simbióticas cuya acción sinérgica conlleva beneficios a la salud.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigaciones de Manizales (DIMA) por la financiación de este proyecto. A la empresa Industrias del Maíz S.A-Corn Products Andina, Segmento de Alimentos Procesados por la donación de su producto Nutraflora®.

Referencias bibliográficas

- Alzamora, S.M.; Salvatori, D.; Tapia, S.M.; López-Malo, A.; Welti-Chanes J.; Fito, P. 2005. Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *Journal of Food Engineering* 67: 205–214.
- AOAC. 1999. Moisture in dried fruits. Method 934.06. In: Official method of Analysis of AOAC International.
- AOAC. 2003. Measurement of total fructan in foods-enzymatic/ spectrophotometric method. Method 999.03. In: Official Methods of Analysis of AOAC International.
- Aureli, P.; Capurso, L.; Castellazzi, A.M.; Clerici, M.; Giovannini, M.; Morelli, L.; Polli, A.; Pregliasco, F.; Salvinini, F.; Zuccotti, G.V. 2011. Probiotics and health: An evidence-based. *Pharmacological Research* 63: 366–376.
- Betoret, N.; Puente, L.; Diaz, M.J.; Pagan, M.J.; García, M.J.; Gras, M.L.; Marto, J.; Fito, P. 2003. Development of probiotic enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering* 56(2–3): 273–277.
- Capela, P.; Hay, T.K.C.; Shah, N.P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. *Food Research International* 39: 203–211.
- Cardarelli, H.R.; Buriti, F.C.A.; Castro, I.A.; Saad, S.M.I. 2008. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-swiss cheese. *Food Science and Technology* 41: 1037–1046.
- Cortés, M. 2007. Aplicación de ingeniería de matrices en la fortificación de mango (var. *Tommy Atkins*) con calcio. *Dyna Año* 74, 153: 19–26.
- Dykes, G.A.; Amarowicz, R.; Pegg, R.B. 2003. An antioxidant bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) extract modulates surface hydrophobicity of a wide range of food-related bacteria: implications for functional food. *Food Control* 14: 515–518.
- Fito, P.; Chiraly, A.; Betoret, N.; Grass, M.; Chafer, M.; Martínez-Monzó, J.; Andrés, A.; Vidal, D. 2001. Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering application in functional fresh food development. *Journal of Food Engineering* 49: 175–183.
- Fito, P.; Pastor, R. 1994. On some diffusional mechanism occurring Vacuum Osmotic Dehydration (VOD). *Journal of Food Engineering* 21: 513 – 519.
- Glenn, G.R. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept) *Clinical Nutrition Supplements* 1: 25–31.
- Glenn, G.R.; Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401–1412.
- Gonzales, I. 2007. Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto intestinal (tesis de maestría) Universidad Autónoma Metropolitana.
- Jiménez-Colmenero, F.; Sánchez-Muniz, J.F.; Olmedilla-Alonso, B. 2010. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health. *Food Chemistry* 123: 959–967.
- Martínez-Monzó, J.; Martínez-Navarrete, N.; Chiralt, A.; Fito, P. 1998. Mechanical and structural changes in apple (var. Granny Smith) due to vacuum impregnation with cryoprotectants. *Journal of Food Science* 63: 499–503.
- Martínez-Villaluenga, C.; Frías, J.; Gómez, R.; Vidal-Valverde, C. 2006. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal* 16: 768–774.
- Martínez-Villaluenga, C.; Gómez, R. 2007. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal* 17: 116–122.
- Mei-Fang, C. 2011. The mediating role of subjective health complaints on willingness to use selected functional foods. *Food Quality and Preference* 22: 110–118.
- Nazzaro, F.; Fratinni, F.; Sada, A.; Orlando, P. 2008. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp., and insulin or fructooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2271–2276.
- Perez, D. 2003. Adición de prebióticos y probióticos a fórmulas infantiles y su efecto sobre la biodisponibilidad mineral. (tesis doctoral) Universidad de Murcia.
- Quigley, E.M. 2010. Probiotics and prebiotics; modifying and mining the microbiota. *Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork* 6: 213–218.
- Röble, C.; Bruntona, N.; Gormley, R.; Ross, P.R.; Butler, F. 2010. Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices *Journal of Functional Foods* 2: 245 – 254.