

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE**  
**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA**  
**GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**“DESARROLLO DE BEBIDAS FERMENTADAS DE HIGO CHUMBO  
ENRIQUECIDAS CON EXTRACTOS FLORALES DE AZAFRÁN”**

TRABAJO FIN DE GRADO

Enero-2023

UNIVERSITAS  
Miguel Hernández

Autor/a: Abril Pérez Gleneu

Tutor/a: Estefanía Valero Cases

Co-tutor/a: María José Frutos Fernández



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

**Título:** Desarrollo de bebidas fermentadas de higo chumbo enriquecidas con extractos florales de azafrán

**Resumen:**

En este estudio se evaluó el efecto de la adición de extractos florales de azafrán en el desarrollo de bebidas fermentadas a base de higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*) a razón de 0, 5, 15 y 25% (v/v) respecto a la bebida, como compuesto de interés funcional. Para ello, se analizó la viabilidad de *Bifidobacterium lactis*, parámetros fisicoquímicos, la capacidad antioxidante, polifenoles totales, betaxantinas, betacianinas, el perfil de ácidos orgánicos y azúcares durante 21 días de almacenamiento, así como un estudio sensorial. Los resultados mostraron que la adición de extracto floral de azafrán a bajas concentraciones (5%) puede tener potencial en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, ya que presentó mayor aceptación por los consumidores y mejoró la viabilidad de *B. lactis*, al mismo tiempo conservando el contenido total de polifenoles y las betalaínas.

**Palabras clave:** probiótico; alimento funcional; *Crocus sativus L.*; subproductos, capacidad antioxidante.

**Title:** Development of fermented prickly pear beverages enriched with saffron flower extracts

**Abstract:**

The aim of this study is the evaluation of saffron floral extract as a source of functional compounds in fermented prickly pears juices (*Opuntia ficus-indica*), these were enriched at 0, 5, 15 and 25% v/v based on juice used. To do so, the *Bifidobacterium lactis* viability, physicochemical properties, antioxidant capacity and polyphenols, and the organic acids and soluble sugars profile along a 21-day storage was analyzed. Also, a sensorial análisis was carried out. The results have shown the enrichment with floral extract increased the total polyphenol content and betaxantines in prickly pear juice, thus showing potential as a bioactive compound suitable for developing new functional products. The results have shown the enrichment with saffron floral extracts at low concentrations (5%) might have potential for developing new functional foods because it presented the highest acceptance rate by consumers and enhanced the viability of *B. lactis*, as well as preserving the total polyphenol and betalain content.

**Key words:** probiotic; functional food; *Crocus sativus L.*; by-products; antioxidant capacity.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1. Alimentos funcionales .....	6
1.2. Probióticos: historia, concepto y beneficios.....	7
1.2.1. Matrices alimentarias probióticas .....	9
1.3. Higo chumbo.....	11
1.4. Valorización del azafrán .....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo principal .....	13
2.2. Objetivos generales .....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Preparación de los extractos florales de azafrán .....	14
3.2. Preparación de las bebidas de higo chumbo ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ). .....	14
3.3. Análisis de la viabilidad de <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 .....	15
3.4. Medidas de parámetros fisicoquímicos .....	15
3.4.1. Acidez titulable y pH.....	15
3.4.2. Sólidos solubles totales .....	15
3.4.3. Color .....	15
3.5. Análisis de ácidos orgánicos y azúcares.....	16
3.7. Determinación de polifenoles.....	16
3.7.1. Método de eliminación de radicales libres DPPH .....	17
3.7.2. Betacianinas y betaxantinas.....	17
3.8. Análisis estadístico .....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Parámetros fisicoquímicos .....	19
4.1.1. Acidez, pH y sólidos solubles totales .....	19
4.2. Viabilidad de <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 .....	21
4.3. Color .....	22
4.4. Capacidad antioxidante.....	24
4.5. Contenido en polifenoles .....	26
4.6. Betacianinas y Betaxantinas .....	27
4.7. Azúcares y ácidos orgánicos .....	29
4.8. Análisis sensorial .....	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA .....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cantidad de artículos que contienen el término de “probióticos” en la base de datos SCOPUS entre el año 2000 y 2021 .....	7
<b>Figura 2.</b> Beneficios relacionados con los probióticos.....	9
<b>Figura 3.</b> Evolución de la viabilidad de <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 en muestras zumo con extracto floral de azafrán durante 21 días de almacenamiento a 4°C .....	22
<b>Fig. 4.</b> Atributos sensoriales de muestras de higo chumbo posterior a 24 horas de fermentación.....	33

### TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos aceptados como probióticos.....	8
<b>Tabla 2.</b> Parámetros fisicoquímicos en zumo fermentado de higo chumbo durante el almacenamiento .....	20
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de color (CIELab) en zumo fermentado de higo chumbo durante el almacenamiento .....	24
<b>Tabla 4.</b> Concentración de DPPH en muestras de zumo fermentado de higo chumbo durante el almacenamiento.....	26
<b>Tabla 5.</b> Polifenoles totales en zumo de higo chumbo durante el almacenamiento .....	27
<b>Tabla 6.</b> Contenido en betacianinas y betaxantinas en zumo de higo chumbo durante el almacenamiento .....	29
<b>Tabla 7.</b> Contenido de azúcares en zumo de higo chumbo a tiempo 0, 1 y 21 de almacenamiento. ....	30
<b>Tabla 8.</b> Contenido de ácidos orgánicos en zumo de higo chumbo a tiempos 0, 1 y 21 de almacenamiento .....	31

UNIVERSITAT  
Miguel Hernández

# 1. INTRODUCCIÓN

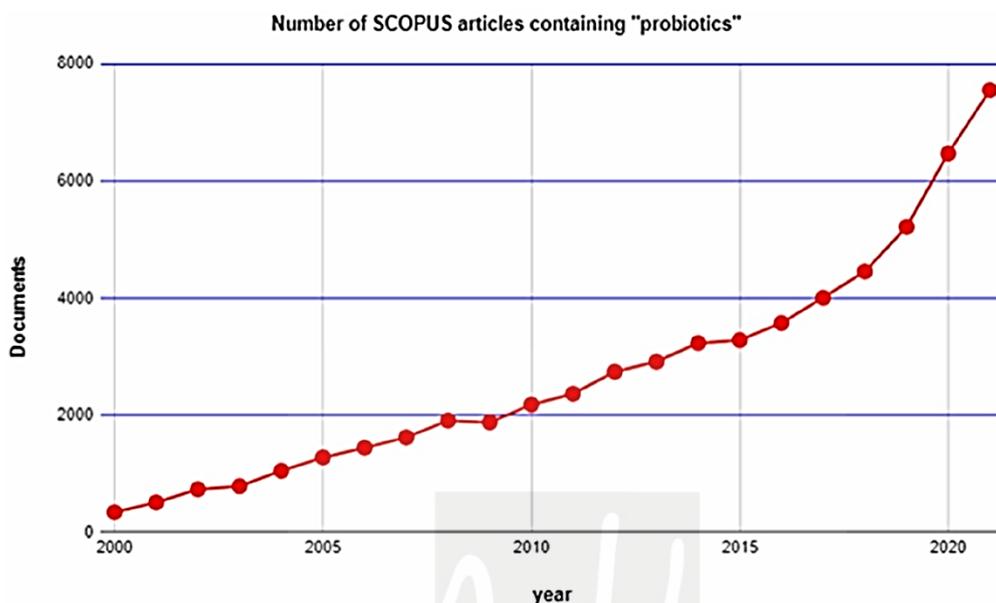
## 1.1. Alimentos funcionales

En las últimas décadas, ha evolucionado la percepción de la población general sobre las dietas nutritivas y los alimentos por cambios demográficos (como el envejecimiento de la población de países más desarrollados), el aumento de la esperanza de vida, los costes sanitarios y la demanda de una mejor calidad de vida (Doyon & Labrecque, 2008). Hace unas décadas, los tratamientos nutricionales se limitaban a prevenir deficiencias nutricionales y a suplir las necesidades básicas. Sin embargo, esta visión ha evolucionado y actualmente, es claro y conocido el binomio alimentación y salud, siendo numerosos los estudios que lo avalan (Bleich et al., 2015; de Filippis et al., 2016; Giugliano et al., 2006; Katz & Meller, 2014). Hoy en día, se busca la optimización nutricional, el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades a través de la alimentación (Milner, 2000). En este escenario, los alimentos funcionales se han convertido en un vehículo que pueden cumplir las expectativas actuales.

Si bien los primeros indicios de la existencia de alimentos funcionales datan del año 1000 a.C. en China, no fue hasta el año 1980 cuando el gobierno japonés se encargó de fundar tres programas de investigación y desarrollo de alimentos funcionales ((Tur & Bibiloni, 2015). Aunque actualmente, la acepción de estos alimentos varía según la fuente consultada, existe un consenso general por parte de la FUFOSSE (Ciencia de Alimentos Funcionales en Europa, *Functional Food Science in Europe* en inglés) que indica que, con la evidencia necesaria, se tratan de grupos de alimentos que pueden ejercer una actividad beneficiosa sobre una o varias funciones del organismo más allá del valor nutricional, presentando un papel preventivo o mejora del estado de salud.

Por ello, la industria alimentaria se ha visto interesada en el desarrollo de estos productos, especialmente en bebidas con características funcionales. Este tipo de bebidas se realizan generalmente adicionando compuestos bioactivos (vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos omega-3, flavonoides), probióticos o eliminando otros componentes que no son deseables, como pueden ser grasas saturadas y trans o azúcares (Keservani et al., 2010). Al mismo tiempo que los consumidores se interesan por su salud, la venta de bebidas fortificadas con antioxidantes y probióticos aumenta

(Nazir et al., 2019). Para el año 2025 se espera que las bebidas funcionales representen un 40% de la demanda global de los consumidores (Bagchi & Nair, 2016). En este sentido, el desarrollo de bebidas con probióticos presenta potencial como alimento funcional debido al interés generado no solo por parte de la industria alimentaria y consumidores sino también por los investigadores (Figura 1).



**Fig. 1.** Cantidad de artículos que contienen el término de “probióticos” en la base de datos SCOPUS entre el año 2000 y 2021 (Fuente: Tyutkov et al., 2022)

## 1.2. Probióticos: historia, concepto y beneficios

A raíz de los estudios del científico ruso y Premio Nobel Elie Metchnikoff a inicios del siglo pasado, se obtuvo conocimiento por primera vez de los posibles efectos de los probióticos en la salud humana (Gasbarrini et al., 2016). Metchnikoff E. (1907) indicó: *“La dependencia de los microbios intestinales de la alimentación hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y reemplazar los microbios nocivos por microbios ventajosos”*. Las investigaciones en este campo han avanzado en las últimas dos décadas, pudiendo caracterizar determinadas cepas o mejorar las reclamaciones nutricionales que se pueden encontrar en productos con probióticos destinados a los consumidores. Según la Organización Mundial de la Salud, el concepto actual del término de “probióticos” (del latín *pro* y del griego *bios*) incluye: “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (FAO, 2002).

Con respecto a los microorganismos asociados a efectos saludables (tabla 1), los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son unos de los más utilizados. En condiciones fisiológicas normales, estas bacterias se encuentran a lo largo del tracto gastrointestinal, en el estómago la concentración es más reducida debido al pH ácido. Sin embargo, la concentración va aumentando a lo largo del intestino, alcanzando una concentración final de  $10^{12}$  bacterias por gramo en el colon proximal (Mitsuoka, 1992).

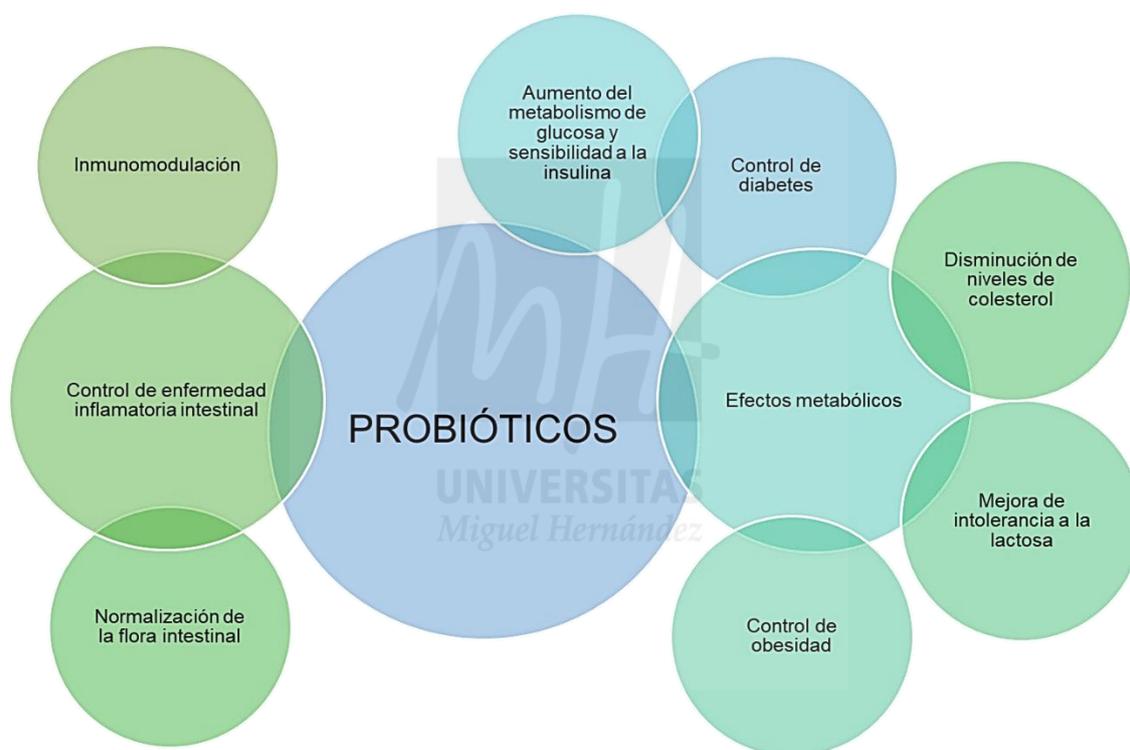
**Tabla 1.** Microorganismos aceptados como probióticos. Adaptado de: (Das et al., 2022)

<b>Lactobacillus sp.</b>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. amylovorus</i>
<b>Bifidobacterium sp.</b>	<i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. adolascensis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. pseudolongum</i>
<b>Levaduras</b>	<i>S. boulardii</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. carlsbergensis</i> , <i>Kluyveromyces marxianu</i> , <i>S. cerevisiae</i>
<b>Otros microorganismos</b>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. citreum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i> , <i>S. infantarius</i>

Las cepas de Bifidobacterias son gram-positivas, no formadoras de esporas y anaerobias. El pH óptimo de crecimiento de estas bifidobacterias se encuentra entre 6.0-7.0, con temperaturas óptimas de 37-41 °C, pudiendo llegar a un mínimo entre 25-28 °C con máximas de 43-45 °C. Son hospedantes normales del tracto gastrointestinal humano y animal, y su concentración depende de la edad, la dieta, el consumo de antibióticos y situaciones de estrés. Son una de las primeras colonias intestinales presentes en recién nacidos y cumplen una función muy relevante en el desarrollo del sistema inmunitario, entre otras. Otras cepas del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* y *Propionibacterium* han demostrado efectos en la salud (Blandino et al., 2003; Sanders, 1999; Vinderola & Reinheimer, 2003).

La evidencia científica, indica que el consumo de probióticos se ha asociado con beneficios en la salud humana (Figura 2). Entre estas se encuentra la producción de sustancias antimicrobianas, eliminación de patógenos por medio de exclusión competitiva y prevención de desórdenes relacionados con el tracto digestivo, como

diarrea, enfermedades infecciosas e inflamatorias y síndrome del colon irritable. Por ejemplo, el uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 ha demostrado ser viable para la prevención de diarrea causada por bacterias patógenas y virus. La acción antimicrobiana de *Bifidobacterium* y bacterias acidolácticas (BAL) se atribuye a la competencia de nutrientes y la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, formación de especies reactivas como peróxido de hidrógeno y otros compuestos como bacteriocinas ((Das et al., 2022; Kirjavainen et al., 1998). Esta acción antimicrobiana puede verse aumentada con la disminución del pH en el estómago por la producción de ácidos orgánicos (como ácido láctico y acético) y la combinación de estos con sales biliares que pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas gram-negativas (Begley et al., n.d.; Gänzle et al., 1999).



**Fig. 2.** Beneficios relacionados con los probióticos. (Adaptado de: Das et al., 2022)

### 1.2.1. Matrices alimentarias probióticas

Cuando los probióticos son adicionados a matrices alimentarias para el desarrollo de productos fermentados, existen factores que pueden alterar su viabilidad. La composición fisicoquímica del alimento (pH, acidez, sólidos solubles totales, concentración de oxígeno, etc.) y las interacciones entre los probióticos y los cultivos

madre, son algunos de los elementos que pueden afectar a la supervivencia del probiótico en el alimento y deben controlarse para garantizar su viabilidad (Dave & Shah, 1997; Yoon et al., 2004).

Comúnmente se han utilizado en matrices lácteas (como yogur, kéfir, leche o quesos). Sin embargo, una de las problemáticas relacionadas con el uso de matrices lácteas es el contenido de lactosa de estos productos (Prado et al., 2008). Hoy en día, la intolerancia a la lactosa puede afectar a 2/3 de la población. Esta incapacidad para digerir la lactosa es predominante en poblaciones de países asiáticos, africanos y América del Sur y en menor medida en poblaciones de países mediterráneos y Norte América y Europa Central (Liebert et al., 2017). De este modo, el desarrollo de bebidas con probióticos de origen no lácteo, como puede ser vegetal, frutal o a base de cereales puede suplir la necesidad de los consumidores con deficiencia de enzima lactasa, así como también de aquellos consumidores con dietas vegetarianas o veganas.

Las bebidas vegetales son una buena fuente de vitaminas, antioxidantes, minerales y bioactivos, pudiendo suplementarse con prebióticos como inulina aumentando o mejorando la viabilidad de los probióticos en matrices no lácteas (Valero-Cases et al., 2020). Aunque es común el uso de inulina en bebidas con probióticos, también se han realizado ensayos con otros compuestos bioactivos: vitamina C, extracto de té verde y extracto de semillas de uva como promotores de viabilidad de los probióticos en zumos de frutas (Shah et al., 2010). Actualmente, el uso de subproductos de origen vegetal presenta un elevado interés en el desarrollo de alimentos funcionales, por su contenido en compuestos bioactivos que pueden aportar una mejora nutricional y conseguir alimentos con valor añadido.

Al mismo tiempo, a fermentación de matrices vegetales con probióticos podría presentar una digestión más sencilla mediante la degradación de antinutrientes (como fitatos y oxalatos) y oligosacáridos causantes de flatulencias, el aumento de la biodisponibilidad de minerales y la digestión de proteínas en determinados cereales ricos en taninos (Subhashree & Kavita, 2019). Sin embargo, el uso de Bifidobacterias también se encuentra limitado a uso en productos lácteos, sobre todo debido al bajo pH que pueden presentar las matrices vegetales o frutales y el contenido en ácidos orgánicos que pueden inhibir a las bifidobacterias (Saarela, 2009). Por ello, sería interesante seguir investigando con cepas del género *Bifidobacterium* en el desarrollo de alimentos vegetales probióticos.

### 1.3. Higo chumbo

El higo chumbo es una fruta perteneciente al género *Opuntia* de la familia Cactaceae, cultivada en América y regiones de Europa, Asia, África y Australia. La planta se divide en tallos o cladodios donde se encuentran las flores y frutas. La fruta del higo chumbo es una baya cuya pulpa contiene abundantes semillas, y puede ser de color verde, rojiza, violeta o amarilla. Tanto los tallos como la fruta se utilizan en alimentación en ciertas regiones.

La fruta del higo chumbo es rica en azúcares, minerales, vitaminas y flavonoides (Albano et al., 2015a). Además, los estudios recientes indican que el higo chumbo posee beneficios en la salud humana, como pueden ser reducción de estrés oxidativo, actividad antiinflamatoria, propiedades antidiabéticas, reducción de colesterol plasmático y estimulación inmunitaria (Patel, 2015). Por otra parte, los zumos frescos de higo chumbo contienen, aunque en cantidades no importantes, compuestos volátiles peligrosos que mediante la fermentación pueden descomponerse (Valero-Cases et al., 2020). En este sentido es relevante estudiar el papel del higo chumbo como alimento funcional, pudiendo utilizarse en vinos, mermeladas, zumos y otros, mejorando el perfil nutricional o sensorial.

### 1.4. Valorización del azafrán

El azafrán (de la planta *Crocus sativus* L.), comprende una de las especias más costosas por peso debido a su gravoso proceso productivo, y es bien apreciada por su funcionalidad en tintes, medicina, cosméticos y la industria alimentaria. La especia se obtiene a partir de los estigmas rojizos de la flor de *C. sativus*, compuesta a su vez en seis tépalos lilas y un pistilo rojizo con tres estigmas (Kumar et al., 2008). En términos de producción, para obtener 1 kg de azafrán se requieren 68 kg de las flores de la planta, y se desechan otros 63 kg de residuos florales que incluyen tépalos y estambres (Serrano-Díaz et al., 2013), resultando en un sistema de baja eficiencia y no sostenible.

Los principales compuestos bioactivos del azafrán incluyen crocetina, crocinas y safranal (Dabbagh Moghaddam et al., 2018). Estos han demostrado ser capaces de reducir del estrés oxidativo, además de varias propiedades antioxidantes, antidiabéticas, antiinflamatorias, entre otras. Según Cerdá-Bernad et al. (2022), hay nuevos estudios que indican la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides y polifenoles en

los tépalos, que forman parte de los desechos. El uso de subproductos con compuestos bioactivos puede de interés en el desarrollo de alimentos funcionales, aportando una mejora nutricional y consiguiendo alimentos con valor añadido.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo principal

El objetivo principal fue evaluar el efecto de la adición de extractos florales de azafrán en el desarrollo de bebidas fermentadas a base de higo chumbo.

### 2.2. Objetivos generales

Analizar los parámetros fisicoquímicos de las diferentes bebidas de higo chumbo fermentadas con *Bifidobacterium lactis* HN019 durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 4 °C (pH, acidez, color y sólidos solubles, ácidos orgánicos y azúcares).

Estudiar la capacidad antioxidante y contenido en polifenoles totales, betacianinas y betaxantinas de las diferentes bebidas vegetales durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 4 °C.

Determinar la viabilidad de *Bifidobacterium* en las diferentes muestras de bebidas vegetales durante 21 días de almacenamiento refrigerado a 4 °C.

Estudiar la aceptación de las bebidas fermentadas por parte del consumidor.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Preparación de los extractos florales de azafrán

Las flores frescas de azafrán provenientes de diferentes productores de Castilla La Mancha (España), se congelaron a -80°C tras su recolección hasta su uso. Posteriormente, se secaron a 43 °C en estufa a vacío durante 48 h. Luego, se trituraron y se tamizaron a través de una malla de 500 µm y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior extracción.

Los extractos florales se prepararon por triplicado disolviendo en un agitador magnético (Ovan MMH3E) 0,5 gramos de las flores previamente deshidratadas en polvo en 25 mL de agua ultrapura a 10000 rpm durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, llevaron a un baño de ultrasonidos (Ultrasons P Selecta) durante 15 minutos y seguidamente se centrifugaron (Eppendorf 5804-R) a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se filtraron y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

#### 3.2. Preparación de las bebidas de higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*).

Para la preparación de las bebidas de higo chumbo se utilizó pulpa previamente pasteurizada del fruto *Opuntia ficus-indica* disuelta en agua potable a una concentración del 75% (v/v). Para la preparación de las cuatro muestras, se adicionó por triplicado diferentes concentraciones del extracto floral de azafrán (0, 5%, 15% y 25%): ZC (zumo sin la adición del extracto floral); Z5% (zumo con la adición del 5% del extracto floral); Z15% (zumo con la adición del 15% del extracto floral); Z25% (zumo con la adición del 5% del extracto floral). Las diferentes formulaciones se pasteurizaron a 80 °C durante 30 min. A continuación, se enfriaron hasta alcanzar 43 °C en un baño con hielo para inocular asépticamente las diferentes bebidas con *Bifidobacterium lactis* "HN019" a una concentración inicial de 6 Log UFC/mL. La fermentación se realizó a 37°C durante 24 horas. Una vez finalizada la fermentación, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para ser analizadas durante 21 días.

### **3.3. Análisis de la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* HN019**

Mediante diluciones seriadas y recuento en placa de MRS agar por triplicado, se determinó la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* HN019 de las diferentes bebidas fermentadas de higo chumbo tras finalizar el periodo de fermentación, a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento en refrigeración y condiciones asépticas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas en jarras de anaerobiosis. El recuento se expresó como Log unidades formadoras de colonias (UFC) por mL de muestra (Log UFC/mL muestra).

### **3.4. Medidas de parámetros fisicoquímicos**

#### **3.4.1. Acidez titulable y pH**

El pH y la acidez titulable (expresada en % de ácido láctico) de las diferentes muestras se analizaron por triplicado de forma automática mediante un titulador automático (TitroMatic Crison, "PH-Matic 23", Barcelona, España).

#### **3.4.2. Sólidos solubles totales**

La determinación de sólidos solubles totales (SST) de las diferentes muestras, se realizó por triplicado usando el refractómetro Hanna, modelo "HI 96801" calibrado con agua destilada previamente. Los resultados se expresaron como °Brix.

#### **3.4.3. Color**

Los parámetros de color de las bebidas se determinaron por triplicado con un colorímetro modelo Minolta CR 300, previamente calibrado con la placa blanca. El resultado fue medido conforme a las tres coordenadas del sistema CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). Los valores de  $L^*$  representan la luminosidad ( $L^*=0$  negro y  $L^*=100$  blanco); mientras, los valores de  $a^*$  representan la tendencia hacia el color verde valores negativos colores rojizos con valores positivos); el tercer parámetro,  $b^*$ , representa la tendencia entre el color amarillentos valores positivos y azulados valores negativos.

### **3.5. Análisis de ácidos orgánicos y azúcares**

Por medio de Cromatografía de Alto Rendimiento (HPLC) en el equipo Hewlett-Packard serie 1100 (Woldbronn, Alemania) utilizando una pre-columna modelo Supelcoguard C-610H (5 cm x 4,6 mm) y una columna Supelcogel C-610H (30 cm x 7,8 mm) se pudo determinar el contenido de ácidos orgánicos y azúcares presentes en las muestras de las bebidas de higo chumbo. Se utilizó 0,1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como fase móvil. Los ácidos orgánicos se midieron a 210 nm en UV-VIS con un DAD G1315A. Para los azúcares se usó un índice de refracción G1362A RID. Las muestras se analizaron antes de la fermentación (T0), después de finalizar el tiempo de fermentación (T1) y en el último día de almacenamiento refrigerado (T21). Las concentraciones se calcularon mediante curvas de calibración con los estándares para ácidos orgánicos (fítico, tartárico, propiónico, fórmico y láctico) y para los azúcares (glucosa, fructosa y manosa). Los resultados se expresaron en g/100 mL de muestra.

### **3.6. Extracción de compuestos bioactivos**

Para la extracción de compuestos bioactivos se realizaron extracciones con metanol acidificado con HCl al 0,1% y agua ultrapura acidificada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,1%. Se diluyeron los zumos de higo chumbo con relación muestra-agua y muestra-metanol 5:15 (v/v). Se agitaron en Ultra Turrax durante 1 min a 1200 rpm, posteriormente se colocaron en un baño de ultrasonidos Ultrasons (J. P. Selecta s.f.) durante 10 min seguido de centrifugación a 4 °C durante 10 min (Centrifuge C30P, B. Braun Biotech International). Posteriormente se filtraron los sobrenadantes y se colocaron en viales y tubos Falcon a -20 °C hasta su uso.

### **3.7. Determinación de polifenoles**

Se aplicó el método Folin-Ciocalteu (Blainski et al., 2013) para la determinación de polifenoles en las muestras de bebida vegetal. Previo al ensayo, el reactivo Folin se preparó con 10 mL y 90 mL de agua ultrapura. Se realizó una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> con 75 g de este en 1 L de agua ultrapura. Para el tampón fosfato 50 mM se pesaron 2,177 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 250 mL de agua ultrapura y se adicionaron la disolución monobásica KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,7 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 250 mL de agua ultrapura) hasta alcanzar un pH de 7,5. Para los análisis, se adicionaron 2,5 mL del reactivo Folin, 100 µL de los diferentes extractos de las bebidas, 400 µL de tampón fosfato 50 mM y 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Los tubos con las muestras fueron incubados 10 min a 50 °C. Finalmente se midió

espectrofotométricamente la absorbancia a 760 nm (espectrofotómetro (UV/Vis) (PG Instruments Ltd - T80 Double Beam UV Spectrophotometer). Se utilizó una solución de ácido gálico 1mM como solución estándar para la elaboración de la recta patrón. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 mL de muestra.

### **3.7.1. Método de eliminación de radicales libres DPPH**

La capacidad antioxidante de las diferentes muestras de bebidas vegetales se determinó siguiendo el método DPPH propuesto por Brand-Williams et al., (1995). El reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma, España) se preparó utilizando 0,0035 g en 10 mL de metanol, se conservó en oscuridad durante 30 min para después ajustar la absorbancia a 515 nm (espectrofotómetro UV/Vis T80; PG Instruments Limited, Reino Unido). Se realizó una recta de calibrado usando Trolox como patrón de referencia.

Para medir las absorbancias de las bebidas, se adicionaron 10 µL de los extractos de cada muestra (control, 5%, 15% y 25%) y 990 µL del reactivo DPPH en cubetas de poliestireno. Las cubetas se mantuvieron en oscuridad durante 10 min. A continuación, se midió la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox (TE) por 100 mL de muestra.

### **3.7.2. Betacianinas y betaxantinas**

El contenido de betacianinas y betaxantinas se determinó espectrofotométricamente a 538 nm y 480 nm respectivamente según el método de Ravichandran et al., (2013). Se midieron por triplicado, las absorbancias de las muestras de zumo de higo chumbo (ZC, Z5%, Z15% y Z25%) a tiempos 0, 1, 7, 14 y 21 de almacenamiento. Las medidas de absorbancia se utilizaron para calcular la concentración de betaxantinas y betalainas. Para el cálculo de concentración de betacianinas se aplicó un peso molecular de 550 g/mol y un coeficiente de extinción molar de 60,00 L/mol cm. Para el cálculo de betaxantinas un peso molecular de 308 g/mol y un coeficiente de extinción molar de 48,00 L/mol cm.

### 3.8. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v 21.0 (SPSS Inc., Chicago- Illinois-USA). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. La comparación de medias se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey. La diferencia significativa fue establecida como  $p < 0.05$ .



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Parámetros fisicoquímicos

#### 4.1.1. Acidez, pH y sólidos solubles totales

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos (acidez, pH y sólidos solubles totales) se pueden observar en la Tabla 1. Con respecto a la acidez, aumenta significativamente en todas las muestras después de las 24 horas de fermentación, manteniéndose sin cambios significativos a lo largo del periodo de almacenamiento restante (día 7, 14 y 21), a excepción de la muestra Z15% en el día 21 de almacenamiento que presentó un descenso en la acidez. Los valores de acidez en el zumo sin fermentar (tiempo 0) están en torno a 0,04% y entre los días 7 y 21 de almacenamiento rondan valores cercanos a 0,26%.

Al mismo tiempo, los valores de pH disminuyen significativamente en todas las muestras a partir de las 24 horas de fermentación, desde valores cercanos a 6,5 antes de la fermentación (tiempo 0) hasta alcanzar valores ca. 3,5 al finalizar el tiempo de fermentación. Durante el tiempo 1 y 21 de almacenamiento el pH no presentó cambios significativos en todas las muestras, a excepción de la muestra Z5% donde se observó un ligero aumento significativo del pH en el último día de almacenamiento. Daneshi et al. (2013) mostraron resultados similares en la estabilidad del pH tras 20 días de almacenamiento a 4 °C en tres bebidas fermentadas de zanahoria y leche inoculados con *L. acidophilus* LA5, *L. plantarum* y *B. lactis* BB12. Este aumento de acidez seguido de una disminución del pH durante la fermentación es esperado por la producción de ácido láctico (Tabla 8) debido a la actividad metabólica de *Bifidobacterium lactis*.

Con respecto a los SST, los valores disminuyen a medida que aumenta la concentración de extracto floral de azafrán en todas las muestras de zumo durante el día 0, 1 y 7 de almacenamiento, encontrándose valores cercanos a 6,6 °Brix para el ZC y 5,20 °Brix para la muestra Z25%. Durante el tiempo 14 y 21, las muestras Z15% y Z25% presentaron un descenso significativo de SST en comparación a las muestras ZC y Z5%. Los resultados indican que el tiempo de almacenamiento no afecta significativamente a la concentración de SST, independientemente del enriquecimiento con extracto floral. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la muestra Z5% entre el día 14 y 21 de

almacenamiento, el cual puede deberse un mayor aumento de la concentración de manosa en la muestra Z5% (Tabla 7).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos (acidez, pH y sólidos solubles totales) para diferentes muestras de zumo fermentado de higo chumbo a diferentes tiempos de almacenamiento <sup>a</sup>.

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)	Muestras de zumo			
		ZC	Z5%	Z15%	Z25%
<b>Acidez <sup>b</sup></b>	0	0,05±0,02Aa	0,04±0,01Aa	0,04±0,01Aa	0,02±0,02Aa
	1	0,24±0,02Ab	0,23±0,01Ab	0,23±0,01Ab	0,25±0,02Ab
	7	0,26±0,01Ab	0,26±0,00Ab	0,20±0,00Ab	0,20±0,05Ab
	14	0,26±0,03Ab	0,26±0,03Ab	0,21±0,02Ab	0,23±0,01Ab
	21	0,27±0,01Bb	0,26±0,01Bb	0,17±0,03Ab	0,23±0,01ABb
<b>pH</b>	0	6,63±0,10Bb	6,55±0,01Bc	6,68±0,19Bb	7,70±0,01Ab
	1	3,62±0,08Aa	3,53±0,01Aab	3,58±0,07Aa	3,53±0,04Aa
	7	3,51±0,00Ca	3,53±0,00Ba	3,52±0,00Aa	3,52±0,00Aa
	14	3,55±0,18Aa	3,56±0,01Aab	3,56±0,11Aa	3,53±0,01Aa
	21	3,89±0,03Ca	3,59±0,01Bb	3,51±0,01Aa	3,50±0,02Ab
<b>Sólidos solubles totales</b>	0	6,80±0,07Da	6,60±0,00Cb	5,90±0,0Ba	5,40±0,00Aa
	1	6,55±0,07Da	6,20±0,00Ca	5,80±0,0Ba	5,10±0,00Aa
	7	6,65±0,07Da	6,30±0,00Ca	5,80±0,00Ba	5,20±0,00Aa
	14	6,80±0,00Ca	6,50±0,01Cb	5,85±0,07Ba	5,20±0,14Aa
	21	6,80±0,14Ca	6,55±0,07Bb	5,80±0,01Aa	5,20±0,01Aa

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar en la misma fila seguido de diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  entre los diferentes zumos ( $n = 3$ ) durante el mismo tiempo de almacenamiento. Media ± desviación estándar en la misma columna seguido de diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  para los zumos durante distintos tiempos de almacenamiento.

<sup>b</sup> Acidez expresada como % de ácido láctico.

#### 4.2. Viabilidad de *Bifidobacterium lactis* HN019

La viabilidad de los probióticos en bebidas depende de diversos factores como pueden ser el pH, la temperatura o el tiempo de almacenamiento, entre otros. En la Figura 1 se observa la viabilidad de *B. lactis* HN019 (Log UFC/mL) durante 21 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C de diferentes muestras de zumo fermentado de higo chumbo con los extractos florales. Partiendo desde valores de 6 Log UFC/mL, se observa un aumento de la viabilidad después del periodo de incubación. Durante el día 1 y 7 de almacenamiento la viabilidad se mantiene estable con valores máximos en la muestra Z5% (8,52 Log UFC/mL). tendencia se puede atribuir a la presencia de nutrientes en el zumo de higo chumbo, que inicialmente provocan el crecimiento de *B. lactis* HN019, pasando de valores de 6 Log UFC/mL antes de la incubación a 8 Log UFC/mL aproximadamente. Después del séptimo día, el crecimiento disminuye significativamente hasta el fin de almacenamiento (día 21) en todas las muestras, con valores cercanos 6,90 Log UFC/mL aproximadamente. Del mismo modo, la concentración inicial de glucosa y fructosa de las muestras de zumo disminuyen con el proceso de fermentación en todas las muestras (Tabla 7). Por otro lado, al aumentar la concentración de extracto floral se observan diferencias significativas de viabilidad en la muestra Z25%, disminuyendo en comparación al resto de muestras (ZC, Z5% y Z15%) hasta el día 14 de almacenamiento. En el último día de almacenamiento, las muestras Z5% y Z15% presentaron diferencias significativas de viabilidad, presentando mayores valores que la muestra control y Z25%.

De este modo, los resultados indican que el enriquecimiento de los zumos con extracto floral de azafrán a medias y bajas concentraciones (0, 5 y 15%) presentan alta viabilidad y no afectan negativamente en el recuento celular, a excepción de las altas concentraciones (25%). En las condiciones actuales de almacenamiento, el zumo de higo chumbo puede ser una matriz adecuada para el crecimiento de *B. lactis* HN019 dada la alta viabilidad del probiótico durante los primeros 14 días de almacenamiento. Los productos que contengan probióticos deberán tener un mínimo de células viables, que suele ser  $>10^6$ - $10^8$  UFC/MI o g de producto (Champagne et al., 2011). Los zumos fermentados de higo chumbo superan el mínimo recomendado de células viables ( $>10^6$  Log UFC/MI) durante todo el tiempo de almacenamiento. Bedani et al. (2013) reportó concentraciones similares de viabilidad. El estudio indicó una población celular por encima de 8 Log UFC/mL en bebidas fermentadas de soja con *Bifidobacterium animalis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5 enriquecidas con inulina y okara, durante 28 días de almacenamiento a 4 °C.

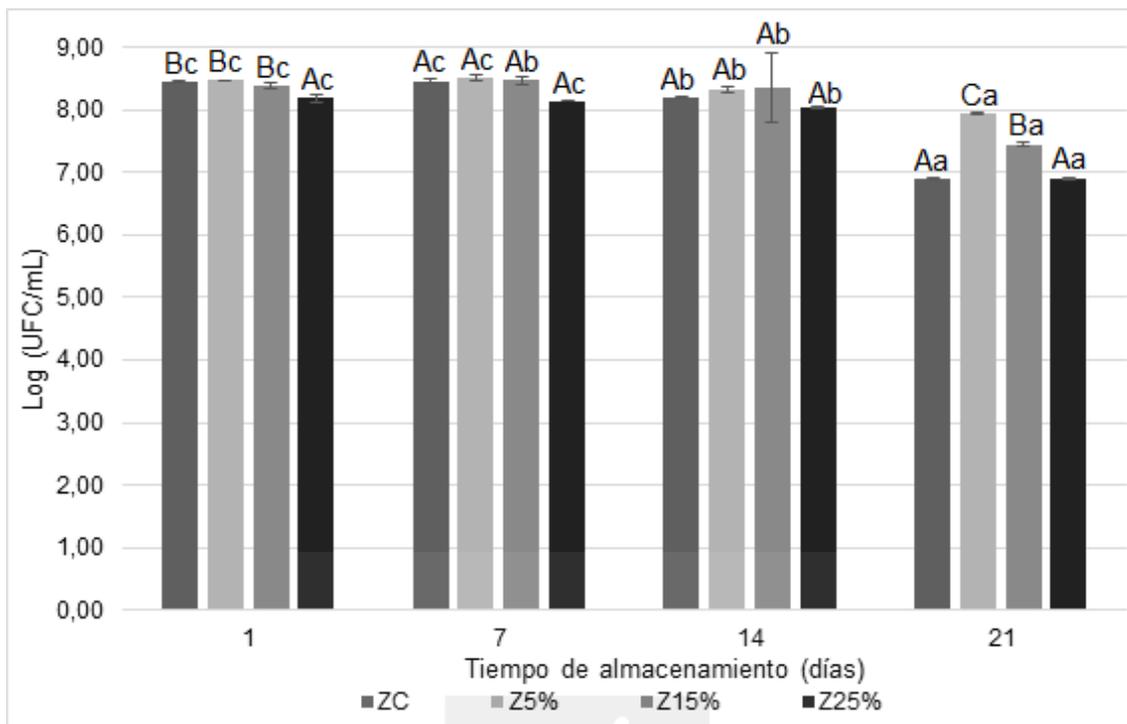


Fig. 3. Evolución de la viabilidad de *Bifidobacterium lactis* HN019 en zumo control (ZC), zumo con 5%, 15% y 25% de extracto de flores de azafrán (Z5%, Z15% y Z25% respectivamente) durante 21 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C. Las barras representan la media  $\pm$  DS de tres repeticiones. Letras mayúsculas indican comparación entre muestras para el mismo tiempo de almacenamiento. Letras minúsculas indican evolución para una misma muestra a lo largo del almacenamiento.

#### 4.3. Color

El color, medido según el sistema CIELAB, comprende los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Los valores de  $L^*$  representan la luminosidad ( $L^*=0$  negro y  $L^*=100$  blanco); mientras, los valores de  $a^*$  representan la tendencia hacia el color verde valores negativos colores rojizos con valores positivos); el tercer parámetro,  $b^*$ , representa la tendencia entre el color amarillentos valores positivos y azulados valores negativos.

Los resultados de las diferentes muestras de zumo durante 21 días de almacenamiento en refrigeración se observan en la Tabla 3. Con respecto a la luminosidad ( $L^*$ ) los valores aumentan significativamente en todas las muestras después de la fermentación (aprox. con valores de  $L^*$  desde 26 a 28). Este aumento se mantiene significativamente hasta el día 21 de almacenamiento en todas las muestras, a excepción de la muestra Z25% que presentó un descenso de la luminosidad después de la fermentación (desde tiempo 1 a 21). Al aumentar la concentración del extracto floral los valores de luminosidad disminuyen significativamente al comparar entre las muestras, indicando que las

muestras de zumo se tornan más oscuras. Un estudio reportó que a mayores concentraciones de betaxantina la luminosidad presentaba mayores valores, y decrecía cuando las betacianinas eran predominantes (Stintzing et al., 2005). Esta correlación es similar a los resultados en este estudio, donde sobresale el contenido de betacianinas (entre 22 y 7 mg/L aprox.) frente a las betaxantinas (entre 9 y 4 mg/L) en todas las muestras. (Tabla 6). El valor más bajo de luminosidad se observa en la muestra Z25% a tiempo cero ( $L^* = 25,93$ ) y el más alto en la muestra ZC en el día 21 de almacenamiento (30,57). Con respecto al parámetro  $a^*$ , todos los resultados son positivos, por lo que presentan una tendencia hacia el color rojizo. Existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las muestras de zumo sin fermentar y las fermentadas, presentando éstas últimas resultados más bajos de la coordenada  $a^*$ . Conforme aumenta la concentración de extracto de azafrán, tanto la coordenada  $a^*$  como  $b^*$  disminuyen, tornando desde el color rojizo a tendencias anaranjadas, sin embargo, en el último día de almacenamiento se observa el efecto contrario para las muestras ZC, Z15% y Z25%. De este modo, la adición de extracto floral de azafrán incide en el color del zumo. Cabe destacar que las muestras que presentaron mayor aceptación en el color por parte de los consumidores durante la prueba de aceptación fueron la muestra control (ZC) y la muestra con menor concentración de extracto floral (Z5%).

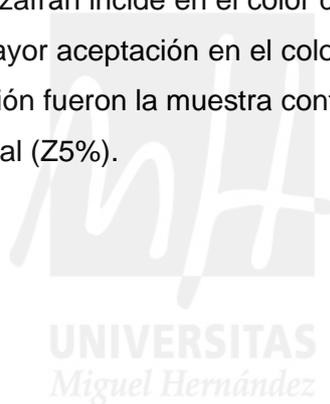


Tabla 3. Parámetros de color (CIELab) para diferentes muestras de zumo fermentado de higo chumbo durante 21 días de almacenamiento <sup>a</sup>.

Parámetro	Tiempo almacenamiento (días)	Muestras de zumo de higo chumbo			
		ZC	Z5%	Z15%	Z25%
L*	0	27,87±0,01Cab	27,41±0,26BCb	27,07±0,08Ba	25,93±0,21Aa
	1	28,54±0,54Bb	28,56±0,20Bc	27,45±0,18Ab	28,08±0,24ABb
	7	27,28±0,11Aa	27,9±0,37Ab	27,97±0,08Ac	27,77±0,19Ab
	14	27,92±0,23Aab	27,82±0,07Ab	27,77±0,03Aac	27,82±0,06Ab
	21	30,57±0,60Bc	29,73±0,06Bc	29,63±0,12Bd	27,64±0,52Ac
a*	0	3,77±0,10Bc	3,43±0,08Bc	2,53±0,10Bbc	1,62±0,04Ab
	1	2,81±0,08Ca	2,78±0,05Ca	2,39±0,05Ba	1,34±0,07Aa
	7	2,94±0,04Ca	2,84±0,06Ca	2,37±0,03Ba	1,59±0,18Ab
	14	2,98±0,06Dab	2,73±0,03Ca	2,46±0,06Bbc	1,52±0,03Aab
	21	3,20±0,13Cb	2,65±0,05Ba	2,58±0,01Bb	2,27±0,01Ac
b*	0	2,60±0,05Bb	2,53±0,06Bb	2,20±0,01Aa	2,24±0,04Aa
	1	2,20±0,08Aa	2,49±0,16Bb	2,51±0,02Bb	2,69±0,20Bb
	7	2,17±0,04Aa	2,09±0,03ABa	2,53±0,06Bbb	2,8±0,14Cb
	14	2,14±0,05Ba	2,02±0,04Aa	2,53±0,00Cb	2,75±0,04Db
	21	2,95±0,22ABc	2,70±0,07Ab	3,14±0,14Bc	3,36±0,02Cc

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar en la misma fila seguido de diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  entre los diferentes zumos ( $n = 3$ ) durante el mismo tiempo de almacenamiento, Media ± desviación estándar en la misma columna seguido de diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  para los zumos distinto tiempo de almacenamiento.

#### 4.4. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las muestras de higo chumbo se observa en la Tabla 4. En general, se observa que después de 24 horas de fermentación (tiempo 1) la capacidad antioxidante de las muestras aumenta significativamente en comparación con las muestras sin fermentar, siendo las muestras ZC y Z25% las que presentan

mayor capacidad antioxidante (tiempo 0). Posterior a la fermentación, la capacidad antioxidante disminuye con el almacenamiento (desde el día 7 hasta el 21) para todas las muestras. Las muestras que presentaron mayor capacidad antioxidante durante el periodo de almacenamiento fueron las muestras ZC (entre 0,5 y 11 mmol/100g aprox.) y Z25% (entre 2 y 5,4mmol/100g).

La capacidad antioxidante, predominante en las muestras fermentadas, se puede atribuir a los fitoquímicos y péptidos bioactivos formados durante el proceso de fermentación, cuyo efecto es neutralizar radicales libres relacionados con el estrés oxidativo (Masisi et al., 2016). La viabilidad máxima de *B. lactis* se presentó en el día 1 y 7 de almacenamiento (Tabla 2), donde la capacidad antioxidante también fue máxima.

Por otra parte, la adición de extracto floral de azafrán disminuye la concentración de DPPH en comparación con la muestra control. Sin embargo, el contenido de polifenoles presentes en las muestras aumenta paralelamente al extracto floral de azafrán (Tabla 5), por lo que este descenso de la capacidad antioxidante no podría relacionarse con la concentración de polifenoles, como indican otros estudios (Valero-Cases et al., 2017). De este modo, es probable que el descenso de la proporción de pulpa de higo chumbo haya influido en la capacidad antioxidante, quedando relegada la capacidad antioxidante de los zumos a los compuestos bioactivos de azafrán. Los resultados de este estudio siguen una tendencia similar a la reportada por Dabbagh Moghaddam et al., (2018). En este artículo, donde investigaron el aumento de la capacidad antioxidante de bebidas de pétalos azafrán fermentadas con bacterias ácido-lácticas, observaron que la bebida fermentada presentaba mayor capacidad antioxidante en comparación a la no fermentada. Otros estudios reportan resultados similares en el aumento de la capacidad antioxidante con la fermentación en bebidas vegetales (Chu & Chen, 2006; Dordević et al., 2010).

Tabla 4. Concentración de DPPH (mmol/100 g de muestra) para diferentes muestras de zumo fermentado de higo chumbo a diferentes tiempos de almacenamiento <sup>a</sup>.

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)	Muestras de zumo de higo chumbo			
		ZC	Z5%	Z15%	Z25%
DPPH (mmol Trolox/100g)	0	1,10±0,36ABa	0,79±0,17Aa	0,61±0,03Aa	2,45±1,77Ba
	1	11,15±1,01Cc	5,02±1,69Bb	2,08±0,03Ab	5,45±0,82Bc
	7	10,35±1,91Cc	2,81±0,56Aab	2,69±0,56Ab	5,02±0,21Bbc
	14	6,55±0,56Cb	2,08±0,21Aa	2,69±0,53ABb	3,43±0,46Bab
	21	0,49±0,10Aa	2,20±0,48Ba	2,88±0,54Bb	2,26±0,21Ba

<sup>a</sup> Media  $\pm$  desviación estándar en la misma fila seguido de diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  entre los diferentes zumos ( $n = 3$ ) durante el mismo tiempo de almacenamiento, Media  $\pm$  desviación estándar en la misma columna seguido de diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  para los zumos distinto tiempo de almacenamiento.

#### 4.5. Contenido en polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios presentes en las plantas y se caracterizan por la presencia de más de un grupo fenol en la estructura molecular. Estos compuestos son de relevante interés científico debido a la capacidad antioxidante y prevención de enfermedades cardiovasculares, entre otros (García et al., 2020). En la Tabla 5 se observa el contenido total de polifenoles en las diferentes muestras de zumo de higo chumbo con extracto floral de azafrán. De forma global se aprecia un aumento de polifenoles de manera proporcional a la adición del extracto floral de azafrán en todas las muestras después del día 7 de almacenamiento refrigerado. Los valores que presentan mayor capacidad antioxidante pertenecen a la muestra Z25% (62,18 a 77,66 mg EAG/100 g muestra) y la de menor ZC (44,23 a 52,25 mg EAG/100 g muestra) Durante el almacenamiento la concentración de polifenoles aumentó en todas las muestras durante 21 días, a excepción del Z5% cuyo contenido en polifenoles disminuyó el último día de almacenamiento (59,25 mg EAG/100 g muestra).

La actividad metabólica de las bacterias lácticas puede transformar polifenoles complejos en compuestos fenólicos más sencillos, provocando un aumento en la capacidad antioxidante posterior a la fermentación (Rodríguez et al., 2008; Valero-

Cases et al., 2020). Por otra parte, existen estudios que han indicado la presencia de compuestos bioactivos en los subproductos florales de azafrán, reportando además buena actividad antioxidante relacionada con el contenido en polifenoles (Cerdá-Bernad et al., 2022). Al mismo tiempo, son varios los estudios que indican la presencia de polifenoles en pulpa de higo chumbo (Albano et al., 2015; García-Cayuela et al., 2019; Mena et al., 2018; Tsailanis et al., 2022). En este sentido, la adición de extracto floral en el zumo de higo chumbo y la fermentación con probióticos puede aumentar el contenido en polifenoles y compuestos bioactivos, pudiendo presentar un papel preventivo frente al estrés oxidativo.

Tabla 5. Polifenoles totales (mg de ácido gálico/100 g de muestra) para diferentes muestras de zumo de higo chumbo a diferentes tiempos de almacenamiento <sup>a</sup>.

Parámetro	Tiempo de almacenamiento (días)	Muestras de zumo de higo chumbo			
		ZC	Z5%	Z15%	Z25%
Polifenoles totales <sup>b</sup>	0	50,52±2,21Aa	50,83±2,67Aa	58,80±1,94Ba	62,18±1,69Ca
	1	50,01±3,15Aa	52,52±1,18Aab	53,62±0,82Aa	66,46±1,24CBab
	7	44,23±4,38Aab	54,33±0,42Bab	55,74±2,31Ba	68,78±2,45Cab
	14	46,55±2,91Aab	61,36±1,23Bc	58,22±3,87Ba	71,69±3,50Cbc
	21	52,25±1,25Aa	59,25±2,15ABab	65,32±2,10Bb	77,66±3,72Cc

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar en la misma fila seguido de diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  entre los diferentes zumos ( $n = 3$ ) durante el mismo tiempo de almacenamiento, Media ± desviación estándar en la misma columna seguido de diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  para los zumos distinto tiempo de almacenamiento.

<sup>b</sup> Expresados en mg de ácido gálico por 100 g de muestra.

#### 4.6. Betacianinas y Betaxantinas

Las betalaínas son metabolitos secundarios nitrogenados hidrosolubles presentes en las plantas de orden *Caryophyllales*. Son pigmentos de relevante uso alimentario que se dividen a su vez en betacianinas (pigmentos rojizos-violáceos) y betaxantinas (pigmentos amarillos-anaranjados). Presentes en el higo chumbo, las betalaínas aportan compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, lo que podría tener beneficios en la salud humana (Albano et al., 2015).

En la tabla 6 se observa el contenido en betacianinas y betaxantinas presentes en el zumo de higo chumbo a lo largo del tiempo de almacenamiento. Los resultados muestran que a lo largo del tiempo de almacenamiento 1, 7, 14 y 21 la concentración de betacianinas y betaxantinas disminuyen significativamente en comparación con las muestras sin fermentar (tiempo 0), siendo éstas últimas las que presentaron mayores concentraciones de betacianinas y betaxantinas (entre 22 y 15,4 mg/L y 11,32 y 9,91 mg/L respectivamente). Por otro lado, también se observa que la concentración de betacianinas aumentó significativamente con la adición de extracto floral entre las muestras, exceptuando las muestras sin fermentar (tiempo 0) y fermentadas (tiempo 1), donde disminuyó la concentración de betacianinas. La concentración de betaxantinas sí aumenta significativamente en todas las muestras con la adición de azafrán. Estos resultados indican que la presencia de betalainas es predominante en el zumo de higo chumbo, sobre todo en las muestras ZC, aportando características antioxidantes.



Tabla 6. Contenido en betacianinas y betaxantinas (mg/L de muestra) para diferentes muestras de zumo de higo chumbo a diferentes tiempos de almacenamiento <sup>a</sup>.

	mg/L	Tiempo de almacenamiento (días)				
		T0	T1	T7	T14	T21
<b>Muestras de zumo de higo chumbo</b>	<b>betacianinas</b>					
	C	22,02±0,31Cd	12,01±0,17Bc	7,56±0,03Ab	6,4±0,02Aa	6,11±0,0
	5	21,59±0,4Cd	12,79±0,90Bc	9,93±0,07Cb	7,39±0,03Ba	6,46±0,0
	15	17,71±0,27Be	10,61±0,11Ad	8,55±0,03Bc	7,82±0,09Cb	7,02±0,0
	25	15,41±0,07Ad	10,57±0,21Ac	9,98±0,44Cc	7,65±0,03Cb	6,83±0,0
	<b>betaxantinas</b>					
	C	9,45±0,66Ac	5,52±1,56Ab	5,65±0,06Ab	4,2±0,00Aa	4,18±0,0
	5	11,32±0,10Be	6,78±0,09Bd	6,33±0,08Bc	5,10±0,04Bb	4,68±0,0
	15	9,03±0,16Ad	6,71±0,02Bc	6,49±0,04Cb	6,02±0,02Ca	6,01±0,0
	25	9,91±0,06Ad	7,60±0,78Cc	7,87±0,03Dc	6,67±0,02Db	5,97±0,0

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar en la misma columna seguido de diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  entre los diferentes zumos ( $n = 3$ ) durante el mismo tiempo de almacenamiento. Media ± desviación estándar en la misma fila seguido de diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  para los zumos de distinto tiempo de almacenamiento.

#### 4.7. Azúcares y ácidos orgánicos

En la Tabla 7 se observa la concentración de azúcares en los distintos zumos de higo chumbo a tiempos de almacenamiento 0 (sin fermentar), 1 (fermentados) y 21. Los resultados indican que la fructosa fue el azúcar predominante en los zumos (entre 3 g/L y 2 g/L aproximadamente), mientras que la glucosa se encontró a concentraciones más bajas (entre 0,8 g/L y 1,3 g/L aproximadamente). Por otro lado, la adición proporcional de extracto floral de azafrán en el zumo resultó en la disminución de los azúcares presentes significativamente, probablemente relacionado con el descenso de

la concentración de pulpa en los zumos. La manosa se encontró en el último día de almacenamiento a bajas concentraciones (entre 0,4 g/L y 0,6 g/L aproximadamente). Posterior a la fermentación tanto la glucosa como la fructosa disminuyeron, sin embargo, fue la glucosa la que presentó mayor descenso. Estos resultados indican que el probiótico *B. lactis* utilizó mayoritariamente la glucosa como fuente de sustrato. Esta tendencia en la preferencia de azúcares es similar a la reportada por otros estudios de bebidas vegetales con probióticos, donde indicaron que las bifidobacterias utilizaron como principal fuente de carbono la glucosa y en menor medida la fructosa (Dabbagh Moghaddam et al., 2018; Kun et al., 2008). Las bacterias ácido-lácticas prefieren en general el uso de monosacáridos frente a los disacáridos y otros azúcares simples (Nikmaram et al., 2015).

De este modo, los zumos de higo chumbo fueron un medio adecuado para el desarrollo de *B. lactis*, presentando alta viabilidad (Log 6-8 UFC/mL) a lo largo del tiempo de almacenamiento. Estos azúcares fermentables fueron transformados principalmente en ácidos orgánicos (Tabla 8).

Tabla 7. Contenido de azúcares (g/L de muestra) en el zumo de higo chumbo a tiempo de almacenamiento 0, 1 y 21 con distintas concentraciones de azafrán <sup>a</sup>.

Azúcares	Muestra de zumo de higo chumbo	Tiempo de almacenamiento (días)		
		0	1	21
Glucosa (g/L)	ZC	1,33±0,00	1,28±0,00	1,13±0,05
	Z5%	1,31±0,00	1,29±0,00	1,12±0,05
	Z15%	1,12±0,00	0,89±0,02	0,9±0,01
	Z25%	0,97±0,00	0,84±0,04	1,01±0,13
Fructosa (g/L)	ZC	3,00±0,14	2,86±0,00	2,77±0,02
	Z5%	2,91±0,04	2,89±0,42	2,73±±0,02
	Z15%	2,48±0,09	2,25±0,04	2,33±±0,07
	Z25%	2,17±0,00	2,01±0,45	2,03±±0,04
Manosa (g/L)	ZC	-	-	0,61±0,02
	Z5%	-	-	0,62±0,02
	Z15%	-	-	0,65±0,02
	Z25%	-	-	0,46±0,03

<sup>a</sup> Media  $\pm$  desviación estándar en la misma fila seguido de diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  entre los diferentes zumos ( $n = 3$ ) durante el mismo tiempo de almacenamiento, Media  $\pm$  desviación estándar en la misma columna seguido de diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas a  $p \leq 0,05$  para los zumos distinto tiempo de almacenamiento.

Con respecto a los ácidos orgánicos en las muestras sin fermentar, son predominantes el ácido propiónico (entre 1,3 g/L y 4 g/L aproximadamente), seguido del fítico (1,3 g/L a 0,8 g/L aprox.) y el tartárico (0,15 g/L aprox.), siendo las muestras con más contenido en extracto floral de azafrán las que presentaron mayores concentraciones de estos ácidos orgánicos. Posterior a las 24 horas de fermentación, el ácido propiónico no se pudo cuantificar y se reportó la presencia de ácido láctico producto de la fermentación de azúcares presentes en el zumo, el cual fue en aumento hasta el último día de almacenamiento (0,5 g/L a tiempo 1 y 0,6 g/L a tiempo 21 aprox.) y se mantuvo estable entre las muestras. No se apreciaron diferencias significativas con la adición de extracto floral y el ácido láctico. El ácido fórmico también se observó a partir de las 24 horas de fermentación y se mantuvo estable hasta el fin del almacenamiento (0,2 g/L aprox.).

Tabla 8. Contenido de ácidos orgánicos (g/L) presentes en el zumo de higo chumbo a tiempos de almacenamiento 0, 1 y 21 con distintas concentraciones de azafrán <sup>a</sup>.

Ácido	Muestras de zumo de higo chumbo	Tiempo de almacenamiento (días)		
		0	1	21
Fítico (g/L)	ZC	0,84 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,08
	Z5%	1,03 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,01
	Z15%	1,22 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,01
	Z25%	1,37 $\pm$ 0,00	1,29 $\pm$ 0,01	1,21 $\pm$ 0,04
Tartárico (g/L)	ZC	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,00
	Z5%	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,00
	Z15%	0,14 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,00
	Z25%	0,14 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,00
Propiónico (g/L)	ZC	1,38 $\pm$ 0,17	-	-
	Z5%	3,85 $\pm$ 0,04	-	-
	Z15%	4,14 $\pm$ 0,08	-	-

	Z25%	4,27±0,00	-	-
<b>Láctico (g/L)</b>	ZC	-	0,54±0,00	0,60±0,00
	Z5%	-	0,51±0,00	0,60±0,00
	Z15%	-	0,53±0,01	0,58±0,00
	Z25%	-	0,53±0,02	0,55±0,01
<b>Fórmico (g/L)</b>	ZC	-	0,20±0,00	0,18±0,01
	Z5%	-	0,20±0,02	0,19±0,00
	Z15%	-	0,18±0,01	0,18±0,00
	Z25%	-	0,19±0,01	0,18±0,02

#### 4.8. Análisis sensorial

En la Figura 4 se observan los resultados reportados por el panel sensorial. La adición de extracto floral de azafrán afectó al perfil organoléptico de las muestras fermentadas de higo chumbo. De acuerdo con los resultados del panel, las muestras ZC y Z5% fueron las más aceptadas en términos de color, siendo la muestra Z25% la menos aceptada, la cual presentaba notas anaranjadas. Con respecto a los demás atributos de acidez, dulzor, astringencia y post-gusto, la muestra con mayor aceptación fue la Z5%, seguido de la muestra ZC. Los valores más altos de aceptación general se encontraron en Z5% con 6,4 puntos. Estas puntuaciones toman sentido cuando se tienen en cuenta los parámetros fisicoquímicos y el perfil de azúcares y ácidos orgánicos de las muestras. Por ejemplo, la concentración de glucosa y fructosa fue mayoritaria en la muestra ZC y Z5% en comparación a las muestras Z15% y Z25%. En sumatoria, es probable que el ácido fítico predominante en las muestras Z15% y Z25% haya afectado negativamente al atributo de acidez, puesto que no resultaron deseables.

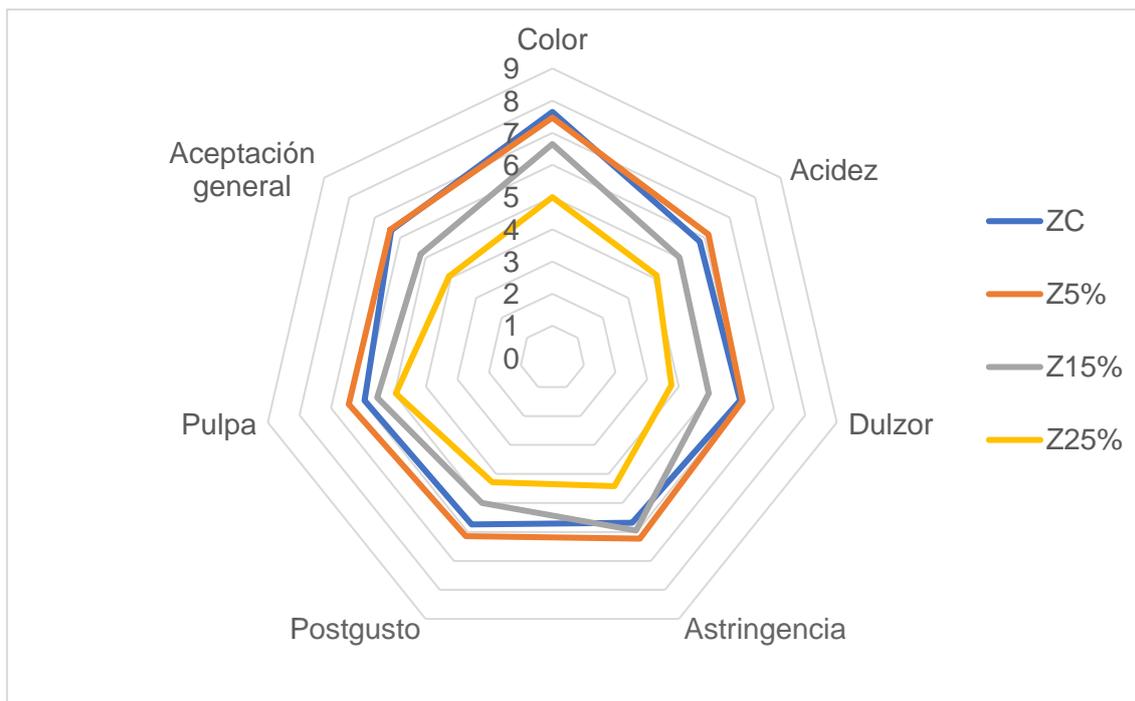


Fig. 4. Atributos sensoriales (color, acidez, pulpa, post-gusto, dulzor, astringencia y aceptación general) de muestras de higo chumbo posterior a 24 horas de fermentación.

## 5. CONCLUSIONES

El enriquecimiento de bebidas fermentadas a base de higo chumbo con extractos florales de azafrán aumenta el contenido en polifenoles totales de las muestras en comparación a las bebidas control, mientras que la capacidad antioxidante no se vio aumentada al comparar con el zumo control. Además, la viabilidad de *B. lactis* se vio favorecida en las muestras a bajas concentraciones (0 y 5%) de extracto floral de azafrán.

Al mismo tiempo, la adición de concentraciones bajas (5%) de extracto floral repercute en el perfil sensorial de las muestras de manera positiva mejorando la acidez, dulzor, astringencia, postgusto y pulpa, en comparación a las altas concentraciones (15 y 25%) y al zumo control. De esta forma, los subproductos del azafrán pueden convertirse en una alternativa a valorizar por su bajo impacto ambiental y posible desarrollo como componente de alimentos funcionales por sus características antioxidantes y concentración de polifenoles. El uso de higo chumbo como matriz para la fermentación permite obtener una alternativa con características funcionales frente a las matrices lácteas y así suplir las necesidades de consumidores intolerantes a la lactosa o vegetarianos.

Sin embargo, se necesita más investigación para conocer los cambios y efectos que puede tener el extracto floral de azafrán a nivel fisiológico, por lo que sería interesante estudiar el comportamiento de esta bebida durante una digestión in vitro.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., de Bellis, L., & Blando, F. (2015a). Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, *4*(2), 269–280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., de Bellis, L., & Blando, F. (2015b). Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, *4*(2), 269–280. <https://doi.org/10.3390/antiox4020269>
- Bagchi, D., & Nair, S. (2016). *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03724-0>
- Bedani, R., Rossi, E. A., & Saad, S. M. I. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, *34*(2), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.012>
- Begley, M., Gahan, G. M., & Hill, C. (n.d.). *The interaction between bacteria and bile*. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, *36*, 527–543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7)
- Bleich, S. N., Jones-Smith, J., Wolfson, J. A., Zhu, X., & Story, M. (2015). The complex relationship between diet and health. *Health Affairs*, *34*(11), 1813–1820. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2015.0606>
- Cerdá-Bernad, D., Clemente-Villalba, J., Valero-Cases, E., Pastor, J.-J., & Frutos, M.-J. (2022). Novel insight into the volatile profile and antioxidant properties of *Crocus sativus* L. flowers. *Antioxidants*, *11*(9), 1650. <https://doi.org/10.3390/antiox11091650>
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 149, Issue 3, pp. 185–193). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, *98*(3), 502–507. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.05.080>
- Dabbagh Moghaddam, A., Garavand, F., Razavi, S. H., & Dini Talatappe, H. (2018). Production of saffron-based probiotic beverage by lactic acid bacteria. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(4), 2708–2717. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9888-z>

- Daneshi, M., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., & Labbafi, M. (2013). Effect of refrigerated storage on the probiotic survival and sensory properties of milk/carrot juice mix drink. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5). <https://doi.org/10.2225/vol16-issue5-fulltext-2>
- Das, T. K., Pradhan, S., Chakrabarti, S., Mondal, K. C., & Ghosh, K. (2022). Current status of probiotic and related health benefits. In *Applied Food Research* (Vol. 2, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100185>
- Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(1), 31–41. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00046-5)
- De Filippis, F., Pellegrini, N., Vannini, L., Jeffery, I. B., la Stora, A., Laghi, L., I Serrazanetti, D., di Cagno, R., Ferrocino, I., Lazzi, C., Turrone, S., Cocolin, L., Brigidi, P., Neviani, E., Gobetti, M., O'Toole, P. W., & Ercolini, D. (2016). High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut*, 65(11). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>
- Dordević, T. M., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, 119(3), 957–963. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.07.049>
- Gänzle, M. G., Hertel, C., van der Vossen, J. M. B. M., & Hammes, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of Escherichia coli and Listeria in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 48(1), 21–35. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00025-2)
- García, F. H., Coll, L. A., Cano-Lamadrid, M., Lluch, D. L., Barrachina, Á. A. C., & Murcia, P. L. (2020). Valorization of Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]: Nutritional Composition, Functional Properties and Economic Aspects. In H. El-Shafie (Ed.), *Invasive Species*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92009>
- García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2019). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.11.002>
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, S116–S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Giugliano, D., Ceriello, A., & Esposito, K. (2006). The Effects of Diet on Inflammation. Emphasis on the Metabolic Syndrome. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 48, Issue 4, pp. 677–685). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.03.052>
- Katz, D. L., & Meller, S. (2014). Can we say what diet is best for health? *Annual Review of Public Health*, 35, 83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-032013-182351>
- Kirjavainen, P. v, Ouwehand, A. C., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), 185–189. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13226.x>

- Kumar Keservani, R., Vyas, N., & Kumar Sharma, A. (n.d.). *Nutraceutical and Functional Food as Future Food: A Review Pharmacological Evaluation of Diuretic & Urolithiatic effect of oleanolic acid isolated from Lantana Camara View project Journal of Pharmacy Practice and Community Medicine (www.jppcm.org) View project*.  
<https://www.researchgate.net/publication/267915464>
- Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M. K., & Ahuja, P. S. (2008). State of Art of Saffron (*Crocus sativus* L.) Agronomy: A Comprehensive Review. *Food Reviews International*, 25(1), 44–85. <https://doi.org/10.1080/87559120802458503>
- Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D., & Hoschke, Á. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected *Bifidobacterium* strains. *Process Biochemistry*, 43(8), 816–821.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.03.008>
- Liebert, A., López, S., Jones, B. L., Montalva, N., Gerbault, P., Lau, W., Thomas, M. G., Bradman, N., Maniatis, N., & Swallow, D. M. (2017). World-wide distributions of lactase persistence alleles and the complex effects of recombination and selection. *Human Genetics*, 136(11–12), 1445–1453. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1847-y>
- Masisi, K., Beta, T., & Moghadasian, M. H. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, 196, 90–97.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.021>
- Mena, P., Tassotti, M., Andreu, L., Nuncio-Jáuregui, N., Legua, P., del Rio, D., & Hernández, F. (2018). Phytochemical characterization of different prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) cultivars and botanical parts: UHPLC-ESI-MSn metabolomics profiles and their chemometric analysis. *Food Research International*, 108, 301–308.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.062>
- Metchnikoff E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London, 161–183.
- Milner, J. A. (2000). Functional foods: the US perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1654S-1659S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1654S>
- Mitsuoka, T. (1992). Intestinal Flora and Aging. *Nutrition Reviews*, 50(12), 438–446.  
<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1992.tb02499.x>
- Nazir, M., Arif, S., Khan, R. S., Nazir, W., Khalid, N., & Maqsood, S. (2019). Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 88, pp. 513–526). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.011>
- Nikmaram, P., Mousavi, S. M., Emam-Djomeh, Z., Kiani, H., & Razavi, S. H. (2015). Evaluation and prediction of metabolite production, antioxidant activities, and survival of *Lactobacillus casei* 431 in a pomegranate juice supplemented yogurt drink using support vector regression. *Food Science and Biotechnology*, 24(6), 2105–2112.  
<https://doi.org/10.1007/s10068-015-0279-5>
- Patel, S. (2015). *Opuntia Fruits as a Source of Inexpensive Functional Food* (pp. 15–30).  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-12847-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12847-4_3)

- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, *41*(2), 111–123. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2007.10.010>
- Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A. A., Gabr, A. M. M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., & Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*, *50*(2), 670–675. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.07.002>
- Saarela, M. (2009). Probiotics as ingredients in functional beverages. *Functional and Speciality Beverage Technology*, 55–70. <https://doi.org/10.1533/9781845695569.1.55>
- Sanders, M. E. (1999). *Potential and established effects of probiotic bacteria (adapted from Sanders and Huis in 't Veld, 1999)*.
- Serrano-Díaz, J., Sánchez, A. M., Martínez-Tomé, M., Winterhalter, P., & Alonso, G. L. (2013). A contribution to nutritional studies on *Crocus sativus* flowers and their value as food. *Journal of Food Composition and Analysis*, *31*(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.03.009>
- Shah, N. P., Ding, W. K., Fallourd, M. J., & Leyer, G. (2010). Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. *Journal of Food Science*, *75*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01628.x>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., & Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(2), 442–451. <https://doi.org/10.1021/jf048751y>
- Subhashree, S., & Kavita, M. S. (2019). A study on suitable non dairy food matrix for probiotic bacteria - A systematic review. In *Current Research in Nutrition and Food Science* (Vol. 7, Issue 1, pp. 5–16). Enviro Research Publishers. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.7.1.02>
- Tsiailanis, A. D., Chatziyiannis, C. M., Papaemmanouil, C. D., Chatziathanasiadou, M. v., Chaloulos, P., Riba, I., Mullard, G., Wiczowski, W., Koutinas, A., Mandala, I., & Tzakos, A. G. (2022). Exploration of Betalains and Determination of the Antioxidant and Cytotoxicity Profile of Orange and Purple *Opuntia* spp. Cultivars in Greece. *Plant Foods for Human Nutrition*, *77*(2), 198–205. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00962-7>
- Tur, J. A., & Bibiloni, M. M. (2015). Functional Foods. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 157–161). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00340-8>
- Tyutkov, N., Zhernyakova, A., Birchenko, A., Eminova, E., Nadtochii, L., & Baranenko, D. (2022). Probiotics viability in frozen food products. *Food Bioscience*, *50*, 101996. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101996>
- Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2020). Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12061666>
- Valero-Cases, E., Nuncio-Jáuregui, N., & Frutos, M. J. (2017). Influence of Fermentation with Different Lactic Acid Bacteria and in Vitro Digestion on the Biotransformation of Phenolic

Compounds in Fermented Pomegranate Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6488–6496. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04854>

Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9–10), 895–904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)

Yoon, K.-Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2004). Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology*, 42 4, 315–318.

