

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“PROPIEDADES ANTIOXIDANTES EN LECHE FERMENTADA
CON PURÉ DE CEREZA”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Julio 2016

Autor: Paola Sánchez Bravo

Tutores: Esther Sendra Nadal

Alejandra Martínez Esplá

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES EN LECHE FERMENTADAS CON PURÉ DE CEREZA

Hoy en día, existe una creciente tendencia por parte de los consumidores hacia productos saludables. El presente trabajo estudia la incorporación a la leche fermentada de un 15 % de puré de cereza en dos estados maduración (comercial y fisiológico) evaluando la viabilidad y las condiciones óptimas de crecimiento de *Lactobacillus casei*, *paracasei* y *helveticus* durante 10 días de almacenamiento en refrigeración. En este tiempo se observó que *L. helveticus* presentó una rápida acidificación, pero fueron *L. casei* y *L. paracasei* quienes alcanzaron recuentos más elevados. Las cerezas más maduras, recolectadas en un estado fisiológico, aportaron una mayor concentración en compuestos bioactivos. La combinación *L. helveticus* con cereza madura es la más interesante para la conservación de principios bioactivos.

Palabras clave: leche fermentada, cereza, antocianos, compuestos fenólicos, actividad antioxidante.

ANTIOXIDANTS PROPERTIES OF SWEET CHERRY ENRICHED FERMENTED MILKS

Nowadays, consumers increasingly demand healthy products. This paper studies the incorporation of 15% of pureed sweet cherry on two maturation states (commercial and physiology) into fermented milks assessing the feasibility and optimal growth conditions of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus helveticus* for 10 days of refrigerated storage. It has been observed that *L. helveticus* exhibited the fastest acidification rate; however *L. casei* and *L. paracasei* presented higher microbial counts. Sweet cherries harvesting at physiology ripening had the highest concentration of bioactive compounds. Fermented milk with *L. helveticus* including 15% matured cherry puree provides best preservation of bioactive compounds.

Keywords: fermented milk, sweet cherry, anthocyanins, phenolic compounds, antioxidant activity.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.	LECHES FERMENTADAS	7
1.1.1.	Descripción	7
1.1.2.	Orígenes	8
1.1.3.	Descripción de yogur y composición.....	8
1.1.4.	Proceso de elaboración.....	9
1.1.5.	Coagulación ácida y pH	14
1.1.6.	Importancia para el consumidor	14
1.2.	BACTERIAS LÁCTICAS.....	15
1.2.1.	<i>Lactobacillus casei</i>	16
1.2.2.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	17
1.2.3.	<i>Lactobacillus helveticus</i>	18
1.2.4.	Importancia de lactobacillus en la industria ALIMENTARIA.....	18
1.3.	CEREZA	19
1.3.1.	Características organolépticas	19
1.3.2.	Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	20
1.3.3.	Compuestos fenólicos y Antocianinas.....	21
2.	OBJETIVOS.....	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1.	PLAN DE TRABAJO	26
3.1.1.	Material Vegetal.....	27
3.1.2.	Recuperación de las cepas puras	28
3.1.3.	Elaboración de las leches fermentadas.....	29
3.1.4.	Determinación del color.....	31
3.1.5.	Determinación del pH	31
3.1.6.	Recuento microbiológico	31
3.1.7.	Determinación de polifenoles totales y antocianos.....	33
3.1.8.	Determinación de capacidad antioxidante	35
3.1.9.	Análisis estadístico	38

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1.	pH Y RECuentOS MICROBIANOS.....	40
4.1.1.	Análisis estadístico	40
4.1.2.	pH	43
4.1.3.	Recuentos.....	45
4.2.	COLOR	48
4.2.1.	Análisis estadístico	48
4.2.2.	Parámetros de color.....	50
4.3.	POLIFENOLES, ANTOCIANOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	52
4.3.1.	Comparación entre fruta entera, puré y leche fermentada	52
4.3.2.	Leches fermentadas	53
5.	CONCLUSIÓN.....	59
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	61



1

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAS

Miguel
Hernández

1.1. LECHE FERMENTADAS

1.1.1. DESCRIPCIÓN

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH (hasta 4,6) con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica), que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima, a no ser que el producto haya sido tratado térmicamente tras la fermentación (CODEX STAN 243-2003).

Algunas de las leches fermentadas, se caracterizan por un cultivo o cultivos específicos (**Tabla 1**).

Tabla 1. Caracterización de las leches fermentadas según el tipo de cultivo (CODEX STAN 243-2003).

Yogur	Cultivos simbióticos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>
Yogur en base a cultivos alternativos	Cultivos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y toda especie <i>Lactobacillus</i> .
Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Kefir	Cultivo preparado a partir de gránulos de kefir, <i>Lactobacillus kefiri</i> , especies del género <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Acetobacter</i> que crecen en una estrecha relación específica. Los gránulos de kefir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) como levaduras fermentadoras sin lactosa (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i>)
Kumys	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> .

Actualmente, el yogur es la leche fermentada más conocida y la de mayor consumo a nivel mundial.

1.1.2. ORÍGENES

El yogur es probablemente originario de Oriente Medio, y la evolución de este producto fermentado a lo largo de los años se puede atribuir a los pueblos nómadas de esta parte del mundo. Las características del clima subtropical de esta zona producen la acidificación de la leche y la coagulación poco después del ordeño. En consecuencia, raramente la población consumía leche natural y fueron aceptando un producto fermentado que les era agradable para comer o beber y al que inicialmente denominaron leche agria (Tamine y Robinson, 1991).

1.1.3. DESCRIPCIÓN DE YOGUR Y COMPOSICIÓN

Según la legislación española se entiende por “yogur” o “yoghourt” el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche o de leche concentrada, desnatadas o no, o de nata, o de mezcla de dos o más de dichos productos, con o sin la adición de otros ingredientes lácteos (indicados en el apartado 2 del artículo 5), que previamente hayan sufrido un tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento, equivalente, al menos, a la pasterización. Asimismo, el conjunto de los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en la parte láctea del producto terminado en cantidad mínima de 1 por 10⁷ unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) o mililitro (Real Decreto 271/2014).

En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se recogen los principales requisitos en la composición del yogur y de las leches fermentadas según el Codex Alimentarius:

Tabla 2. Composición del yogur y de las leches fermentadas (CODEX STAN 243-2003).

	Leche Fermentada	Yogur
Proteína láctea %	Mín. 2,7 %	Mín. 2,7 %
Grasa láctea %	Máx. 10 %	Máx. 15 %
Acidez (% Ácido láctico)	Mín. 0,3 %	Mín. 0,6 %
Total de UFC/g	Mín. 10 ⁷	Mín. 10 ⁷

1.1.4. PROCESO DE ELABORACIÓN

A continuación, se describen detalladamente cada una de las etapas del proceso tecnológico para la elaboración de la leche fermentada más común, es decir, el yogur:

1. **Preparación de las materias primas:** La elaboración del yogur, comienza por la selección y el mezclado de los ingredientes. Los ingredientes que se incorporan en forma de polvo (estabilizantes, azúcares, etc.) se deben dispersar previamente en parte de la leche y después se añade a la cantidad necesaria, mezclando el ingrediente ya disuelto en la línea principal por la que circula la leche (Romero y Mestres, 2004). Los aditivos, tienen un papel muy importante en la textura, sensación en boca, apariencia y cuerpo del yogur (Shah, 2003).

2. **Higienización:** Durante este proceso se eliminan, restos orgánicos y/o inorgánicos que pueda contener la leche. Puede realizarse mediante un proceso simple de filtración o proceso de depuración por centrifugación. (Tamine y Robinson, 1991).

3. **Estandarización:**

a. **Estandarización o normalización del contenido graso:** El contenido habitual de un yogur en materia grasa es del 0,5 al 3,5 %, por lo que es necesario estandarizar la composición de la leche para cumplir los requisitos legales. Con este objetivo, se desnata una parte de la leche receptionada y se le adiciona con posterioridad el porcentaje de nata que se desea para la elaboración del yogur. Para ello, se emplean centrífugas desnatadoras y equipos de estandarización.

b. **Estandarización o normalización de extracto seco:** El porcentaje de extracto seco magro de la leche destinada a la elaboración de yogur (lactosa, proteínas y sales minerales principalmente) viene regulado por las normas legales de cada país o por las necesidades de los fabricantes para conseguir un producto con unas propiedades físicas y organolépticas concretas. Según lo establecido por la FAO/OMS, el contenido mínimo de sólidos no grasos de origen lácteo del yogur debe ser del 8,2%.

Un extracto seco muy bajo daría un yogur poco firme, que liberaría suero con facilidad, y de bajo aroma, con una exagerada acidez. Mientras que un extracto seco muy elevado daría un yogur excesivamente firme, con posibilidad de aparición de

aromas extraños y la acidez se vería enmascarada por el efecto tampón de las proteínas.

Normalmente, la leche no llega por sí sola al porcentaje de extracto seco establecido por la FAO/OMS (8,2 %), por lo que se puede aumentar de diversas maneras (Shah, 2003):

- Adición de leche en polvo, suero de leche en polvo, caseína en polvo, etc.
- Concentración (evaporación, filtración por membranas, ósmosis inversa o ultrafiltración.)

4. **Incorporación de aditivos:** En la elaboración de algunos tipos de yogur se adicionan estabilizantes y/o emulsionantes a la mezcla base para mantener la textura, viscosidad/consistencia, aspecto y cuerpo deseables. Asimismo, en la elaboración de yogur con frutas, con sabor a frutas o azucarados, se adicionan azúcares o edulcorantes para atenuar la acidez, así como conservadores de la fruta para evitar que esta se deteriore (Tamine y Robinson, 1991).

5. **Homogenización:** Es una etapa muy importante cuya finalidad es reducir al mínimo el tamaño de la fase discontinua (glóbulos grasos) de la emulsión que es la leche y conseguir que sea estable e impedir la separación de la fase grasa formando una capa superficial. Además, mediante la homogenización, se facilita el mezclado. En esta etapa, se alcanzan temperaturas de unos 50- 70 °C aproximadamente y presiones de 100-200 kg/cm², aunque también depende del tratamiento térmico posterior (Romero y Mestres, 2004). Tras la homogenización, la leche debe ser sometida a un tratamiento térmico para que no se produzca la lipólisis de la grasa al destruirse la membrana que rodea al glóbulo graso y hacerlo accesible al ataque del enzima lipasa (Shah, 2003).

6. **Tratamiento térmico:** La finalidad del tratamiento térmico es la destrucción de los microorganismos patógenos y sus formas vegetativas, así como destruir o reducir el número de microorganismos alterantes capaces de interferir en la actividad de bacterias lácticas. Además, la aplicación de calor altera las propiedades físico-químicas de las caseínas y desnaturaliza las proteínas séricas. Como resultado, β -lactoglobulina puede quedar unida a la κ -caseína, mejorando la textura del yogur o la viscosidad del yogur batido, y la descomposición parcial de otras proteínas de suero da

lugar a productos que estimulan la actividad del cultivo iniciador. El tratamiento térmico se realiza a 80-85 °C durante 30 min o 90 a 95 °C durante 5-10 min (Robinson, 1999).

7. **Enfriamiento:** Tras el tratamiento térmico es necesario enfriar la leche hasta una temperatura óptima para la inoculación del cultivo. Esta temperatura de 30-42 °C y una vez alcanzada se inocula el cultivo (Robinson, 1999).

8. **Inoculación:** Después del tratamiento térmico y el enfriamiento a 42 °C de la leche, se produce la inoculación del cultivo, compuesto por igual número de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (Robinson, 1999). El cultivo industrial se inocula a la leche en concentraciones que pueden variar del 0,5 al 1%, siendo preferible no sobrepasar el 5%, ya que crea defectos de aroma y sabor (Shah, 2003).

9. Incubación o Fermentación:

La fermentación tiene lugar por lo general a temperaturas de 40-45 °C hasta alcanzar la acidez deseada (pH 4,4-4,6), momento en que termina el período de incubación. Durante la fermentación, los estárteres del yogur metabolizan la lactosa (**Figura 1**) presente en la leche, dando lugar a la formación de ácido láctico y de otros

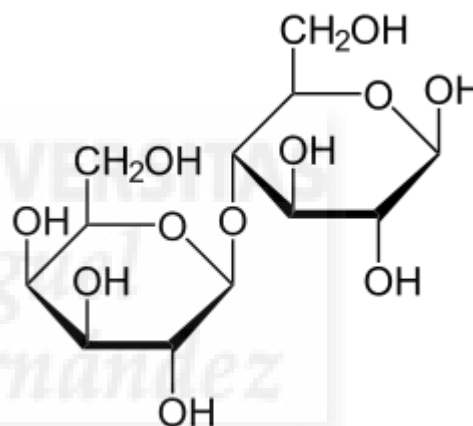


Figura 1. Estructura de la Lactosa.

compuestos importantes. La producción gradual de ácido láctico comienza a desestabilizar los complejos de caseína-proteínas del lactosuero desnaturalizadas, por solubilización del fosfato cálcico y de los citratos y los agregados de micelas de caseína se van asociando y coalescen parcialmente a medida que el pH se aproxima a su punto isoeléctrico, es decir, 4,6-4,7 (Tamine y Robinson, 1991).

10. **Enfriamiento y Refrigeración:** El objetivo del enfriamiento es disminuir la temperatura del coágulo de 30-45 °C a menos de 10 °C (preferiblemente a unos 5 °C) tan rápido como sea posible. Este proceso se puede llevar a cabo de dos formas:

a. Enfriamiento en una sola fase, en la que el coágulo se enfría directamente antes de proceder a la adición de los agentes aromatizantes y al envasado del producto.

b. Enfriamiento en dos fases, en la que en la primera fase del proceso se reduce la temperatura del coágulo de 30-45 °C a 15-20 °C; y en la segunda fase se realiza el enfriamiento hasta temperaturas inferiores a 10°C en cámaras de refrigeración, teniendo lugar en el envase de comercialización, mejorando la viscosidad del producto tras 1-2 días de almacenamiento (Tamine y Robinson, 1991).

11. **Almacenamiento en refrigeración:** La refrigeración del yogur a temperaturas inferiores a 10 °C y su mantenimiento, facilitan la ralentización de las reacciones bioquímicas y biológicas que tienen lugar en el producto. Durante las primeras 24-48 horas de almacenamiento en refrigeración se observa una mejora de las características físicas del coágulo, como resultado de la hidratación y/o estabilización de las micelas de caseína, por lo que resulta aconsejable retrasar la distribución y venta durante 1-2 días (Tamine y Robinson, 1991).



1.1.4.1. DIAGRAMA DE FLUJO

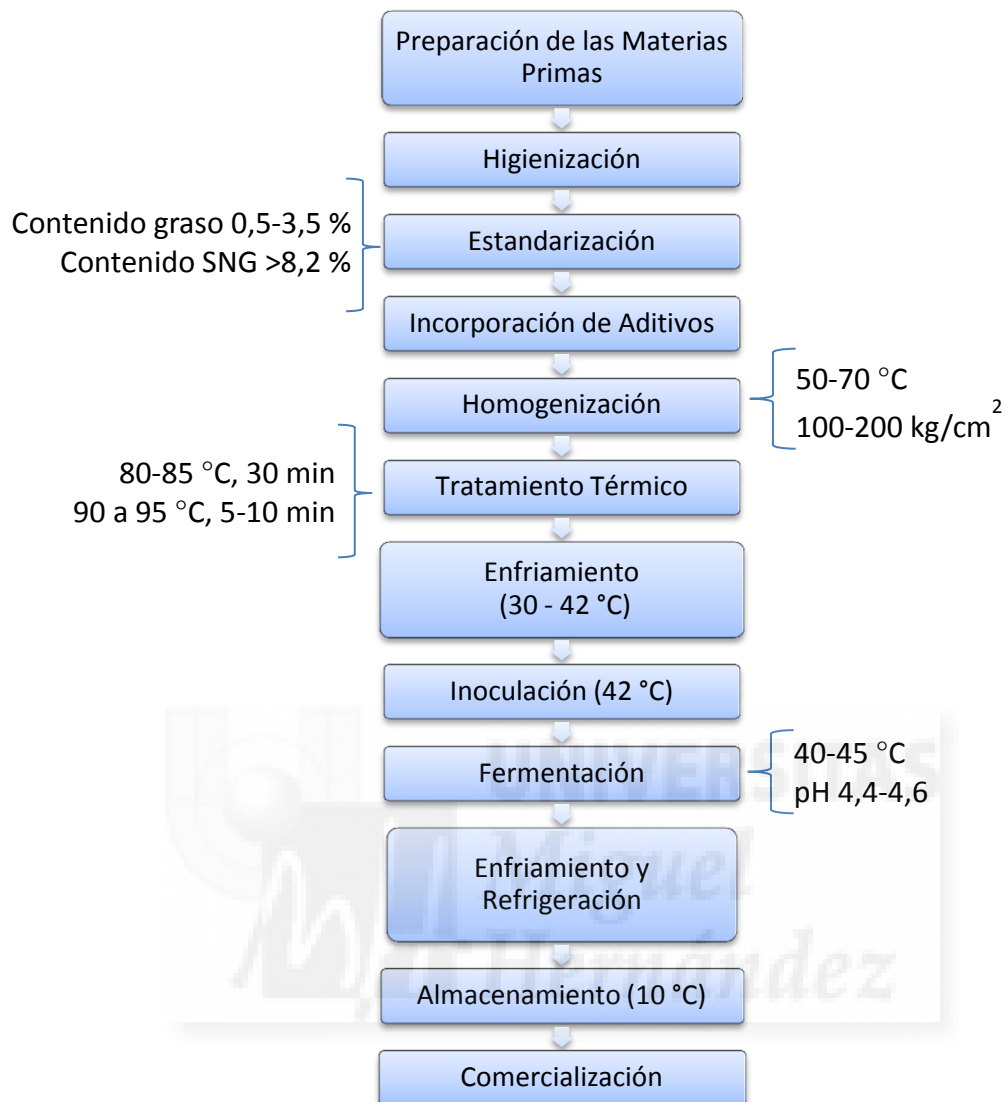


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de yogur. Elaboración propia a partir de Romero y Mestres, (2004); Shah, (2003); Robinson, (1999); Tamine y Robinson, (1991).

1.1.5. COAGULACIÓN ÁCIDA Y pH

La acidificación se obtiene mediante la metabolización de lactosa por la acción de las bacterias lácticas, que emplean este carbohidrato como fuente de energía, dando lugar a ácido láctico, formando así un coágulo liso y homogéneo. Como resultado de la disminución del pH por el aumento del ácido láctico, se reduce la carga de las caseínas y su capa de hidratación produciendo la coagulación por interacciones hidrofóbicas y el aumento de solubilidad de las sales cálcicas (Shah, 2003).

Por este motivo, es importante mantener un control del pH durante el proceso de fermentación de la leche, ya que, como se ha mencionado con anterioridad, a pH próximos a 4,6 (punto isoeléctrico de las proteínas) la formación del coágulo ha sido concluida. Además, seguir curvas de acidificación durante el proceso de fermentación de cada uno de los microorganismos empleados en el estudio, nos proporciona información de la diferencia de actividad que presentan y de los tiempos de fermentación de cada uno de ellos.

1.1.6. IMPORTANCIA PARA EL CONSUMIDOR

Especies de *Lactobacillus* son importantes ingredientes en muchos productos alimenticios, sobre todo en productos lácteos, y una gran parte de la atención se ha dirigido hacia su papel potencial como probióticos. Las cepas que han sido examinadas por sus efectos probióticos incluyen: *L. acidophilus* LA1, *L. acidophilus* NCFB 1748, *Lactobacillus* GG, *L. casei* Shirota, *L. gasseri* ADH y *L. reuteri*.

Los efectos atribuidos al consumo de *Lactobacillus* consisten en la mejora inmunológica, la reducción de actividad de la enzima fecal, la prevención de trastornos intestinales, y la reducción de la diarrea viral. La mayoría de las cepas de probióticos se cree que tienen la capacidad de colonizar el tracto intestinal y con ello un efecto positivo en la microflora, evitando la colonización por patógenos (Batt, 1999). Asimismo, *L. casei* Shirota ATCC 27092 se utiliza en la producción industrial de Yakult, conocido por sus efectos terapéuticos (Gobbetti, 1999).

Pese a los beneficios aportados por la leche fermentada, su consumo doméstico en España se redujo un 1,1 % en 2015 con respecto al año anterior, aunque el gasto per cápita medio (35,02€/persona/año) permaneció sin apenas variación. Además, el precio medio de la categoría de la leche fermentada, se vio incrementado un 0,7 %, situando su precio medio en 2,30 €/kg-L (MAGRAMA, 2015).

Dentro de las leches fermentadas, el yogur continúa siendo la de mayor peso con un 63,8 % (MAGRAMA, 2015), sin embargo, los bifidus, vieron incrementados su volumen de venta de un 19,7% en 2014 a un 20,4 % en 2015. Asimismo, las cuotas de mercado de otras leches fermentadas con *L. casei* también se vieron favorecidas por este incremento, como por ejemplo Actimel, Kaiku Actif y otras pasaron de 54,5 %, 0,3 % y 0,1 %, respectivamente a 56,4 %, 0,4 % y 0,2 % en 2015, respectivamente (Alimarket, 2015). El perfil de hogar consumidor de leches fermentadas se corresponde a familias con presencia de hijos, así como parejas adultas sin hijos, y las comunidades autónomas de El Principado de Asturias, País Vasco y La Rioja son las mayores consumidoras de leches fermentadas. En el lado opuesto se sitúan la Comunidad Valenciana, Aragón y la Región de Murcia (MAGRAMA, 2015).

1.2. BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas se denominan así porque metabolizan los azúcares (la lactosa presente en la leche) para cubrir sus necesidades energéticas, dando lugar a la formación de ácido láctico. El grupo de bacterias lácticas incluye bacilos y cocos Gram positivos, que pueden formar cadenas de longitud variable. Dentro de las bacterias lácticas, el género *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y biológicas muy diferentes (Batt, 1999).

El género *Lactobacillus* es muy diverso y se compone de un número de diferentes especies con poco en común, motivo por el cual nuestro estudio se centra en diferentes cepas de *Lactobacillus* y cómo se ven afectadas las leches fermentadas a su acción. Sus características taxonómicas comunes están restringidas a su forma de barra (con un rango de tamaño de 0,5-1,2 x 1-10 micras) y su capacidad para producir ácido

láctico. Además, son bacterias Gram-positivas y no forman esporas. Los lactobacilos son anaerobios facultativos que, en general, crecen pobremente en el aire. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-40 °C, pero puede crecer en un rango de 5-53 °C. Su pH óptimo crecimiento es de 5,5 a 5,8, pero en general pueden crecer a un pH <5.

Los lactobacilos incluye más de 25 especies únicas, y el primer nivel de diferenciación está basada en la composición del producto final; algunos son homofermentativos, es decir, producen más de un 85 % de ácido láctico como producto final, mientras que otros son heterofermentativos, es decir, producen aproximadamente un 50 % de ácido láctico como producto final, con cantidades considerables de dióxido de carbono, acetato y etanol. Entre las especies homofermentativas encontramos: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. helveticus* y *L. leichmannii*. Las especies heterofermentativas incluyen: *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei* y *L. buchneri* (Batt, 1999).

1.2.1. *LACTOBACILLUS CASEI*

L. casei (**Figura 3**) es una bacteria acidoláctica que se encuentra de forma natural en los vegetales fermentados, en la leche y en la carne, así como en el intestino humano y en el medio ambiente. Sus principales características son:

- Gram-positivos
- Heterofermentativo
- Mesófilos
- No móvil
- No esporulado
- Catalasa negativa
- Temperatura óptima de crecimiento es 30-40 °C
- Toleran temperaturas de 72 °C y pH de entre 3 y 7
- Sus células son varillas de 0,7-1,1 × 2,0-4,0 micras
- Tienden a formar cadenas

- Produce ácido DL láctico y amilasa

Su pared celular contiene L-Lys-D-Asp peptidoglicano y polisacáridos que determinan la especificidad serológica, basado en el contenido de ramnosa, glucosa o galactosa.

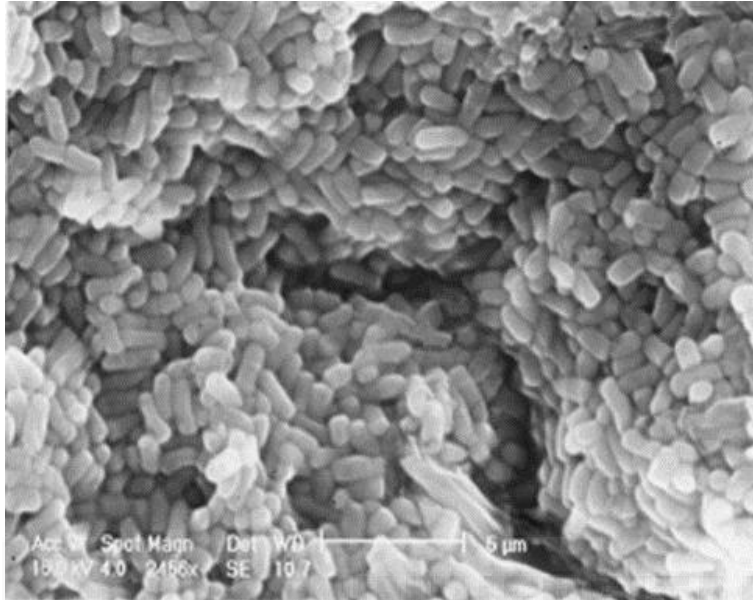


Figura 3. Células de *L. casei* observadas al microscopio electrónico de barrido.

L. casei puede ser distinguido por su capacidad para crecer sobre sustratos (gluconato, malato y pentitales) rara vez utilizados por las bacterias del ácido láctico (Gobbetti, 1999).

1.2.2. *LACTOBACILLUS PARACASEI*

L. paracasei, también se suele encontrar en productos fermentados como la leche, la carne o vegetales. Entre sus principales características encontramos:

- Gram-positivo
- Homofermentativo
- No esporulado
- Forma de bacilo
- Anaerobio
- Temperatura óptima de crecimiento de 37 °C

- Habitual del tracto intestinal humano

(Hung, 2016; ATCC, 2016)

1.2.3. *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

L. helveticus, se suele emplear para la fabricación de queso Suizo. Las principales características del *L. helveticus* son las siguientes:

- Gram-positivo
- Homofermentativo
- No esporulado
- No móvil
- Forma de barra
- Microaerofílico y termófilo
- Temperatura óptima de crecimiento 39-50 °C

(Narva, 2004)

1.2.4. IMPORTANCIA DE LACTOBACILLUS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Existe una diversidad de propiedades metabólicas presentadas por los miembros del género *Lactobacillus* que se encuentran en productos alimenticios fermentados. En estos productos los lactobacilos contribuyen a la conservación, la disponibilidad nutricional y al sabor.

Un gran número de productos lácteos se elaboran utilizando *Lactobacillus*, ya sea solo o en combinación con otras bacterias ácido lácticas. Por ejemplo, *L. bulgaricus* en combinación con *S. thermophilus* se utiliza para producir yogur y un equilibrio entre ellos puede afectar a la calidad del producto.

Otra propiedad de los lactobacilos que se ha vuelto más apreciada es su capacidad para producir bacteriocinas. La incorporación de *Lactobacillus* spp. o la inclusión de una preparación de bacteriocina purificada o semi-purificada como un ingrediente en

un producto alimenticio puede proporcionar un margen de seguridad en la prevención de crecimiento de patógenos (Batt, 1999).

Algunos ejemplos de la aplicación de especies *Lactobacillus* en la industria son:

- En la leche de soja, *L. casei* es un motor de arranque adecuado para su actividad proteolítica y cuando se asocia con *Kluyveromyces fragilis* produce más ácido en un corto período de tiempo.

- Leches de cereales preparadas con trigo, arroz y maíz, harinas y cultivos estárter de yogur muestran una mejora en la calidad organoléptica, cuando se incluye *L. casei* (Gobbetti, 1999).

1.3. CEREZA

La cereza es una fruta que pertenece al género *Prunus* de la familia de las rosáceas, que contiene más de varios cientos de especies distribuidas en todas las regiones templadas del norte. La cereza (*P. avium*) es originaria de Europa y Asia occidental (McCune *et al.*, 2011).

La cereza tiene una alta importancia comercial en España, y entre los factores para la determinación de la aceptabilidad de la cereza por el consumidor encontramos, sólidos solubles totales (SST), acidez, y el color entre los más importantes. Por esta razón, se utilizan una serie de parámetros para establecer el tiempo óptimo para la recolección, siendo el color de la piel es más fiable. El desarrollo de color rojo típico de la cereza se utiliza como indicador de calidad y de maduración, y se debe a la acumulación y el perfil de antocianinas (Serrano *et al.*, 2009).

1.3.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

El término calidad está relacionado con el grado de excelencia y ausencia de defectos de un producto fresco, que implica atributos sensoriales (apariencia, color, textura, sabor y aroma), nutritivos y propiedades funcionales, siendo los atributos sensoriales los que caracterizan el interés del consumidor hacia el producto.

Desde el punto de vista de la calidad de la cereza, el color es fundamental para mantener una apariencia natural del fruto. Sin embargo, durante el almacenamiento el color puede ser alterado por la acción de la luz, temperatura, oxígeno, iones de metales y enzimas (Stintzing y Carle, 2004). Otro factor a tener en cuenta es la firmeza, ya que un excesivo ablandamiento del fruto es uno de los principales factores responsables de las limitaciones de su vida útil, almacenamiento y comercialización, dado que los consumidores prefieren frutos con textura elevada y firmeza. Asimismo, el ablandamiento acelerado también contribuye a un aumento de la aparición de daños físicos durante la manipulación, y aumenta la susceptibilidad a plagas y enfermedades (Goulao y Oliveira, 2008).

Además de la apariencia externa y cambios en la textura de los frutos, el aroma, el sabor y el flavor se están convirtiendo en factores clave para determinar la elección de compra de un fruto.

1.3.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La cereza es considerada un alimento con una cantidad significativa de nutrientes importantes y componentes bioactivos de los alimentos, como la vitamina C y fibra, además de antocianinas que promueven la salud, quercetina, y los carotenoides. Se han demostrado que esos compuestos han mejorado o inhibido varias actividades biológicas relevantes (estrés oxidativo, producción de ácido úrico, control de la glucosa, etc.), lo que sugiere que tienen potencial para la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, y otras enfermedades inflamatorias (McCune *et al.*, 2011).

Entre los compuestos presentes en la cereza, son de especial interés las antocianinas y polifenoles debido a sus propiedades antioxidantes. En las cerezas, los dos polifenoles dominantes son el ácido cafeoiltartárico y ácido 3-pcoumaroylquinic. Sin embargo, las cerezas se caracterizan por tener antocianinas como principales compuestos fenólicos, aun siendo los compuestos fenólicos menores (Serrano *et al.*, 2009).

1.3.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y ANTOCIANINAS

Las cerezas son una fuente importante de polifenoles en la dieta humana, conteniendo tanto cantidades importantes de antocianinas y como de polifenoles. Las cerezas contienen un estimado de 160-170 mg de polifenoles totales en una porción de 100 g, siendo imposible por el momento estimar la dosis óptima de consumo de cerezas en términos de salud (McCune *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos contribuyen a la calidad de la fruta y al valor nutricional en términos de modificación de color, sabor, aroma y también para proporcionar efectos beneficiosos para la salud (Serrano *et al.*, 2005).

Las antocianinas representan los principales pigmentos hidrosolubles visibles al ojo humano, proporcionando coloraciones roja, morada y azul a muchas frutas, verduras y granos de cereales. Pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos (Figura 4). Se denominan antocianos a los glicósidos de las antocianidinas (aglicón), pero es frecuente utilizar el término antociano englobando tanto la forma glicosilada como la propia antocianidina.

El color de las antocianinas depende de los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio, es decir, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo (Aguilera *et al.*, 2011).

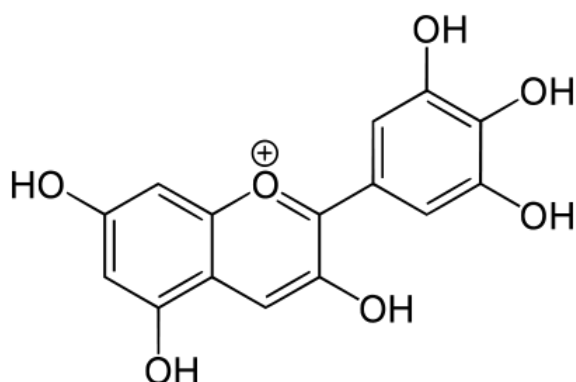


Figura 4. Estructura Antocianina.

Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa *et al.*, 1999) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer las implicaciones reales de antocianinas en estas propiedades promotoras de la salud, (Aguilera *et al.*, 2011).

A modo resumen podríamos concluir que los compuestos fenólicos presentes en la cereza, así como las antocianinas, dependen tanto del estado de maduración como de la variedad de la cereza (Díaz-Mula *et al.*, 2009).

Vistos los beneficios que aportan tanto leches fermentadas como consumo de fruta, y la tendencia a consumir productos sin azúcares añadidos y con fruta fresca, resulta de gran interés evaluar la posibilidad de obtener leches fermentadas con fruta. En este estudio se propone añadir cereza por su riqueza en compuestos bioactivos, y evaluar varios microorganismos y dos estados de maduración de los frutos para determinar las condiciones óptimas que aseguren un alto mantenimiento de las poblaciones microbianas y una alta capacidad antioxidante de la fruta.

2

OBJETIVOS

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la adición de puré de cereza (variedad *Sweetheart* en estados de maduración 8 y 12) a leches fermentadas por 3 cepas de *Lactobacillus* (*L. helveticus* CECT 542, *L. casei* CECT 475, *L. paracasei* CECT 277) con la finalidad de determinar el efecto de la cepa, estado de maduración de la cereza y tiempo de almacenamiento en;

- Poblaciones de lactobacilos
- pH
- Parámetros de color
- Estabilidad de los compuestos fenólicos y antocianinas
- La actividad antioxidante total (hidrosoluble y liposoluble) que aporta la cereza.

En este trabajo, pretendemos identificar las condiciones idóneas para garantizar altos recuentos de lactobacilos, color rojo agradable, óptimas propiedades antioxidantes y elevado contenido final en polifenoles y antocianos.

3

MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández

3.1. PLAN DE TRABAJO

En el presente Trabajo Fin de Grado se prepararon leches fermentadas a partir de las bacterias *Lactobacillus helveticus* CECT 542, *Lactobacillus paracasei* CECT 277 y *Lactobacillus casei* CECT 475. Para cada una de ellas se llevaron a cabo tres ensayos: a) control: no adición de cereza, b) adición de cereza *Sweetheart* en estado de maduración comercial, y c) adición de cereza *Sweetheart* en estado de maduración avanzado. El estado de las cerezas se definió según Serrano *et al.*, (2005), denominándose “comercial” a las recolectadas en estado de maduración 8 (estado en el que la cereza presentaba una coloración rojo “brillante”) y “avanzado” para las del estado 12 (estado en que la coloración de la cereza era “morada”). Se analizaron a día 0, 1 y 10 tras la elaboración de la leche fermentada.

Los códigos empleados durante el desarrollo del estudio, y por lo tanto tipos de leche fermentada fueron:

- **C:** *L. casei* control, sin adición de puré de cereza.
- **CB:** *L. casei* con adición de puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración comercial.
- **CM:** *L. casei* con adición de puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración avanzado.
- **P:** *L. paracasei* control, sin adición de puré de cereza.
- **PB:** *L. paracasei* con adición de puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración comercial.
- **PM:** *L. paracasei* con adición de puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración avanzado.
- **H:** *L. helveticus* control, sin adición de puré de cereza.
- **HB:** *L. helveticus* con adición de puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración comercial.
- **HM:** *L. helveticus* con adición de puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración avanzado.

Se realizaron determinaciones de pH, recuentos microbianos, parámetros de color, medida de polifenoles totales, antocianos totales y capacidad antioxidante, durante su almacenamiento en refrigeración en tiempo 0, 1 y 10 días.

3.1.1. MATERIAL VEGETAL

La variedad de cereza seleccionada para el estudio fue *Sweetheart* en diferentes estados de maduración: en estado de maduración 8 y 12 (**Figura 5**), correspondientes a estados de maduración comercial, que coincide con la acumulación de antocianinas y oscurecimiento de la fruta, y cuatro días después, etapa de maduración que asegura que estos frutos



Figura 5. Cereza en estado de maduración 8 y 12, respectivamente.

lleguen a los consumidores con las máximas propiedades organolépticas, nutricionales y funcionales (**Figura 6**). El tamaño máximo de la cereza se alcanzó en la etapa 12, sin embargo, respecto a los parámetros de color, se mostró los valores más altos en las etapas tempranas del desarrollo (1-8) y se observó una disminución continua en etapas posteriores (Serrano *et al.*, 2005).

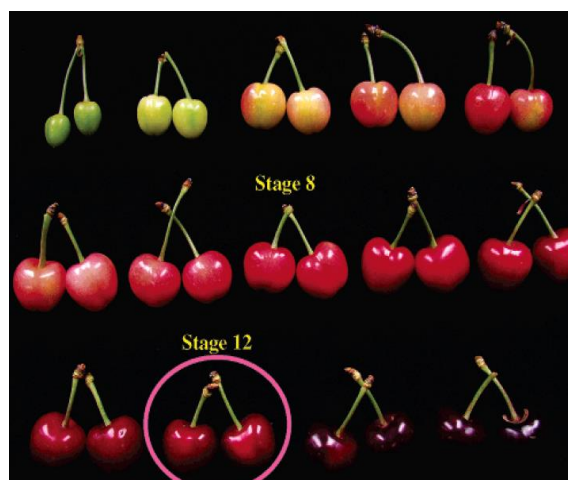


Figura 6. Muestra las cerezas en las 14 etapas de desarrollo (de arriba a abajo y de izquierda a derecha, etapas 1-14). Fuente: Serrano *et al.*, 2005.

Esta variedad de cereza, se seleccionó porque no presenta diferencias significativas entre el estado de maduración comercial 8 y el estado de maduración 12 (el comercial más 4 días) en cuanto al peso de la fruta, sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Brix), acidez total y firmeza (Díaz-Mula *et al.*, 2009).

Para la determinación de las condiciones idóneas de preparación para adicionar a la leche, se realizaron unos ensayos previos con puré de cereza y zumo de cereza para ver cómo se comportaban los fenoles y antocianos tras varios días de congelación. Pudimos comprobar como la elaboración del puré es más respetuosa con la conservación de los compuestos bioactivos frente al zumo, por lo que seleccionamos esta forma de preparado.

Para elaborar el puré, las cerezas, en ambos estados de maduración, se pesaron ya deshuesadas y se trituraron mediante una licuadora y debido a que el proceso de selección del material vegetal se llevó acabo al inicio del estudio, el puré se distribuyó en pequeños lotes y se llevó a congelación hasta el momento de su incorporación a la leche.

Tanto a las cerezas como al puré, se le midieron polifenoles totales, antocianos y actividad antioxidante liposoluble e hidrosoluble.

3.1.2. RECUPERACIÓN DE LAS CEPAS PURAS

Se recuperaron las cepas puras de los microorganismos seleccionados para el estudio: *L. casei*, *L. paracasei* y *L. helveticus*. Estos microorganismos estaban almacenados en medio MRS (de Man Rogosa Sharpe caldo, Oxoid) con un 30 % de glicerol a -25° C. Los viales llevaban almacenados un máximo de 4 meses y las cepas se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia.

Con la finalidad de realizar las fermentaciones con cultivos activos en fase exponencial de crecimiento se recuperaron las cepas, y se trabajó con el tercer pase activo. En primer lugar, se inoculó el microorganismo en 2 tubos con 9 mL de MRS caldo estéril (autoclavados durante 15 min a 121° C). Una vez inoculados, se llevaron a la estufa para su incubación en las siguientes condiciones:

- *L. casei*: 37 °C durante 24 horas en aerobiosis.
- *L. paracasei*: 37 °C durante 24 horas en aerobiosis.
- *L. helveticus*: 37 °C durante 24 horas en aerobiosis

Una vez concluido el tiempo de incubación del microorganismo en la estufa, comprobamos su crecimiento mediante el desarrollo de turbidez y comparación con escala de MacFarland. Tras el primer pase, y una vez que se comprobó el crecimiento del microorganismo, se realizaron los dos siguientes pases, el segundo en 50 mL de MRS caldo y el tercero al 1 % en leche desnatada pasteurizada 30 min a 80 °C (leche control, leche con 15 % de cereza en estado de maduración comercial y leche con 15 % de cereza en estado de maduración avanzado). La cereza se añadió con posterioridad a la pasteurización de la leche para evitar desestabilizar la leche durante el tratamiento térmico. La leche inoculada se distribuyó en duquesitas estériles de capacidad de 60 mL debidamente etiquetadas y que se llevaron a incubación en la estufa a 37 °C hasta pH 4,7.

3.1.3. ELABORACIÓN DE LAS LECHES FERMENTADAS

Para cada una de las bacterias lácticas, realizamos tres tipos de leche fermentada distinta: leche fermentada control, leche fermentada con puré de cereza *Sweetheart* en estado de producción comercial y leche fermentada con puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración avanzado.

- **Control:** La leche en polvo desnatada reconstituida al 10 % (Central leche Asturiana), se pasteurizó a 80 °C durante 30 min aproximadamente en un baño de agua. Tras ser enfriada hasta alcanzar los 45 °C, se inoculó un 1 % del cultivo activado y se distribuyó en recipientes estériles de 60 mL de capacidad (**Figura 7**), que se incubaron a 37 °C hasta alcanzar pH 4,7 (**Figura 8**).



Figura 7. Distribución en recipientes estériles.

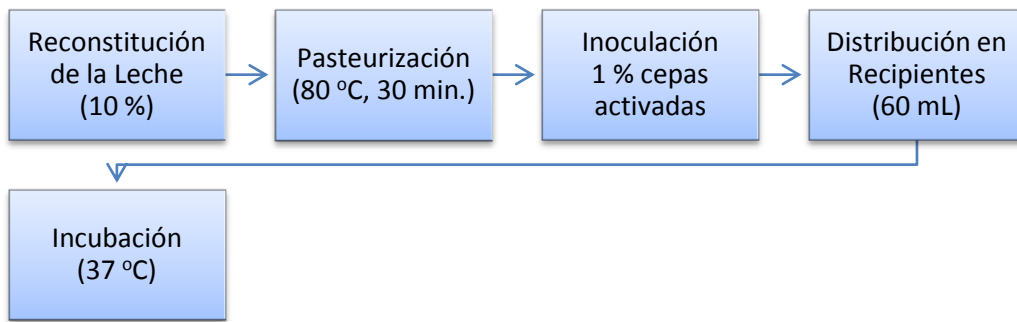


Figura 8. Proceso de elaboración de la leche control.

• **Leches fermentadas con puré de cereza *Sweetheart* en estado de maduración**

comercial y avanzado: Al igual que en el control, la leche desnatada fue reconstituida al 15 % y pasteurizada a 80 °C durante 30 min. Tras ser enfriada, se mezcló en dos frascos distintos, con 9 g de puré de cereza en cada estado de maduración (8 y 12) y 51 g de leche fermentada (15 %). De este modo, la concentración final de sólidos lácteos era



Figura 9. Incubación en la estufa a 37 °C.

del 10 % (igual que en la muestra control). Una vez incorporada la cereza se inoculó un 1 % del cultivo activado y se distribuyó en 20 recipientes estériles de 60 mL (10 para cada variedad de cereza), que se incubaron a 37 °C (Figura 9) hasta pH 4,7 (Figura 10).

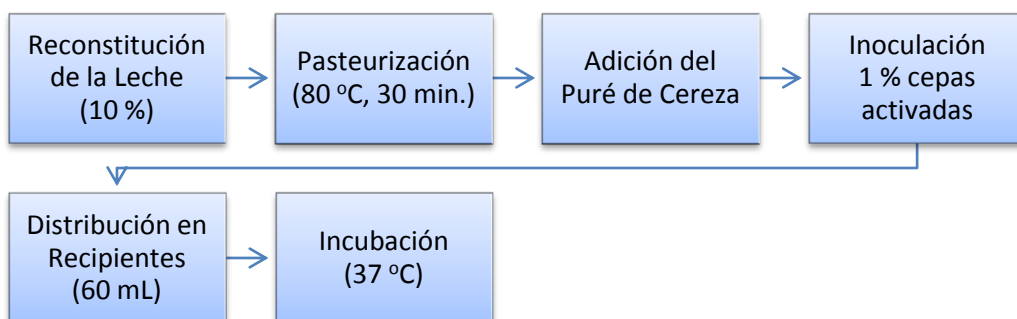


Figura 10. Proceso de elaboración de las leches con puré de cereza.

3.1.4. DETERMINACIÓN DEL COLOR

Durante la fermentación de la leche se evaluó el color CIEL*a*b* de las mimas mediante un colorímetro Minolta CRC200 (Minolta Camera Co. Osaka, Japan) con aplicador para la medición de líquidos CR-A70 (Minolta Camera Co. Osaka, Japan), usando un iluminante D65 y un observador de 10 °. Los resultados se expresaron de acuerdo a las coordenadas L* (luminosidad), a*(rojo-verde), b*(azul-amarillo), C*(Croma, $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) y h° (tono, $h^{\circ} = \arctg(b^*/a^*)$).

Para ello, se agitaron previamente las leches fermentadas, con el fin de homogeneizar la muestra, y se introdujeron en un tubo para su medición. Las medidas se realizaron por duplicado a tiempo 0, 1 y 10 días.

3.1.5. DETERMINACIÓN DEL pH

Para la determinación del pH se utilizó un pH-metro modelo Crison GLP 21 (Figura 11). Se realizaron las medidas por duplicado a tiempo 0, 1 y 10 días.



Figura 11. Medición de pH con el pH-metro modelo Crison GLP 21

3.1.6. RECUENTO MICROBIOLÓGICO

Con el fin de estudiar la supervivencia de las bacterias lácticas durante la fermentación de la leche se evaluó su crecimiento a tiempos 0, 1 y 10 días para cada una de las cepas inoculadas, siendo el tiempo 0 el control de los mismos.

La prueba se realizó por duplicado para cada uno de los microorganismos empleados. En cada muestreo sembramos en placas Petri estériles con MRS agar sus respectivas diluciones (10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7}).

El procedimiento del recuento microbiológico es el siguiente:

- Preparación de las diluciones: la preparación de las diluciones se realizó empleando como diluyente agua de peptona, previamente autoclavada y mantenida en refrigeración hasta la realización de las diluciones.
- Preparación de los medios de cultivo: el medio de cultivo empleado para los microorganismos seleccionados en el estudio es el MRS agar, que se elaboró siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.
- Inoculación de las bacterias lácticas y recuento microbiológico (**Figura 12**):
 - Primero, se agitó la leche fermentada para conseguir uniformidad en el muestreo, y mediante una pipeta se tomó 1 mL que se llevó a un tubo con 9 mL de agua de peptona (dilución 10^{-1}).
 - A continuación, se agitó el tubo de la dilución 10^{-1} y se pipeteó 0,1 mL del contenido del mismo, que fue pasado a otro tubo con 9,9 mL de agua de peptona, consiguiendo la dilución 10^{-3} .
 - Seguidamente, para conseguir las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} se repitió el proceso llevado a cabo para la dilución 10^{-3} .
 - Finalmente, se sembró en una placa Petri estéril 1 mL de cada dilución (10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7}) y se añadió una doble capa de MRS agar. Primero, añadimos una primera capa del medio de cultivo y una vez solidificada, se añadió la

segunda, con el objetivo de generar un ambiente anaerobio para el crecimiento de las bacterias lácticas.

Tras 48 horas de incubación en la estufa a 37 °C, realizamos el recuento microbiológico de las placas.

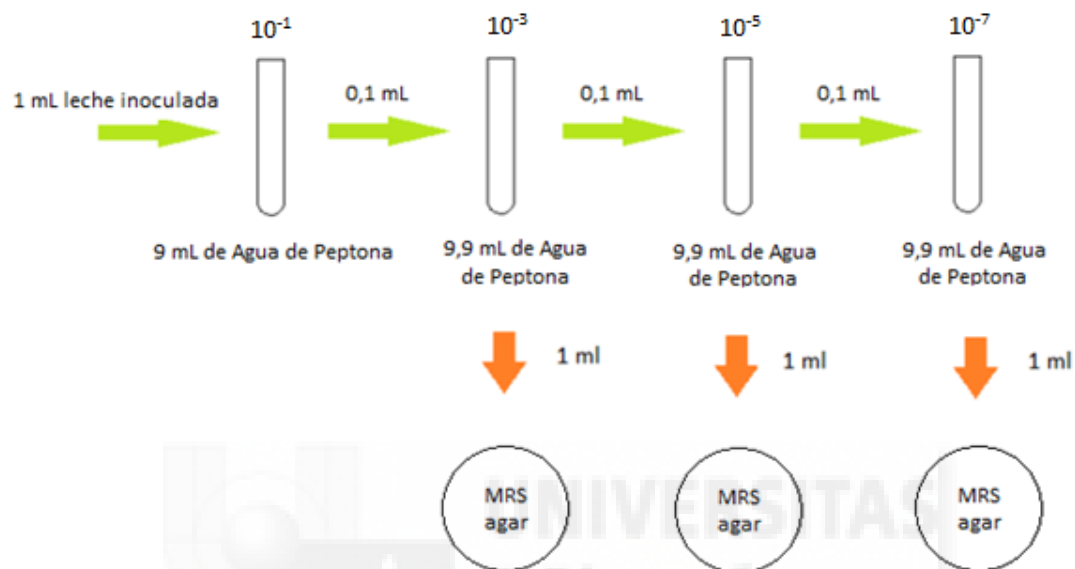


Figura 12. Procedimiento de recuento microbiológico.

3.1.7. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y ANTOCIANOS

Para la determinación de los polifenoles totales y antocianos, fue necesario realizar una extracción previa, que era similar para ambos compuestos. La determinación, se realizó a tiempo 1 y 10 días.

Extracción: se añadieron 2 g de la muestra a un tubo con 15 mL de metanol diluido (80:20) y FNa, y se agitó empleando un desintegrador de tejido vegetal Polytron® modelo PT3100 a 4000 r.p.m. durante 60 s. Es importante mantener la muestra fría durante el proceso de preparación, por lo que se mantuvo sumergida en un baño de hielo. Por último, se centrifugó a 15000 r.p.m. durante 10 min a una temperatura de 4 °C utilizando el modelo C30P (CENTRIFUGE, B. Braun, Biotech).

Polifenoles: Una vez realizada la extracción, se tomaron 200 μL de muestra diluida (1:2) y se llevaron a tubos de ensayo con 300 μL de tampón fosfato (para la realización del blanco, se emplearon 500 μL de tampón fosfato). Seguidamente, se añadieron a los tubos preparados 2,5 mL del reactivo de Folin, que es el que realiza la reacción con los fenoles. A los 2 min, añadimos 2 mL de Na_2CO_3 , obteniendo una disolución con un color verde. Posteriormente, se llevaron los tubos a un baño a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, alcanzando un color violeta-azulado (**Figura 13**) y por último se midió la absorbancia de las muestras por espectrofotometría en cubetas de plástico de 2,5 mL a 760 nm en un espectrofotómetro modelo Uvikon XS, Bio - Tek Instruments.

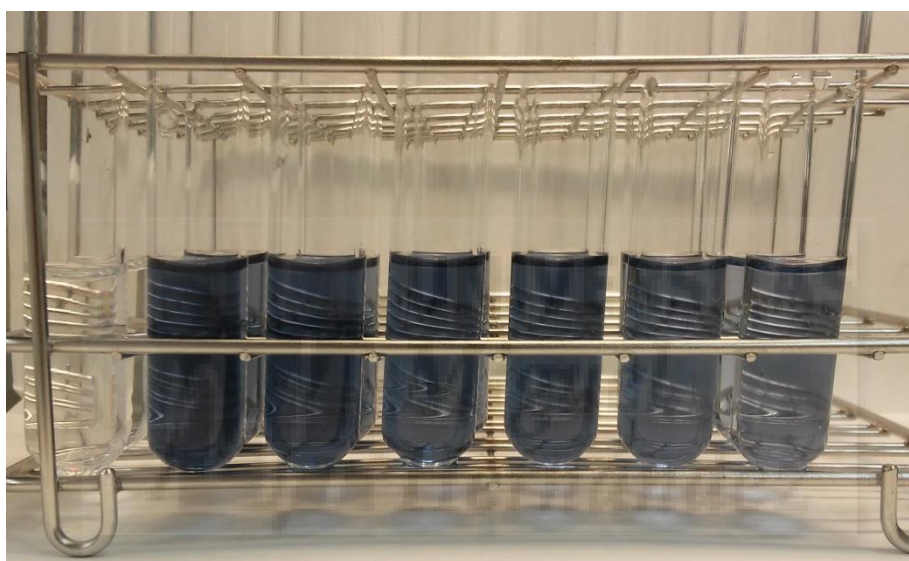


Figura 13. Obtención de color violeta-azulado tras el baño a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min.

Antocianos:

1. Para comenzar a trabajar necesitamos activar el Sep-Pack. Para ello, hicimos pasar por el Sep-Pack 5 mL de metanol (calidad HPLC), 5 mL de agua ultra pura y 5 mL de HCl (0,01 N). Entre ellos, antes de retirar la jeringuilla con la que se inyectan, es importante retirar el micro-filtro.
2. Se pasaron 5 mL de la muestra por el Sep-Pack ya activado. Estos 5 mL se pasaron tres veces, por lo que fueron recogidos tras el primer y el segundo pase.

3. Se pasaron por el Sep-Pack 5 mL de agua ultra pura para limpiar las sustancias hidrosolubles (el microfiltro quedó teñido de rojo debido a la presencia de los antocianos).
4. Finalmente, para extraer los antocianos (**Figura 14**) pasamos 3 mL de metanol + HCl (1%).

La medida de los antocianos se realizó en un espectrofotómetro modelo Uvikon XS, Bio - Tek Instruments a 520 nm en cubetas de cuarzo. Como blanco se utilizó el extractante (metanol + HCl).



Figura 14. Extracción antocianinas.

3.1.8. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la capacidad antioxidante total se llevó a cabo según el método de Cano *et al.*, (1998), adecuado posteriormente por Arnao *et al.*, (2001), para determinar la actividad antioxidante (AAT) en la fase hidrosoluble (FH) y liposoluble (FL). Dicha metodología analítica se dividía en tres fases:

1º FASE: EXTRACCIÓN VEGETAL. Los extractos se prepararon pesando en tubos de centrífuga 2 g de material vegetal en el caso de las muestras de cereza fresca y puré, y 5 g de muestra para las extracciones de yogur. A dichos tubos, se les añadían 15 mL de tampón fosfato + fluoruro de sodio (FNa) que actuaban de agente extractante de aquellos compuestos hidrosolubles. De forma continuada y trabajando

en campana de gases, se adicionaban 10 mL de acetato de etilo, que al igual que el solvente anterior, actuaba de agente extractante pero en este caso de compuestos liposolubles.

Las muestras se homogenizaron empleando un desintegrador de tejido vegetal Polytron® modelo PT3100 a 4000 r.p.m. durante 40 s y se centrifugaron a 15000 r.p.m. durante 15 min a una temperatura de 4 °C utilizando el modelo C30P (CENTRIFUGE, B. Braun, Biotech).

2º FASE: SEPARACIÓN DE FASES. Las dos fases quedaban visiblemente separadas tras el centrifugado de los tubos (**Figura 15**), por lo que bastó con extraer y guardar en hielo 1 mL de la fase superior o Fase Liposoluble (FL) y 1 mL de la fase inferior o Fase Hidrosoluble (FH).

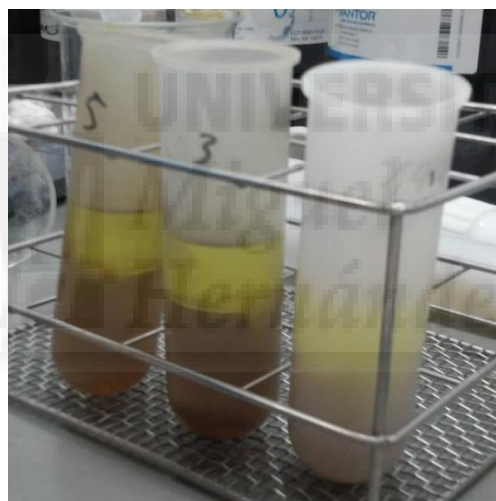


Figura 15. Visualización de la fase hidrosoluble y liposoluble tras el centrifugado de los tubos.

3º FASE: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE. La determinación de la AAT en la FH se realizó a 730 nm utilizando como blanco tampón glicina. Para la medida de la absorbancia a tiempo 0 se utilizaron: 25 µL de ABTS 5 mM + 25 µL de agua oxigenada (H₂O₂) 0,5 mM + 25 µL de enzima peroxidasa 5 µM llevados a un volumen final aproximado de 1 mL con tampón glicina – HCl 50 mM de pH 4,5. Seguidamente se añadieron 25 µL de extracto y se anotó la bajada de absorbancia a los

30, 60 y 90 segundos desde la adición de la muestra. La adición de los antioxidantes que contiene la muestra provoca una disminución de los radicales ABTS de color verde que se generan con la mezcla de reactivos, lo que produce un descenso de color y como consecuencia de la absorbancia que es proporcional a la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra (Serrano *et al.*, 2009).

La AAT de la FL se cuantificó de manera similar, pero utilizando etanol absoluto en lugar de tampón glicina con el fin de conseguir que se solubilizaran los compuestos apolares presentes en la fracción liposoluble de los extractos vegetales y adicionando 50 μ L de muestra en lugar a las cubetas.

Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro modelo Uvikon XS, Bio - Tek Instruments. En ambos casos, la AAT se expresa como equivalentes de trolox, por 100 g de peso fresco, ya que este compuesto, un análogo estructural de la vitamina E, es soluble tanto en disolventes orgánicos como inorgánicos. Para ello, se realizaron rectas de calibrado con cantidades conocidas de trolox, tanto en medio de Tampón Glicina como en medio etanólico y que se usaron para cuantificar la AAT en la FH y FL, respectivamente. Para cada una de las extracciones, la cuantificación se realizó por duplicado y los datos son la media \pm ES. Las ecuaciones de la recta de calibrado que se emplearon para la fase hidrosoluble y liposoluble, respectivamente, fueron:

$$Y = 9,185x - 0,375$$

Siendo:

Y = Concentración de Trolox (μ g/cubeta).

x = Unidades de absorbancia (ABS).

r² = Valor de 0,993

$$Y = 7,849x - 0,229$$

Siendo:

Y = Concentración de Trolox (μ g/cubeta).

x = Unidades de absorbancia (ABS).

r² = Valor de 0,994

3.1.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron sometidos a un procedimiento de análisis lineal multivariante con el programa estadístico SPSS Statistics versión 23, que se utilizó para determinar las diferencias significativas entre los distintos tipos de leches fermentadas (factores fijos: bacteria, tipo de cereza y tiempo en días; factores variables: recuentos, pH y color (L^* , a^* , b^*)). Para la comparación entre medias se ha utilizado el test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.



4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández

A los resultados obtenidos se les realizó la media y la desviación estándar para los parámetros de pH, recuentos microbianos, cambios de color, polifenoles, antocianos y actividad antioxidante liposoluble e hidrosoluble a tiempo 0, 1 y 10 días.

4.1. pH Y RECIENTOS MICROBIANOS

En las gráficas del presente apartado, se representa la evolución de pH, la evolución de los recuentos de cada microorganismo y el estado de maduración de la cereza añadida, así como los resultados del test de Tukey.

4.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de pH y de los recuentos microbianos para cada una de las leches fermentadas (control, 15 % de cereza en estado 8 y 15 % de cereza en estado 12; **Figura 16**) fueron los siguientes (**Tabla 3**):

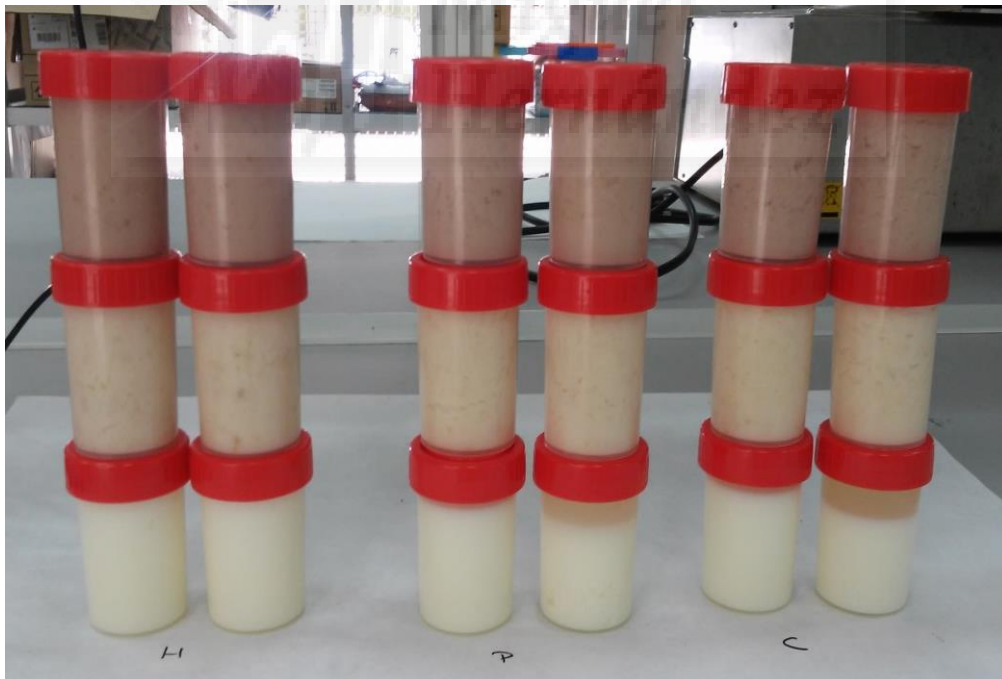


Figura 16. Leches fermentadas control, 15 % de puré de cereza en estado 8 y 15 % de puré en estado 12.

Tabla 3. Evolución de los parámetros pH y recuentos de leches fermentadas a lo largo del tiempo de fermentación.

		Tiempo (días)			
		0	1	10	
pH	H	S	6,64 ± 0,08	3,52 ± 0,02	3,75 ± 0,05
		B	6,01 ± 0,01	3,59 ± 0,05	3,72 ± 0,07
		M	6,16 ± 0,01	3,55 ± 0,02	3,71 ± 0,08
	C	S	6,66 ± 0,02	4,98 ± 0,21	4,54 ± 0,03
		B	6,05 ± 0,03	4,15 ± 0,01	4,03 ± 0,02
		M	6,20 ± 0,01	4,14 ± 0,04	3,96 ± 0,05
	P	S	6,68 ± 0,01	5,27 ± 0,12	4,24 ± 0,06
		B	6,05 ± 0,02	3,91 ± 0,04	3,92 ± 0,04
		M	6,15 ± 0,01	3,90 ± 0,03	3,93 ± 0,01
Recuentos (Log UFC)	H	S	6,92 ± 0,01	9,14 ± 0,09	8,60 ± 0,03
		B	6,92 ± 0,01	9,28 ± 0,02	8,61 ± 0,05
		M	6,92 ± 0,01	9,59 ± 0,07	8,91 ± 0,20
	C	S	6,83 ± 0,04	9,14 ± 0,05	8,67 ± 0,08
		B	6,83 ± 0,04	9,66 ± 0,54	9,22 ± 0,04
		M	6,83 ± 0,04	9,48 ± 0,12	9,28 ± 0,10
	P	S	6,61 ± 0,03	9,35 ± 0,04	9,42 ± 0,17
		B	6,61 ± 0,03	9,48 ± 0,02	9,29 ± 0,08
		M	6,61 ± 0,03	9,77 ± 0,31	9,31 ± 0,08

Las letras H, C, y P, corresponden al tipo de microorganismo encargado de la fermentación, a saber: *L. helveticus*, *L. casei* y *L. paracasei*, respectivamente. Las letras S, B y M, corresponden al tipo de cereza empleado, siendo S la letra designada a la leche control, es decir, sin adición de cereza, la letra B para la cereza en estado 8 y la letra M para la cereza en estado 12.

En la **tabla 3**, encontramos las medias de los parámetros de pH y recuentos para cada tipo de leche fermentada: leche control fermentada con *L. helveticus*, leche control fermentada con *L. casei*, leche control fermentada con *L. paracasei*, leche con puré de cereza en estado 8 fermentada con *L. helveticus*, leche con puré de cereza en estado 8 fermentada con *L. casei*, leche con puré de cereza en estado 8 fermentada con *L. paracasei*, leche con puré de cereza en estado 12 fermentada con *L. helveticus*, leche con puré de cereza en estado 12 fermentada con *L. casei* y leche con puré de cereza en estado 12 fermentada con *L. paracasei*.

A continuación, se representan los parámetros estudiados con diferencias significativas ($P < 0,05$), a los que se les aplica el test de TUKEY para comparar las medias (**Tabla 4**).

Tabla 4. Grupos homogéneos determinados por la prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$) para el pH y las poblaciones microbianas determinados en las leches fermentadas, los factores independientes: bacteria (H: *L. helveticus*, C: *L. casei*, P: *L. paracasei*), el tiempo (1, 1 y 10 días) y tipo de puré de cereza añadido (S: control, B: puré de cereza en estado de maduración 8 y M: puré de cereza en estado de maduración 12)

	H	C	P	S	B	M	0	1	10
pH	a	c	b	c	a	b	c	b	A
Recuentos	a	ab	b	a	ab	b	a	c	B

Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre valores medios, siendo a el menor valor y aumentando según orden alfabético.

Los resultados del análisis estadístico indicaron que existieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para todos los parámetros pH de las muestras analizadas en las variables fijas en el estudio: bacteria, tipo de puré de cereza y tiempo. *L. helveticus* dio lugar a las leches fermentadas con menor pH, seguida por *L. paracasei*, el mayor pH correspondió al uso de *L. casei*. En general la presencia de cereza rojo brillante conllevó un menor pH, seguida de las leches con cereza madura lo cual indica que en presencia de cereza el proceso de acidificación fue más intenso y también el crecimiento de bacterias lácticas tal y como veremos a continuación. Por su parte, la acidificación continúa con el tiempo, tal y como era de esperar. Los recuentos microbianos se vieron afectados de forma significativa por las mismas variables, aunque los valores fueron próximos y los mayores recuentos se obtuvieron para *L. paracasei* y *L. casei*. Resulta interesante que *L. helveticus*, pese a dar lugar a los pH más bajos no es quien tiene las mayores poblaciones microbianas, esto es debido, posiblemente a una mayor capacidad para metabolizar los azúcares presentes.

La presencia de cereza favoreció de forma significativa las poblaciones microbianas, en especial la cereza madura. Los recuentos se vieron afectados por el tiempo, a tiempo cero tenemos las muestras recién inoculadas, a día 1 se obtuvieron los mayores recuentos que descendieron ligera, pero significativamente a los 10 días (**Tabla 4**).

4.1.2. pH

Como podemos observar (**Figura 17 A**), el descenso de pH en la leche fermentada por *L. helveticus* sigue la misma tendencia, independientemente de la adición o no de puré de cereza y de su estado de madurez. Por ende, apreciamos que tanto la leche control, como las leches fermentadas con puré de cereza en estado de maduración 8 y 12, descienden en el primer día hasta un pH cercano a 3,5, y en días posteriores va aumentando ligeramente hasta pH 3,7 aproximadamente en el décimo día.

L. casei y *L. paracasei* sí muestran diferencias en la acidificación de la leche a causa de la adición de puré de cereza. Tal y como apreciamos en las gráficas anteriores (**Figura 17 B y C**), a tiempo 1 las leches fermentadas con *L. casei* y *L. paracasei* a las que se les había adicionado cereza en estado de maduración 8 y 12, presentaron una disminución similar de pH cercano a 4, descendiendo progresivamente hasta el día 10, en el caso de *L. casei*, y manteniéndose más o menos constante en el caso de *L. paracasei*. En estudios con fibra de cítricos, no se detectaron diferencias significativas entre el pH debido a tiempo de almacenamiento o la presencia de la fibra (Sendra *et al.*, 2008).

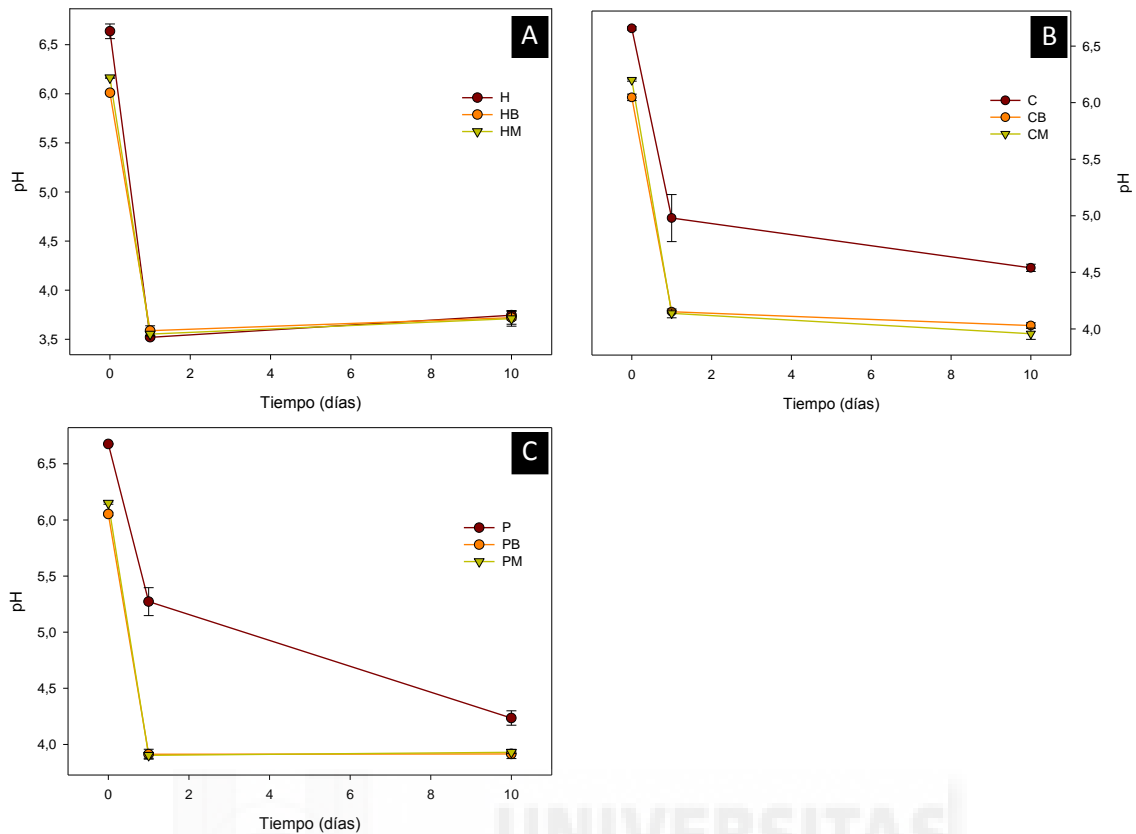


Figura 17. A: evolución del pH en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (H control, HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)); B: evolución del pH en leche fermentada por *Lactobacillus casei* con puré de cereza (C control, CB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), CM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)); y C: evolución del pH en leche fermentada por *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (P control, PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

Vistos los resultados de pH, es evidente que *L. helveticus* ha sido el cultivo que mejor ha fermentado tanto con puré como sin él, llegando hasta un pH cercano a 3,5. Sin embargo, los microorganismos que mejor han fermentado en presencia de puré de cereza (en ambos estados de maduración) han sido *L. casei* y *L. paracasei*. Por tanto, la adición de puré de cereza favorece la acidificación en leches fermentadas con *L. casei* y *L. paracasei*, pero no influye en la fermentación de *L. helveticus*, siendo este último el que exhibió un pH más bajo. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Trigueros *et al.*, (2012), en lo que observaron que el yogur rico en granada tenía un mayor pH en comparación con el yogur control. Por supuesto se trata de una fruta de

composición diferente y, como veremos más adelante, el zumo de granada inhibió el crecimiento de bacterias lácticas.

4.1.3. RECIENTOS

Tal y como se aprecia en las gráficas siguientes (**Figura 18 A, B y C**), la adición de puré de cereza y su estado de madurez influyen en el crecimiento de las tres bacterias lácticas seleccionadas. Durante los primeros días de fermentación, *L. helveticus* y *L. paracasei*, mostraron un crecimiento inicial más elevado para el caso de la leche fermentada con puré en estado de maduración 12, aunque los recuentos de *L. helveticus* fueron significativamente inferiores a los de *L. paracasei* (**Figura 18 C**). El crecimiento de ambos microorganismos fue mucho menor en el control y la leche con puré en estado 8, siendo los recuentos de esta última superiores al control. Sin embargo, *L. casei* (**Figura 18 B**) mostró un crecimiento mayor en la leche con puré en estado 8 y recuentos mucho menos elevados para la leche control y la leche con puré en estado 12. Sendra *et al.*, (2008) mostraron que la adición de fibra de cítricos contribuye a un aumento la supervivencia de *L. casei* por encima de 8 log UFC/ml, revelando que las leches fermentadas enriquecidas con fibra de cítricos son buenos vehículos para incorporar bacterias probióticas. Este microorganismo ha experimentado el mismo comportamiento en presencia de puré de cereza en estado 8. Las bacterias lácticas no se comportan de igual modo en presencia de todas las frutas, así, Trigueros *et al.*, (2012), observaron que el yogur rico en granada tenía menores recuentos de bacterias ácido-lácticas en comparación con el yogur control.

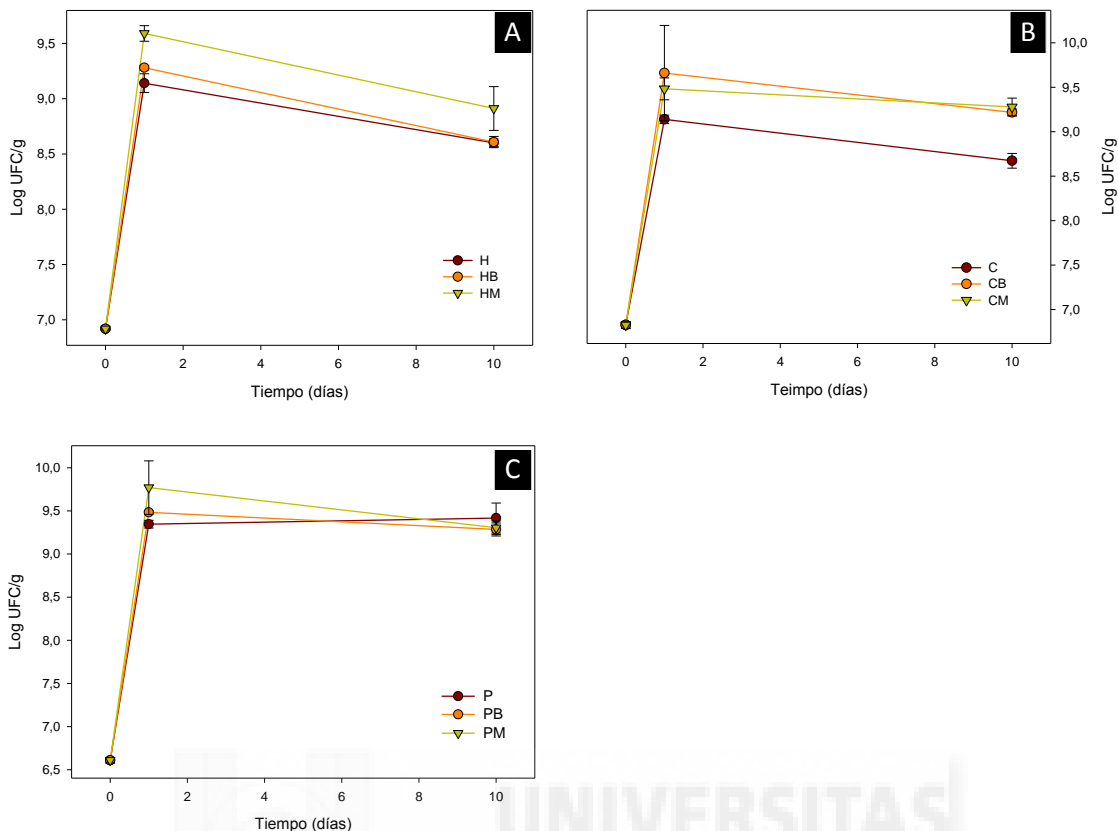


Figura 18. A: evolución de los recuentos microbianos en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (H control, HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)); B: evolución de los recuentos microbianos en leche fermentada por *Lactobacillus casei* con puré de cereza (P control, PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)); y C: evolución de los recuentos microbianos en leche fermentada por *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (P control, PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

Conforme avanzan los días de fermentación, los recuentos de *L. helveticus*, *L. casei* y *L. paracasei*, independientemente de la adición de puré o no y de su estado de maduración, alcanzaron valores más o menos similares, siendo *L. casei* el que presentó mayor diferencia entre la adición o no de puré, y *L. helveticus* el que presentó menores recuentos, pero mostrando diferencia entre la leche con puré de cereza en estado 12 y las otras. Las tres BAL seleccionadas para el estudio son capaces de metabolizar la fructosa (Sharpe *et al.*, 1957), de modo que cabría esperar que todas ellas hubieran crecido mejor en presencia de cereza morada (estado de maduración 12) que aporta más fructosa (Tabla 5, Díaz-Mula *et al.*, 2009) y más azúcares totales 14,3% frente al

9% en cereza brillante, en cambio *L. casei* creció mejor en presencia de cereza rojo brillante (estado de maduración 8). En ambos tipos de cereza el contenido en azúcares es elevado y no supone un factor limitante para el crecimiento.

Tabla 5. Perfil de ácidos y azúcares en cereza en estado de maduración 8 y 12.

% ACIDOS Y AZÚCARES DE CEREZA		
	Brillante	Morada
Glucosa	4,2	6,3
Fructosa	4,8	7,7
Sacarosa	0,1	0,3
Sorbitol	0,1	0,3
Ácido Málico	0,9	1,2
Ácido Cítrico	0,12	0,2
Ácido Succínico	0,12	0,22
Ácido Ascórbico	0,28	0,82

Fuente: Díaz-Mula et al., 2009.

En general, la cereza en estado de maduración 12, aporta mayor contenido de ácidos y azúcares que la cereza brillante (estado de maduración 8), pero sobre todo se ven destacados la glucosa, fructosa y el ácido ascórbico (**Tabla 5**; Díaz-Mula *et al.*, 2009).

4.2. COLOR

4.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) para cada las leches fermentadas con 15 % de cereza en estado 8 y 15 % de cereza en estado 12, fueron los siguientes (**Tabla 6**):

Tabla 6. Evolución de los parámetros de color de las leches fermentadas con puré de cereza en las distintas etapas de maduración a lo largo del tiempo de fermentación. Las letras HB, HM, CB, CM, PB y PM, corresponden al tipo de microorganismo encargado de la fermentación y al puré de cereza añadido, siendo H, C y P los microorganismos *L. helveticus*, *L. casei* y *L. paracasei*, respectivamente, y B y M la letras para la cereza en estado 8 en estado 12, respectivamente.

		Tiempo (días)		
		0	1	10
HB	L^*	33,76 ± 0,06	33,39 ± 0,06	32,52 ± 0,51
	a^*	0,16 ± 0,02	0,82 ± 0,05	1,23 ± 0,12
	b^*	3,94 ± 0,02	6,17 ± 0,09	6,60 ± 0,22
HM	L^*	28,24 ± 0,04	27,14 ± 0,25	27,85 ± 0,35
	a^*	1,96 ± 0,05	4,07 ± 0,15	3,88 ± 0,06
	b^*	3,11 ± 0,03	5,46 ± 0,10	5,99 ± 0,12
CB	L^*	34,31 ± 0,04	34,95 ± 0,33	33,86 ± 0,07
	a^*	0,02 ± 0,02	0,61 ± 0,05	0,67 ± 0,06
	b^*	4,08 ± 0,03	6,83 ± 0,05	6,75 ± 0,06
CM	L^*	28,30 ± 0,04	29,74 ± 0,28	27,34 ± 0,07
	a^*	1,96 ± 0,01	3,55 ± 0,04	3,60 ± 0,08
	b^*	2,83 ± 0,04	6,14 ± 0,13	5,37 ± 0,07
PB	L^*	33,94 ± 0,25	27,85 ± 0,35	33,17 ± 1,01
	a^*	0,05 ± 0,05	0,63 ± 0,09	0,89 ± 0,13
	b^*	4,22 ± 0,05	6,85 ± 0,14	6,67 ± 0,13
PM	L^*	26,89 ± 0,47	28,04 ± 0,55	28,64 ± 0,16
	a^*	1,84 ± 0,13	3,81 ± 0,15	3,55 ± 0,06
	b^*	2,84 ± 0,02	5,23 ± 0,10	5,80 ± 0,09

A continuación, se representan los parámetros estudiados con diferencias significativas ($P < 0,05$), a los que se les aplica el test de TUKEY para comparar las medias (**Tabla 7**).

Tabla 7. Grupos homogéneos determinados por la prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$) para los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) determinados en las leches fermentadas, los factores independientes: bacteria (H: *L. helveticus*, C: *L. casei*, P: *L. paracasei*), el tiempo (1, 1 y 10 días) y tipo de puré de cereza añadido (B: puré de cereza en estado de maduración 8 y M: puré de cereza en estado de maduración 12)

	H	C	P	B	M	0	1	10
L^*	a	b	a	b	a	a	b	a
a^*	c	a	b	a	b	a	b	b
b^*	a	c	b	b	a	a	b	c

Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas ($P < 0,05$) entre valores medios, siendo a el menor valor y aumentando según orden alfabético

En primer lugar, es necesario destacar que en esta parte del estudio estadístico se ha excluido el análisis del color del control. Los resultados del estudio estadístico mostraron que existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para el parámetro a^* entre los distintos tipos de microorganismos fermentadores y el tipo de puré de cereza empleado. *L. casei* dio lugar a las leches fermentadas con el valor más bajo del parámetro a^* , seguida por *L. paracasei* y el mayor correspondió a *L. helveticus*. En este parámetro, también influyó el estado de maduración de la cereza, siendo el valor más bajo para el estado 8. Por su parte, el tiempo parece influir solamente al inicio de la fermentación, ya que en días posteriores, 1 y 10, aumentaron los valores de a^* .

Con respecto al parámetro b^* , el resultado de ANOVA indicó que existen diferencias estadísticamente significativas debidas a los microorganismos empleados, al estado de maduración de la cereza añadida y al tiempo. En este caso, fue *L. heveticus* el que presentó el valor más bajo de b^* , seguido de *L. casei* y de *L. paracasei* que obtuvo el valor más alto. Por otro lado, al contrario que ocurría con el parámetro a^* , es el puré de cereza en estado de maduración 8 el que presenta el valor más alto del parámetro b^* . El tiempo de fermentación parece influir notablemente en este parámetro, dado que se va incrementando con forme avanzan los días de fermentación, alcanzando el valor más alto en el día 10.

La luminosidad de las leches fermentadas (L^*) se vio favorecida en la leche fermentada con *L. casei*, obteniendo el valor más alto en contraste con *L. paracasei* y *L. helveticus*, con menor luminosidad. Al igual que en los otros parámetros, la luminosidad se ve influenciada por el estado de maduración del puré de cereza añadido, siendo el valor más alto el de la cereza en estado 8. Asimismo, el tiempo no parece afectar al parámetro L^* , puesto que fueron los días 0 y 10 los que obtuvieron los valores más bajos de luminosidad, mostrando diferencias con el día 1, que presentó el valor más alto (**Tabla 7**).

4.2.2. PARÁMETROS DE COLOR

Tal y como se ha dicho anteriormente, el parámetro L^* se ve afectado por el microorganismo fermentador y el estado de maduración del puré de cereza añadido. En la leche fermentada por *L. helveticus*, cuando se añade cereza brillante la luminosidad desciende con el tiempo de almacenamiento (**Figura 19 A**). Para este mismo estado de maduración, *L. casei* presenta un ligero aumento a tiempo 1, y desciende en el décimo día de fermentación (**Figura 19 B**). La luminosidad en *L. paracasei* desciende significativamente a día 1, pero en días posteriores se recupera hasta alcanzar en el día 10 un valor análogo al día 0 (**Figura 19 C**). En la leche fermentada con puré de cereza en estado 12, *L. helveticus* mantiene más o menos constante su luminosidad, en *L. casei* se incrementa en el día 1, pero en el día 10 se ve reducida y en *L. paracasei*, el parámetro L^* va incrementándose ligeramente con forme avanza en el tiempo. Según García *et al.*, (2005), la luminosidad en las leches fermentadas debe descender debido a la disminución de pH, ya que la estructura gelificada de la leche tiene menos luminosidad que la forma líquida. En este caso no se trata de leche sola sino que lleva puré de fruta adicionada lo cual modificaría la estructura y explicaría el comportamiento opuesto al esperado.

En cuanto al parámetro a^* , *L. helveticus*, *L. casei* y *L. paracasei*, presentan una tendencia similar tanto para el caso de la leche fermentada con puré de cereza en estado 8 como para el estado 12, comenzando este último desde valores más altos de a^* . En las gráficas (**Figura 19 A, B y C**), podemos apreciar como este parámetro

aumenta en los tres microorganismos con respecto al tiempo de almacenamiento, lo que indica el pardeamiento del puré de cereza en estos 10 días. García *et al.*, (2005), en yogures con fibra de corteza naranja, observaron que la sinéresis producida en las leches fermentadas producía una disminución de valores a^* debido a que el suero de leche liberado por el gel contiene riboflavina, que tiene un componente verde muy importante, sin embargo, la adición de fibra de la cereza es muy coloreada, aparentemente disminuía la sinéresis y por tanto se obtienen valores altos de a^* . Coincidiendo con nuestros resultados, Trigueros *et al.*, (2012), mostraron también un aumento del nivel de rojez con el almacenamiento en yogures con granada añadida.

Desde un punto de vista global, el parámetro b^* (componente amarilla si $b^* > 0$) se modifica de manera equivalente al parámetro a^* (**Figura 19 A, B y C**). En todas las leches fermentadas con las distintas bacterias lácticas y los diferentes estados de maduración, el parámetro b^* aumenta desde el día 0 hasta el día 10. Esto, junto con el aumento del parámetro a^* indica un viraje de las leches fermentadas hacia tonos más pardos. Este aumento del parámetro b^* puede deberse a la liberación de pigmentos por parte de la cereza, al igual que le ocurrió a García *et al.*, (2005), con los carotenos de la naranja. Por otro lado, según Serrano *et al.*, (2005), con respecto a los parámetros externos de color de la fruta de la cereza, la luminosidad (L^*) y b^* los valores más altos se mostraron en etapas tempranas del desarrollo, con una disminución lineal hasta etapa 10, momento en el que se mantienen los valores sin cambios hasta el final de la maduración.

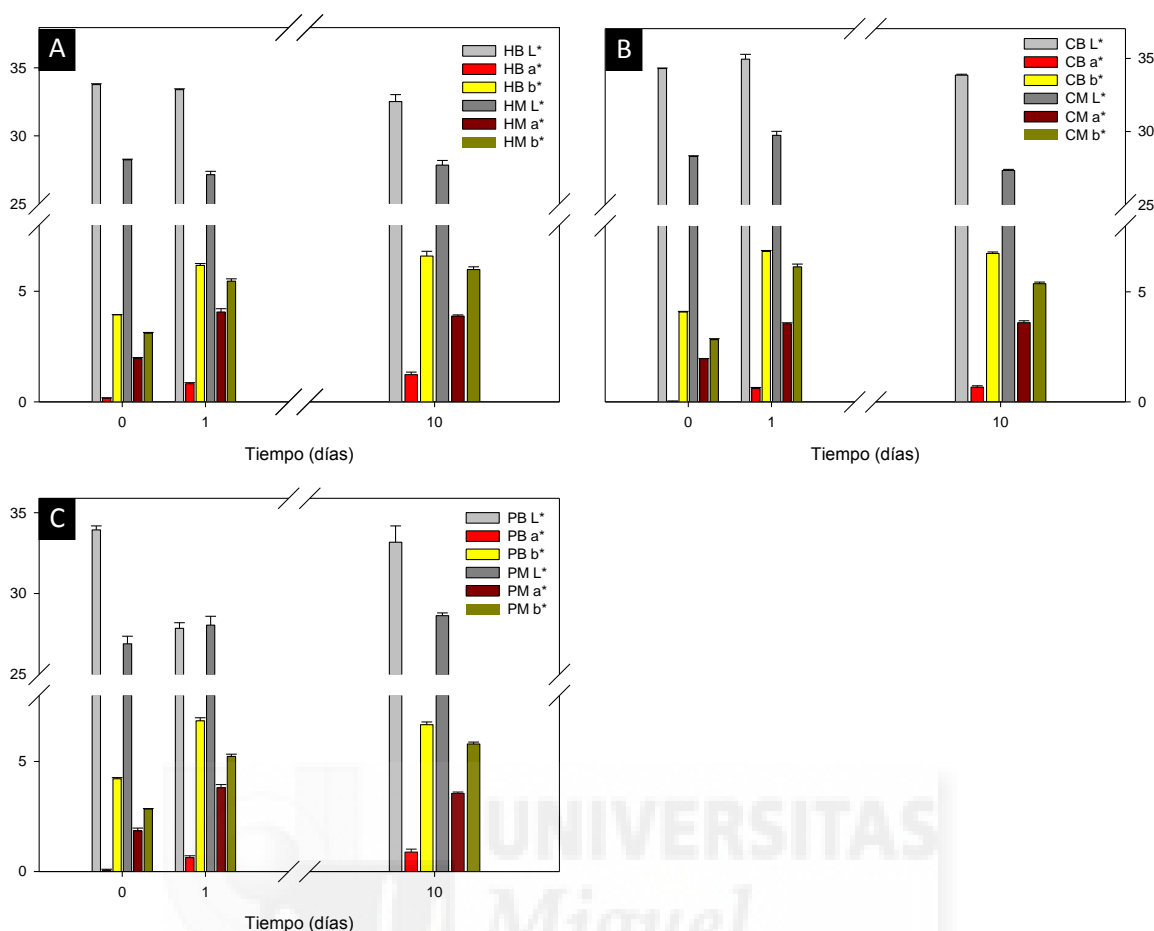


Figura 19. A: evolución de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)); B: evolución del pH en leche fermentada por *Lactobacillus casei* con puré de cereza (CB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), CM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)); y C: evolución del pH en leche fermentada por *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

4.3. POLIFENOLOS, ANTOCIANOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.3.1. COMPARACIÓN ENTRE FRUTA ENTERA, PURÉ Y LECHE FERMENTADA

Previamente a la incorporación de la cereza a la leche fermentada, se realizó una comparativa entre la cereza entera y la cereza en puré previamente a su incorporación a la leche fermentada. Tal y como podemos apreciar en las tabla anterior (**Tabla 8**), la pérdida de fenoles totales, antocianos totales y actividad antioxidante hidrosoluble es mínima, por lo que se optó por incluir la cereza en forma de puré, ya que así la leche

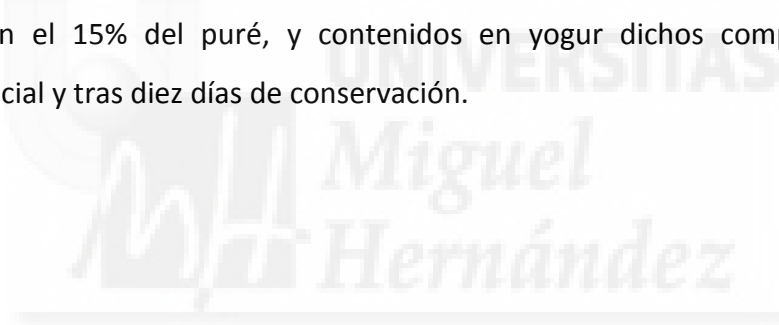
presenta un aspecto más homogéneo y uniforme. Sin embargo, la pérdida de actividad antioxidante liposoluble sí fue algo más notable.

Tabla 8. Resultados de Fenoles totales, antocianos totales y actividad antioxidante liposoluble e hidrosoluble en cereza entera y puré para los estados de maduración 8 y 12.

	Fenoles Totales (mg/100g)	Antocianos Totales (mg/100g)	AAT-H (mg/100g)	AAT-L (mg/100g)
Cereza Brillante	62,13 ± 0,57	16,02 ± 0,39	66,78 ± 3,72	42,33 ± 0,17
Puré Brillante	52,56 ± 0,48	9,84 ± 0,45	58,60 ± 2,04	33,46 ± 2,23
Cereza Morada	119,22 ± 0,67	77,83 ± 1,51	152,55 ± 1,92	62,74 ± 1,10
Puré Morada	108,07 ± 0,31	59,95 ± 0,87	140,42 ± 2,72	52,33 ± 1,86

4.3.2. LECHEs FERMENTADAS

En las siguientes figuras se representa el contenido en fenoles objeto de estudio: contenido en el 15% del puré, y contenidos en yogur dichos compuestos en el momento inicial y tras diez días de conservación.



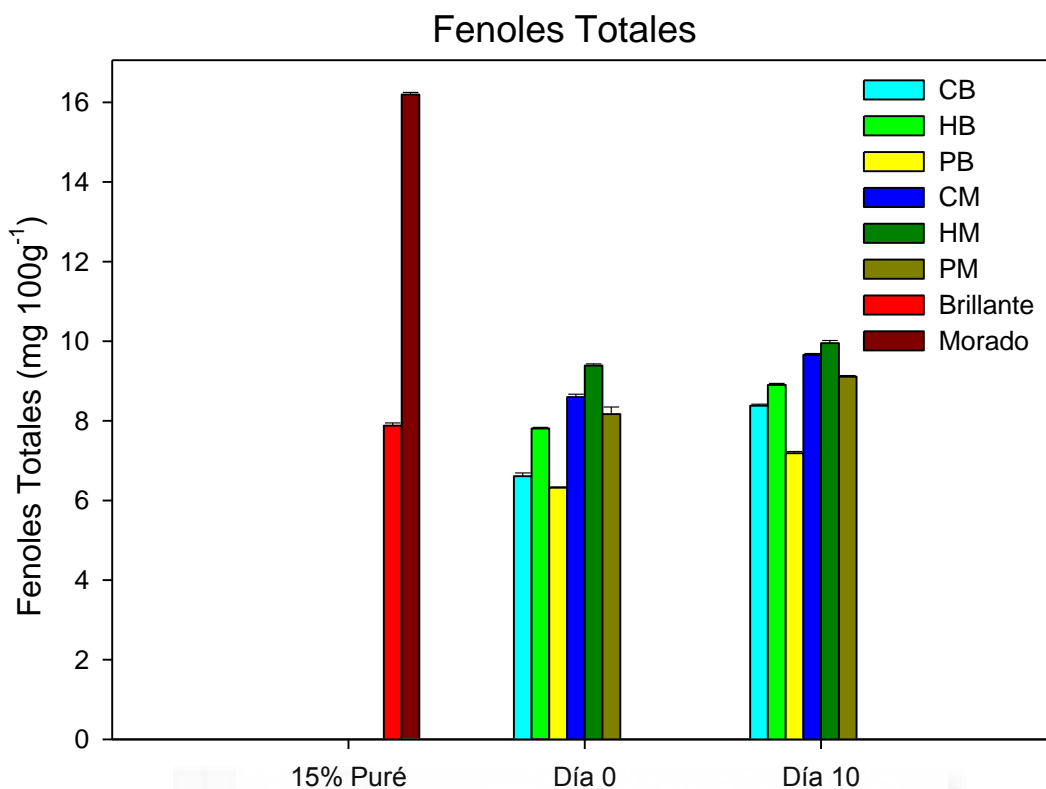


Figura 20. Concentración de fenoles totales ($\text{mg}/100 \text{ g}^{-1}$) en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)), *Lactobacillus casei* con puré de cereza (CB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), CM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)) y *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

La adición de fenoles a la leche mediante la incorporación hasta el 15% de puré de cereza de color rojo brillante y rojo maduro fue de $7,88 \pm 0,07$ y $16,2 \pm 0,05 \text{ mg}/100\text{g}$ respectivamente, estos valores son los esperados según Díaz-Mula et al., 2009. Como podemos apreciar (**Figura 20**), la fermentación (comparación entre valor a tiempo 0 y a tiempo 1) y el almacenamiento (valor a día 10) influyen de manera directa en el contenido de compuestos fenólicos, que presenta un ligero crecimiento del día 1 al día 10. Tanto para la cereza brillante como para la morada, las leches con *L. helveticus* tienen las mayores concentraciones de fenoles en los dos días ensayados, y por el contrario *L. paracasei* tiene los niveles más bajos.

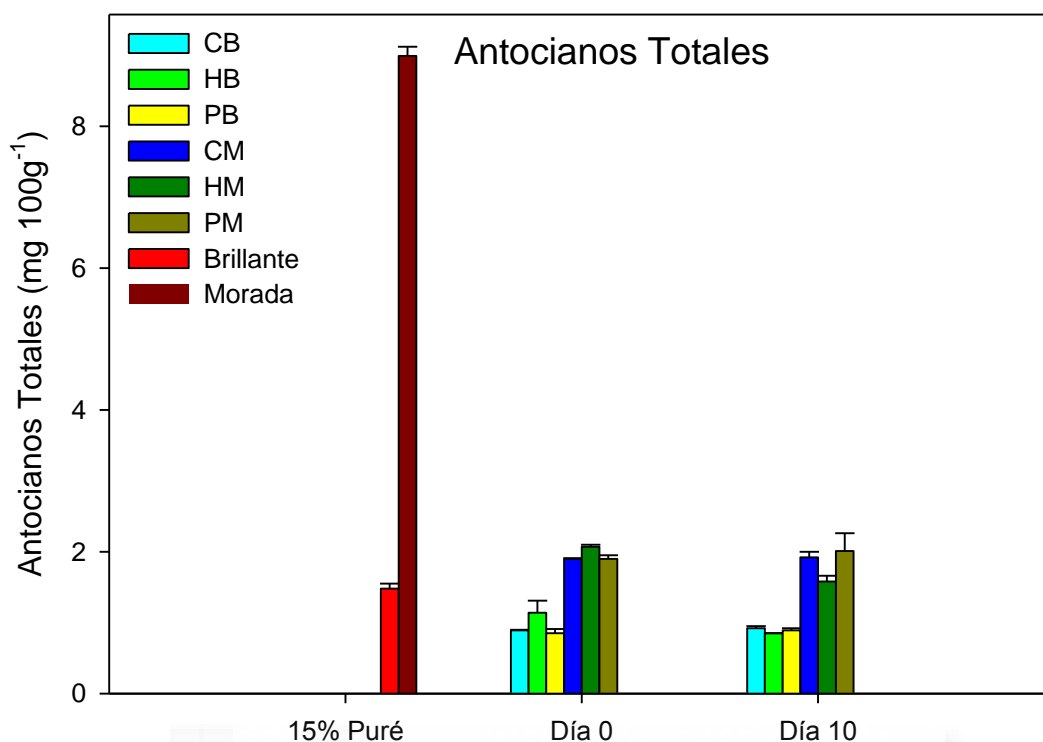


Figura 21. Concentración de antocianos totales ($\text{mg}/100 \text{ g}^{-1}$) en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)), *Lactobacillus casei* con puré de cereza (CB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), CM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)) y *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

La concentración de antocianos que se añaden al yogur con la cereza morada en puré son muy superiores a los añadidos en el mismo formato con la cereza de color brillante, estos resultados coinciden con los expuestos por Díaz-Mula et al., (2009). Igualmente, los antocianos totales (**Figura 21**), presentan una mayor concentración en las leches con puré en estado 12, al igual que ocurría con los compuestos fenólicos. Esto es debido a que el contenido de antocianinas de cerezas, aumenta exponencialmente a medida que la fruta madura. Serrano *et al.*, (2005), mostraron que las antocianinas totales aumentan exponencialmente desde la etapa de maduración 8 hasta la etapa 14, coincidiendo con la concentración total de compuestos fenólicos. Los antocianos, se mantienen más o menos estables en el tiempo en las leches fermentadas por *L. casei* y *L. paracasei*, independiente del estado de maduración de la cereza añadida y sufren un notable descenso en el caso de *L. helveticus*. La estructura

de las antocianinas influye en la estabilidad durante el proceso de fermentación, de forma que los monoglucósidos son menos estables que diglucosidos. La antocianina cianidina-3-O-glucósido, predominante en las cerezas (Serrano *et al.*, 2005), es la de las más afectadas en el proceso de fermentación (Trigueros *et al.*, 2014), por lo que cabría esperar una disminución de las antocianinas. Sin embargo, Trigueros *et al.*, (2014), también revelaron que la mayoría de las antocianinas permanece unida a las proteínas de la leche debido a que los monoglucósidos de flavonoides muestran fuertes afinidades de unión con dichas proteínas, concordando con nuestros resultados obtenidos.

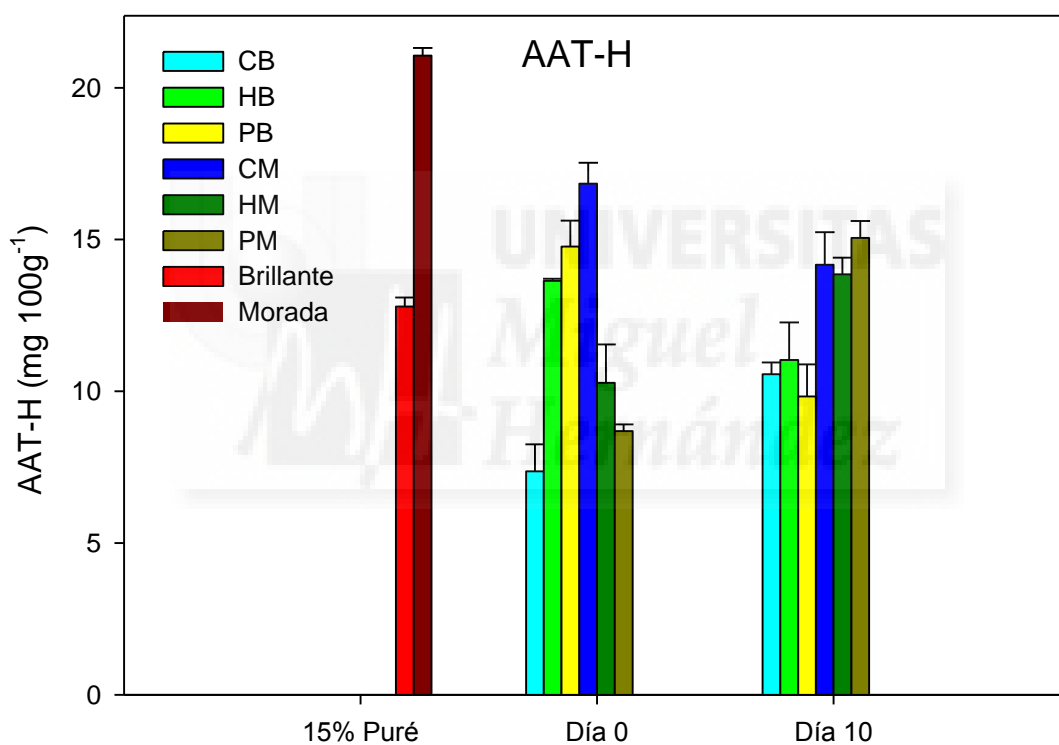


Figura 22. Actividad antioxidante hidrosoluble (mg/100 g⁻¹) en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)), *Lactobacillus casei* con puré de cereza (CB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), CM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)) y *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

La actividad antioxidante hidrosoluble y liposoluble, aumenta a lo largo del proceso de maduración de las cerezas, siendo la actividad hidrosoluble mayor que la liposoluble (Díaz-Mula *et al.*, 2009). En líneas generales, la adición del puré de cereza al yogur lleva consigo una disminución de su carácter antioxidante hidrosoluble (**Figura 22**). Para el caso de leche fermentada con las cepas objeto de estudio *L. casei*, *L. helveticus* y *L. paracasei* no se pudo observar un efecto claro sobre la actividad antioxidante durante la conservación.

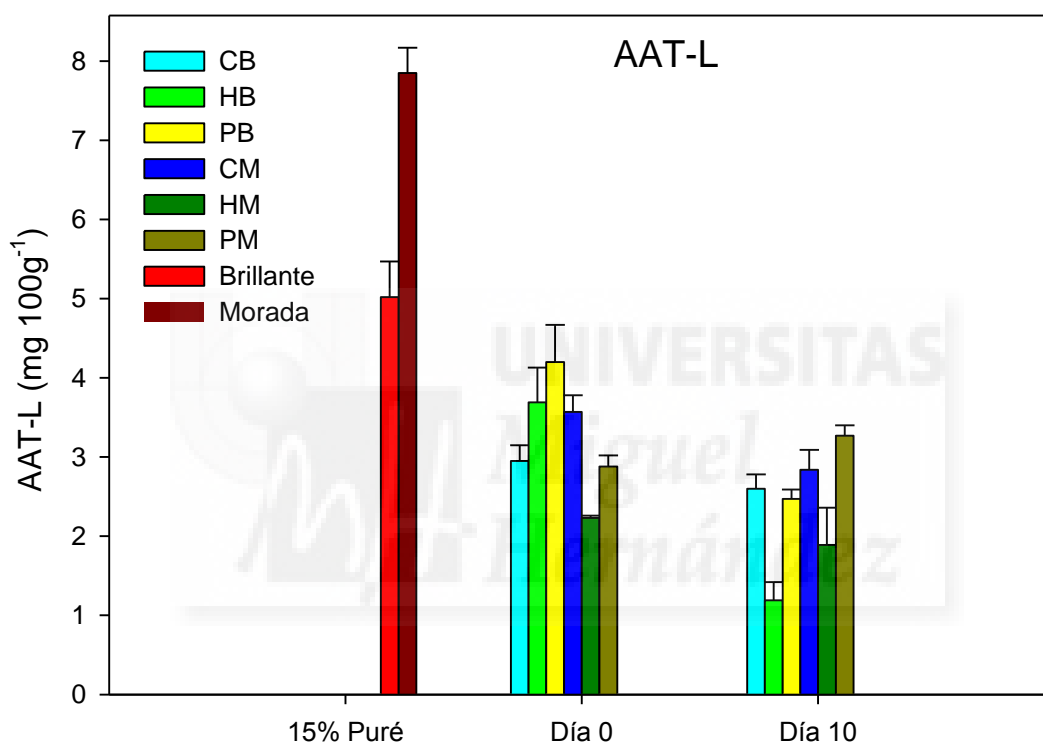


Figura 23. Actividad antioxidante liposoluble (mg/100 g⁻¹) en leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* con puré de cereza (HB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), HM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)), *Lactobacillus casei* con puré de cereza (CB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), CM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)) y *Lactobacillus paracasei* con puré de cereza (PB con 15% de cereza rojo brillante (estado de maduración 8), PM con 15% de cereza madura (estado de maduración 12)).

Al igual que la actividad antioxidante hidrosoluble, la actividad antioxidante liposoluble (**Figura 23**) muestra un descenso generalizado con forme avanzan los días de almacenamiento, lo que concuerda con una disminución de la actividad antioxidante de los polifenoles de granada que obtuvieron Trigueros *et al.*, (2014), a medida que las

interacciones de proteínas-polifenoles aumentaba con el tiempo, manifestándose como excepción la leche fermentada por *L. paracasei* con puré de cereza en estado 12.



5

CONCLUSIÓN

UNIVERSITAS
*Miguel
Hernández*

La adición de puré de cereza estimula la acidificación en leches fermentadas los *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*. La acidificación por *Lactobacillus helveticus* no se ve afectada por la presencia de cereza, aunque es la bacteria láctica con mayor actividad acidificante de las ensayadas.

Las cepas que mejor viabilidad durante los 10 días de almacenamiento son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y por último, *Lactobacillus helveticus*. En todos los casos los recuentos superan las 6 log ufc/g y por tanto son adecuados para leches fermentadas comerciales.

Las leches fermentadas con puré de cereza experimentan cambios de color con el tiempo de almacenamiento hacia tonalidades pardas puesto que tanto a^* como b^* aumentan.

La leche con puré de cereza en estado de maduración 12, conserva mejor los compuestos fenólicos y los antocianos totales tras 10 días de fermentación. *L. helveticus* mantiene mayores concentraciones de fenoles y *L. casei* y *L. paracasei* de antocianos.

Por tanto, para el desarrollo de leches fermentadas con puré de cereza sería interesante utilizar *Lactobacillus helveticus* ya que es una cepa de rápida acidificación, con recuentos adecuados, elevado valor de a^* (rojo), además el mantenimiento de compuestos fenólicos es notable y la pérdida que presenta de antocianos y actividad antioxidante hidrosoluble es mínima. Asimismo sería interesante emplear el puré de cereza en estado 12, por el mayor contenido de fenoles, antocianos y una mayor actividad antioxidante total con respecto al estado 8.

6

BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAS

Miguel

Hernández

- Aguilera, M., Reza, M.C., Gerardo, R., Madinaveitia, C., Meza, J.A. Propiedades funcionales de las antocianinas. (2011). Ciencias biológicas y de la salud, Vol. 13, 16-22.
- Alimarket Gran Consumo. Refrigerados lácteos: Mercadona agita el sector. (Diciembre de 2015). Publicaciones ALIMARKET, S.A., Madrid, España, 206-229.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. (2001). Food Chemistry, Vol. 73, 2, 239-244.
- ATCC, American Type Culture Collection. The Global Biosource Center <http://www.atcc.org/products/all/25302.aspx> (Consultada en junio de 2016).
- Batt, C.A. *Lactobacillus*, Introduction. (1999). En: Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. Richard K. Robinson, Elsevier, Oxford, 1134-1136.
- Cano, A., Hernández-Ruíz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M., Arnao, M.B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. (1998). Phytochemical Analysis, Vol. 9, 196-202.
- Codex Alimentarius. Norma para leches fermentadas (CODEX STAN 243-2003). <http://www.fao.org/docrep/015/i2085s/i2085s00.pdf>
- Díaz-Mula, H.M., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., Zapata, P.J., Guillén, F., Serrano, M. Sensory, nutritive and functional properties of sweet cherry as affected by cultivar and ripening stage. (2009). Food Science and Technology International, Vol. 15, 6, 535-543.
- García, F.J., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas- Barberá, E., Pérez-Álvarez, J.A., Sendra, E. Effects of orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage. (2005). Wiley Periodicals, Vol. 30, 6, 457-463.
- Gobbetti, M. *Lactobacillus*, *Lactobacillus casei*. (1999). En: Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. Richard K. Robinson, Elsevier, Oxford, 1157-1164.

- Goulao, L.F., Oliveira, C.M. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. (2008). Trends in Food Science and Technology, Vol. 19, 4-25.
- Hung, S., Tseng, W., Pan, T. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 ameliorates impaired glucose tolerance induced by a high-fat, high-fructose diet in Sprague-Dawley rats. (2016). Journal of Functional Foods, Vol. 24, 472-481.
- MAGRAMA, 2015. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf Consultado el 14 de junio de 2016.
- McCune, L.M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N.R., Thomson, C.A. Cherries and Health: A Review. (2011). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 51, 1-12.
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., Someya, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3- glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. (1999). Journal Agricultural and Food Chemistry, Vol. 47, 3, 1083-1091.
- Narva, M. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk and milk-derived bioactive peptides (Cpp, Ipp, and Vpp) on calcium and bone metabolism. (2004). Institute of Biomedicine, Pharmacology.
- Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el yogur o yoghurt. Ministerio de la presidencia «BOE» núm. 102, de 28 de abril de 2014. Referencia: BOE-A-2014-4515.
- Robinson, R.K. Fermented milks, Yoghurt. (1999). En: Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. Richard K. Robinson, Elsevier, Oxford, 784-791.
- Romero, R., Mestres, J. Tecnología de los productos lácteos. (2004). Ed. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Barcelona, España.

- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Pérez-Álvarez, J.A. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria (2008). *Food Microbiology*, Vol. 25, 13-21.
- Serrano, M., Díaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde, J.M., Valero, D. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 57, 8, 3240-3246.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. (2005). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 7, 2741-2745.
- Shah, N. The product and its manufacture. (2003). Victoria University of Technology, Elsevier Science Ltd. 6252-6259.
- Sharpe, M.E., Wheater, D.M. *Lactobacillus helveticus*. (1957). *J. gen. Microbiol.* National Institute for Research in Dairying, University of Reading, Vol. 16, 676-679.
- Stintzing, F.C., Carle, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. (2004). *Food Science and Technology*, Vol. 15, 19-38.
- Tamine, A., Robinson, R.K. *Yogur*, Ciencia y Tecnología. (1991). Ed Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Trigueros, L., Vuida, M., Pérez-Álvarez, J.A., Sendra E. Low fat set yogurt rich in pomegranate juice: a new antioxidant dairy product. (2012). *Milchwissenschaft*, Vol. 67, 2, 177-180.
- Trigueros, L., Wojdylo, A., Sendra, E. Antioxidant activity and protein-polyphenol interactions in a pomegranate (*Punica granatum* L.) yogurt. (2014). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 62, 27, 6417-6425.