

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Diseño, desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana María López de Lacey

Directoras

M. Elvira López Caballero y M. Pilar Montero García

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**DISEÑO, DESARROLLO Y APLICACIÓN
DE ENVASES COMESTIBLES
POTENCIALMENTE BIOACTIVOS**

TESIS DOCTORAL

Ana María López de Lacey

Madrid, 2012



Departamento de Nutrición,
Bromatología y Tecnología
de los Alimentos



Instituto de Ciencia y Tecnología
de Alimentos y Nutrición

DISEÑO, DESARROLLO Y APLICACIÓN DE ENVASES COMESTIBLES POTENCIALMENTE BIOACTIVOS

Memoria que presenta Ana María López de Lacey para optar al grado de Doctor
por la Universidad Complutense de Madrid

Bajo la dirección de la Dra. M. Elvira López Caballero y la Dra. M. Pilar Montero
García, actuando como tutora la Dra. M. Dolores Selgas Cortecero

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (CSIC)

Madrid, junio del 2012

DOCTORA MARÍA ELVIRA LÓPEZ CABALLERO, Científico Titular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN (CSIC), y DOCTORA MARÍA PILAR MONTERO GARCÍA, Profesora de Investigación de Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN (CSIC),

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada ***Diseño, desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos***, presentada por **ANA MARÍA LÓPEZ DE LACEY** para optar al grado de **Doctor**, ha sido realizada en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (CSIC) bajo su dirección, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Madrid, a uno de junio de dos mil doce.

Dra. M^a. Elvira López Caballero
Directora de la Tesis Doctoral

Dra. M^a. Pilar Montero García
Directora de la Tesis Doctoral

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA GRACIAS A LA FINANCIACIÓN DE DIFERENTES AYUDAS Y PROYECTOS:

- Ayuda para la formación de investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, programa “Junta para la Ampliación de Estudios” (Programa JAE), durante el período de enero de 2008-2011 (JAEPRe_07_00667) y asociada al proyecto “AGL2005-02380”.
- Ayudas para estancias breves en el extranjero para beneficiarios de ayudas CSIC I3P-Ventorrillo para personal investigador formación:
 - *Department of Agroenvironmental Science and Technology. University of Bologna. Italy.* Enero-julio de 2009.
 - *Institute of Food Research. Norwich. United Kingdom.* Septiembre-diciembre de 2010.
- Proyecto AGL2008-00231/ALI, del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I).
- Programa CYTED. I+D Acción 309AC0382. Área 3.- Promoción del Desarrollo Industrial. Línea 3.5.- Recursos del agro: Obtención de materiales aditivos a partir de subproductos vegetales de la región y su aplicación en el desarrollo de envases biodegradables de uso agroalimentario y nutracéutico. Agrobioenvase.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas, sin cuya ayuda no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A las doctoras M^a Elvira López Caballero y M^a Pilar Montero García, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis con ellas, por su constante apoyo, plena dedicación y sus valiosos consejos que me han servido de guía a lo largo de estos años. Gracias, sobretodo, por sacrificar muchas veces vuestro tiempo libre para que la tesis llegue a buen puerto.

A la Dra. M^a Carmen Gómez Guillén por su valiosa ayuda durante mis primeros años en el laboratorio y por mostrarme siempre su completa disposición para responderme cualquier duda que me surgiera durante el desarrollo de la Tesis.

Al Dr. Joaquín Gómez Estaca por enseñarme muchas de las técnicas de laboratorio durante mis primeros años en el ICTAN y por su importante contribución a la Tesis, no habría podido avanzar tan rápido en la Tesis sin su estimable ayuda.

Al Dr. Efrén Pérez Santín por enseñarme muchos de los conceptos de Química que tenía olvidados, por guiarme o aconsejarme con el desarrollo de los experimentos y por su participación activa en la Tesis, realizando la mayor parte de los análisis con el HPLC, actividad antioxidante y antihipertensiva.

A la Dra. Begoña Giménez Castillo por su magnífica aportación a la Tesis y por revisarme de forma rigurosa y exhaustiva el trabajo de Norwich. Te estaré eternamente agradecida por tu enorme contribución.

A los profesores Prof. Bruno Biavati, Dr. Giovanni Dinelli, Dra. Diana di Goia y la Dra. Ilaria Marotti por acogerme en su laboratorio (Facultad de Agraria, Universidad de Bolonia) y hacerme sentirme como en casa y por introducirme en el maravilloso mundo de los probióticos.

Al Dr. Richard Faulks y a la Dra. Giusy Mandalari por permitirme trabajar en su laboratorio, *Institute of Food Research* (Norwich), ponerme a su disposición su digestor y por participar activamente en el diseño y desarrollo experimental del trabajo de digestión de las películas.

Por su puesto, quiero darle las gracias a todos mis compañeros de laboratorio que me han ayudado alguna vez en mis experimentos, permitiendo que pueda ir más rápido, facilitándome muchas veces el trabajo o simplemente animándome, apoyándome o haciéndome más amena la tarea (espero no olvidar a ninguno): Elena, Óscar, Estela, Eva, Inma, Carmen, Rubén, Cristina de las Heras, Amaia, Eva, Pilar, Torsten, Tati, Fernando, Inés, Gonzalo, Cristina Fernández, Ailén, Gemma, Inés, Nacho, Lorena, Candelas, etc. En especial, a Elena porque me enseñó muchos de los conocimientos que actualmente sé de microbiología. Tampoco puedo olvidarme

de Carmen de la Mata por estar siempre disponible cuando he necesitado ayuda, tanto en el laboratorio como dándome apoyo moral en mis días bajos con la Tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio durante mi estancia en Italia: Erwin, Cecilia, Lorenzo, Irene, Ilaria, Francesca y Loredana. Especialmente a Erwin por transmitirme muchos de sus valiosos conocimientos en microbiología y que me han sido de gran utilidad para la realización de esta Tesis Doctoral, pero sobretodo, por ser como un hermano mayor para mí durante el tiempo que estuve en Italia. Gracias Erwin también por contagiarme ese entusiasmo tuyo por la investigación.

A mis amigos Cecilia y Lorenzo por dedicarme un pequeño hueco de su tiempo cuando más lo he necesitado y por animarme con la Tesis.

A todos mis buenos amigos fuera y dentro del ICTAN: Isa, Mamen, Mari Val, Carlos, Luis, Gonzalo, Nuria, Mauri, Pablo, Ruth, Bea, María, y tantos otros. Todos vosotros me habéis animado en algún momento o escuchado cuando más lo he necesitado y me habéis dado fuerzas para seguir adelante y no rendirme. Gracias simplemente por estar allí.

A Mauri, en especial, por el pez y la flor de la portada de la tesis (realizado con las películas de agar de la presente Memoria) y por la realización de la fotografía de la portada con su manífica cámara.

A mi “pequeña” familia: hermanos Antonio, Elsa, Diego y Beatriz; cuñados Mercedes, Carlos y Jesús; y sobrinas Marta, Lucía y Elsa.

A mi hermana, y madrina, Joanna Teresa López de Lacey por el diseño de la portada de la tesis y por ayudarme a realizar el formato final de la tesis cuando estaba ya en las últimas.

A Kiko, con gran afecto, porque durante este último año de escritura de la tesis me has escuchado atentamente, soportado, aconsejado, apoyado y ayudado en todo momento. Contigo ha sido todo más fácil. Gracias por estar a mi lado.

Y finalmente, y en especial, a mis padres, Antonio López Agudo y Joan Therese de Lacey. Por ayudarme con la Tesis, por estar siempre apoyándome para que siga y no decaiga en los momentos más difíciles. Por animarme a buscar la beca y no dejarme desistir nunca, porque sin su tenacidad, no lo habría intentado siquiera.

Sin duda, me considero afortunada por recibir tan magnífica y valiosa ayuda de tantas personas. Cada uno de vosotros habéis contribuido en un pedacito de esta tesis. **Gracias.**

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ENVASES ALIMENTARIOS	1
1.1. Envases biodegradables comestibles: películas y recubrimientos	2
1.1.1. Principales funciones y aplicaciones de los envases comestibles.....	3
1.1.2. Principales componentes de películas y recubrimientos comestibles	7
1.1.2.1. Materiales formadores de películas y recubrimientos comestibles	8
1.1.2.1.1. Películas y recubrimientos constituidos a base de hidrocoloides	8
1.1.2.1.1.1. Películas y recubrimientos constituidos a base de proteínas.....	9
1.1.2.1.1.1.1. Gelatina.....	10
1.1.2.1.1.2. Películas y recubrimientos constituidos a base de polisacáridos.....	11
1.1.2.1.1.2.1. Quitosano como polímero con capacidad filmogénica.....	12
1.1.2.1.1.2.2. Agar	14
1.1.2.1.2. Películas y recubrimientos constituidos a base de lípidos.....	15
1.1.2.1.3. Películas y recubrimientos constituidos a base de mezclas de biopolímeros.....	15
1.1.2.2. Aditivos	16
1.1.2.2.1. Plastificantes	16
1.1.2.2.2. Otros aditivos.....	17
1.2. Envases activos y bioactivos comestibles	18
1.2.1. Agentes activos incorporados a películas y recubrimientos comestibles.....	20
1.2.1.1. Compuestos activos naturales de origen animal	22
1.2.1.1.1. Quitosano.....	22
1.2.1.2. Compuestos activos naturales de origen vegetal.	26
1.2.1.2.1. Aceites esenciales	29
1.2.1.2.2. Extracto de té verde.....	34
1.2.2. Bacterias incorporadas a envases comestibles.....	40
1.3. Digestión de envases activos.....	44
1.4. Legislación relacionada con las películas y recubrimientos comestibles.....	46
II. HIPÓTESIS.....	51
III. OBJETIVOS.....	55

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL 59

V. TRABAJO EXPERIMENTAL..... 63

Artículo 1. *Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil* 67

Artículo 2. *Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation* 77

Artículo 3. *Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (Camellia sinensis L.) as an expression of its chemical composition* 87

Artículo 4. *Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract* 121

Artículo 5. *Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films* 153

Artículo 6. *Survival and metabolic activity of probiotic in green tea* 175

Artículo 7. *Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols by probiotic bacteria* 211

Artículo 8. *Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish self-life* 235

Artículo 9. *Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible agar film during simulated human digestion* 255

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA..... 285

1. DESARROLLO DE ENVASES COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES Y APLICACIÓN EN PRODUCTOS PESQUEROS..... 285

 1.1. Selección de aceites esenciales antimicrobianos para su incorporación a matrices complejas (gelatina-quitosano) 285

 1.2. Aplicación de recubrimientos a la conservación de pescado refrigerado: salmón (*Salmo salar*) y bacalao (*Gadus morhua*) 290

2. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE TÉ VERDE (*Camellia sinensis*) EN RELACIÓN A SU FUNCIONALIDAD Y DESARROLLO DE ENVASES COMESTIBLES ACTIVOS 293

 2.1. Selección de un extracto de té verde (*Camellia sinensis*) según sus propiedades biológicas entre distintas variedades en base a su composición química 293

 2.2. Caracterización, evaluación de propiedades biológicas y liberación de compuestos activos de películas con extracto de té verde 302

3. INCORPORACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN ENVASES COMESTIBLES Y ESTUDIO DE SU VIABILIDAD DURANTE LA CONSERVACIÓN DE FILETE DE MERLUZA..... 313

 3.1. Funcionalidad de bacterias lácticas incorporadas a coberturas y películas comestibles 313

4. DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPLEJAS PARA LA BIOCONSERVACIÓN DE PRODUCTOS PESQUEROS	321
4.1. Viabilidad de los probióticos en presencia de los polifenoles mayoritarios del té verde y extracto de té verde	321
4.2. Biotransformación de los compuestos polifenólicos mayoritarios del té verde y extracto de té verde	321
4.3. Bioconservación de productos pesqueros mediante la aplicación de películas complejas constituidas por probióticos y extractos de té verde	332
5. BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS PROCEDENTES DE PELÍCULAS COMESTIBLES MEDIANTE MODELOS DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	341
5.1. Recuperación acumulada de compuestos en el Simulador Gastro Intestinal (SGI)....	342
5.2. Actividad antioxidante y antimicrobiana recuperada acumulativa	346
VII. CONCLUSIONES	351
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	357

RESUMEN

RESUMEN

Los residuos procedentes del procesado de pescado representan tras el fileteado aproximadamente un 75% del peso total. En la mayoría de las industrias procesadoras, el aprovechamiento o la gestión de estos residuos constituyen un serio problema a nivel mundial. Un porcentaje importante de dichos residuos son pieles, tejido conectivo y espinas ricos en colágeno. Por hidrólisis de éste se obtiene la gelatina, compuesto proteico considerado en sí mismo como un alimento dietético de alta digestibilidad. Otro gran residuo, en este caso de la industria procesadora de crustáceos, es la quitina, a partir del cual se obtiene el quitosano, polímero muy versátil y de probada funcionalidad.

Una vía que en los últimos años está mostrando un gran interés por su aplicabilidad y beneficios medioambientales es la utilización de diversos materiales a partir de residuos de la industria agraria, pesquera y acuicultura, como matrices poliméricas para el desarrollo de envases comestibles y/o biodegradables. La presente memoria se centra principalmente en la utilización de gelatina, quitosano y agar. Estos envases pueden tener capacidad funcional, principalmente antioxidante y antimicrobiana, contribuyendo a conferir estabilidad y calidad a los alimentos.

Los envases diseñados a los que se incorporan, tanto compuestos polifenólicos como microorganismos probióticos, actúan como bioconservadores en los alimentos y pueden, además, incidir en la salud del consumidor. En la literatura apenas se encuentran trabajos sobre ello, de ahí la novedad del tema propuesto.

Además, se han realizado estudios basados en la capacidad de ciertas cepas de bifidobacterias para biotransformar los compuestos polifenólicos de su entorno, modificando el perfil disponible de estos compuestos, así como su actividad.

Por otro lado, dado el carácter comestible de estos envases, se plantea evidenciar la bioaccesibilidad de los compuestos activos que forman parte del envase con objeto de valorar su potencial bioactivo tras su ingesta.

SUMMARY

The waste from fish processing after filleting represents approximately 75% of the total weight. In most processing industries, the harvesting or management of such waste is a serious worldwide problem. A significant proportion of these residues are rich in collagen (skin, bones and connective tissue). The collagen by hydrolysis is converted into gelatin that can be considered a highly digestible diet food. Another great waste, in this case from the crustacean processing industry, is chitosan, of proven functionality.

In recent years, the use of different materials such as polymeric matrix for development of food packaging and/or biodegradable is showing great interest because of their applicability and environmental benefits. This work has focused primarily on the use of gelatin, chitosan and agar as biopolymers. These matrixes may have functional capacity, mainly antioxidant and antimicrobial, by adding of active compounds that confer stability and help to maintain food quality.

Edible packaging incorporates both polyphenolic compounds and probiotics that could act as biopreservatives in food and may also contribute to be healthy products. There are scarcely any studies found in literature about this research, hence the novelty of the theme.

In addition, some studies have been conducted based on the ability of certain strains of bifidobacteria to biotransform polyphenolic compounds from their environment, modifying the available phenolic profile and their activity.

On the other hand, due to film`s edible character, it was planned to show the bioaccessibility of the active compounds that constitute part of the package in order to assess their potential bioactive

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. ENVASES ALIMENTARIOS

Los envases juegan un papel fundamental en la industria alimentaria ya que realizan importantes funciones como la de “contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercancías, desde materias primas hasta artículos acabados, y desde el fabricante hasta el usuario o el consumidor” (Directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo). Entre estas funciones destaca la acción protectora de los envases, ya que contribuyen al retraso del deterioro, aumentan la vida útil y mantienen la calidad y seguridad de los alimentos envasados.

Los envases protegen a los alimentos y bebidas de una serie de agentes externos procedentes del ambiente como son el calor, la luz, humedad, oxígeno, presión, enzimas, olores indeseables, microorganismos, insectos, suciedad y partículas de polvo o emisiones de gases, entre otros (Restuccia y cols., 2010) que suponen un detrimento de su calidad o seguridad. Por otra parte, desde un punto de vista comercial los envases se emplean para identificar un producto determinado, y también para proporcionar información importante como, por ejemplo, el peso, ingredientes o valor nutricional (Restuccia y cols., 2010).

Los materiales más utilizados para el envasado de alimentos y bebidas son los plásticos sintéticos, que se clasifican en la actualidad en siete categorías (Tabla 1). Estos polímeros sintéticos se emplean por las múltiples ventajas que presentan, como ser químicamente inertes, ligeros, resistentes, cómodos e higiénicos, y por su versatilidad de forma, tamaño, etc. (García-Díaz y Macías-Matos, 2008). Sin embargo, al ser compuestos sintéticos, no biodegradables y derivados del petróleo, su utilización supone serios problemas ecológicos debidos principalmente a la contaminación medioambiental que causan, tanto por su fabricación e incineración como por su aporte en la generación y acumulación de residuos. Por otro lado, estos polímeros sintéticos pueden vehiculizar sustancias tóxicas o no deseables como monómeros, plastificantes, antioxidantes sintéticos, aditivos, etc. presentes en su propia composición y que pueden migrar al alimento que envuelven (Nerín de la Puerta, 2009). Además de lo anteriormente expuesto, no hay que olvidar otros problemas que conllevan el uso del petróleo como materia prima, como son la disminución de las reservas petrolíferas y su precio elevado.

Por lo tanto, existe un interés tanto político como social por encontrar nuevos materiales procedentes de fuentes renovables, menos contaminantes o de fácil reciclado para envasar los

alimentos. Con ese objetivo en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones encaminadas a desarrollar nuevos materiales biodegradables, como son algunos biopolímeros, ya que éstos tienen un menor o nulo impacto medioambiental.

Tabla 1. Plásticos derivados del petróleo utilizados en el envasado de alimentos (Adaptada de Arrieta, Garrigós Selva, Jiménez Migallón y Peltzer, 2011)

Tipo	Material	Abreviatura	Aplicaciones
1	Poliétileno tereftalato	PET	Botellas
2	Poliétileno de alta densidad	PEAD	Botellas, bandejas
3	Policloruro de vinilo	PVC	Películas flexibles
4	Poliétileno de baja densidad	PEBD	Películas, bolsas
5	Polipropileno	PP	Películas flexibles
6	Poliestireno	PS	Bandejas, tarrinas
7	Otros	Policarbonatos, resinas epoxi, etc.	

1.1. ENVASES BIODEGRADABLES COMESTIBLES: PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS

Los materiales comúnmente utilizados para la elaboración de envases biodegradables de uso alimentario proceden de fuentes renovables y se caracterizan por ser capaces de formar películas que presentan unas propiedades (mecánicas, de barrera y de transmisión de la luz) similares a los plásticos convencionales pero con una alta capacidad de biodegradación. Muchos de estos materiales presentan la ventaja adicional de ser comestibles a diferencias de los plásticos convencionales. Por esta última razón, los materiales biodegradables, como son por ejemplo algunos biopolímeros, se estudian exhaustivamente en los últimos años, por su posible aplicación en el desarrollo y diseño de envases comestibles, como una forma más de proteger los alimentos.

En la bibliografía aparecen dos tipos de envases comestibles: recubrimientos y películas (denominados en inglés como *coating* y *film*, respectivamente), que se diferencian principalmente por la forma de aplicarse sobre la superficie del alimento, pero que tienen el objetivo común de alargar la vida útil del producto al cual recubren (Rojas-Graü, 2007; Pavlath y Orts, 2009) y que están en contacto directo con el alimento y frecuentemente se consumen de manera conjunta.

Un **recubrimiento** o cobertura comestible (*coating*) se define como una capa delgada de material comestible formado como un revestimiento sobre el alimento, mientras una **película** (*film*) comestible es una capa preformada y delgada elaborada con material comestible que una vez preparada puede disponerse sobre el alimento o entre los componentes del mismo (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). De forma general puede decirse que los recubrimientos se aplican en forma líquida sobre el alimento, normalmente por inmersión del producto en la solución con capacidad filmogénica, mientras que las películas elaboradas como láminas sólidas se aplican posteriormente sobre el alimento como envoltura (McHugh y Senesi, 2000).

1.1.1. PRINCIPALES FUNCIONES Y APLICACIONES DE LOS ENVASES COMESTIBLES

Los envases comestibles se aplican en alimentos de muy diversa naturaleza (frutas, verduras, carnes, dulces, cereales, pescados, etc.), normalmente en combinación con otras tecnologías de conservación (ej. refrigeración, atmósferas modificadas o controladas, tratamientos térmicos, etc.) con el fin de mejorar su calidad, seguridad o aumentar su vida útil, ya que estos envases pueden realizar diferentes funciones beneficiosas sobre el alimento como son la de actuar de barrera, mejora de las propiedades, proteger pequeñas porciones, adherir diferentes partes de un alimento o servir de soporte de aditivos, entre otras (Debeaufort y cols., 1998; Kester y Fennema, 1986; Pavlath y Orts, 2009). A continuación se detallan algunas de estas funciones y sus aplicaciones.

1.1.1.1. Barrera a la transferencia de materia y a la luz

Algunos envases tienen la capacidad de actuar de barrera frente a la transferencia de determinados componentes presentes en el alimento o en el ambiente. Esta característica resulta interesante cuando la calidad de un producto está vinculada a la pérdida o ganancia de algunos componentes como por ejemplo el agua, compuestos volátiles (aromas deseables o indeseables) o solutos (aceite, azúcares o sales).

La deshidratación o pérdida de agua representa uno de los principales problemas responsables de la pérdida de calidad en fruta fresca cortada (Rojas-Graü y cols., 2007), ya que ésta causa diversos cambios como son la pérdida de turgencia y firmeza (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009). Así por ejemplo, la cobertura comercial *Seal gum*, *Spray gum*TM a base de ésteres de sacarosa (Pavlath y Orts, 2009) se utiliza para evitar la pérdida de humedad en este tipo de productos. En ocasiones se producen fenómenos contrarios y la absorción de agua supone cambios indeseables en algunos alimentos o en diferentes partes de un producto

constituido por varios alimentos (ej. pizza, tarta de manzana, caramelos). La pizza congelada sería un buen ejemplo de esto último ya que es un producto complejo que contiene diversos tipos de alimentos con diferente contenido en agua (masa e ingredientes). En este caso, la aplicación de una cobertura entre la masa y los ingredientes reduce la transferencia de agua desde los ingredientes húmedos (con alta actividad de agua) a la masa seca (con baja actividad de agua), que en caso contrario provocan cambios indeseables en su textura, como es la de pérdida de dureza.

Esta propiedad de barrera de los envases comestibles es muy útil también en frituras, puesto que algunos recubrimientos tienen la capacidad de impedir la absorción excesiva de aceite durante su cocinado. Estas coberturas presentan dos aspectos positivos: un producto más saludable con menos aceite y una reducción de los costes al disminuir la cantidad de aceite utilizada en cada fritura. Por ejemplo, la cobertura comestible a base de pectinato de calcio *Fry Shield™* reduce la absorción de grasa durante la fritura de pescado, patatas y otros vegetales (Pavlath y Orts, 2009).

Algunas películas y recubrimientos se han aplicado con el fin de controlar la transferencia de determinados gases (oxígeno, dióxido de carbono, etc.), de tal manera que se genera dentro del envase una atmósfera idónea que retrasa el deterioro. Esta atmósfera varía en función del tipo de alimento; en frutas y verduras se utilizan películas y recubrimientos semipermeables, es decir, tienen cierta permeabilidad al oxígeno, ya que las envolturas extremadamente impermeables pueden inducir a la creación de un ambiente anaeróbico que provoca cambios indeseables en este tipo de productos, como por ejemplo la pérdida de aromas. Por otro lado, las películas impermeables al oxígeno se aplican sobre todo en productos ricos en grasa (pescado azul, frutos secos, etc.) puesto que la calidad de estos productos disminuye principalmente por la oxidación de sus lípidos. La oxidación de la grasa genera compuestos con sabores desagradables (sabor rancio) u olores indeseables. En este sentido, Lee y Krochta (2002) y Lee, Trezza, Guinard y Krochta (2002) redujeron el enranciamiento oxidativo de los cacahuets y, por lo tanto, aumentaron su vida útil mediante la utilización de una cobertura a base de proteínas de suero.

Por otro lado, la luz, en particular la radiación ultravioleta (UV), es un potente activador de la oxidación, por lo tanto los envases comestibles opacos a la luz UV constituyen una manera más de frenar la oxidación. La Figura 1 representa de forma esquemática la función de barrera ejercida por los envases comestibles frente a diversos componentes y agentes.

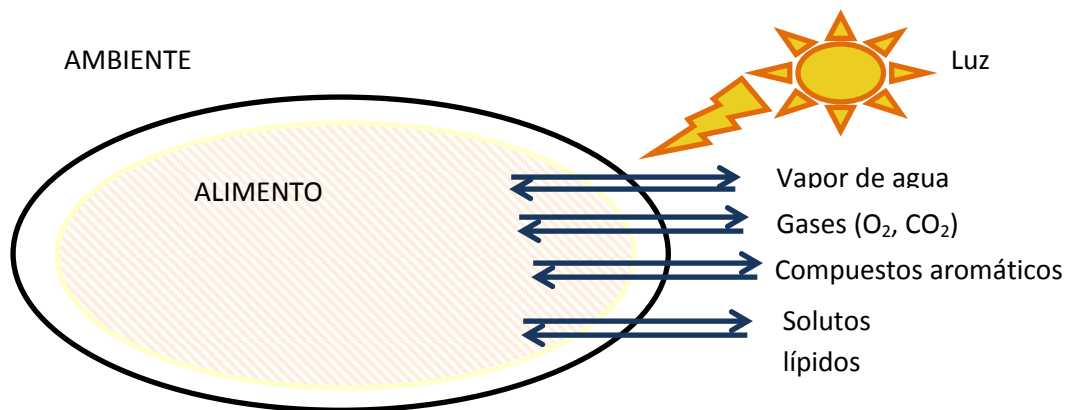


Figura 1. Función de barrera de los recubrimientos y películas comestibles (Adaptada de Debeaufort, Quezada-Gallo y Voilley, 1998)

1.1.1.2. Mejora de las propiedades sensoriales del alimento

Los envases comestibles se aplican en los alimentos para mejorar las propiedades sensoriales de un alimento: apariencia, color, brillo, transparencia, rugosidad, textura, etc. (Debeaufort, Quezada-Gallo y Voilley, 1998; Kramer, 2009). En este sentido, la empresa Viscofan, líder mundial en la producción y distribución de envolturas comestibles en productos cárnicos, comercializa un tipo de lámina comestible a base de colágeno denominada Naturin®. Estas películas se aplican como “envolturas comestibles invisibles” en jamón cocido y carne asada con el objetivo de mejorar distintas propiedades, tales como el aspecto visual, sabor, retención del jugo de la carne, y absorción del color ahumado, entre otras.

Otras coberturas interesantes que mejoran las propiedades sensoriales son las que se aplican en los donuts glaseados. El glaseado de los donuts tiende a desaparecer como resultado de la absorción de agua o porque simplemente funde. En este caso, los recubrimientos a base de agar (opción más cara) o de kappa-carragenano (opción más barata) consiguen minimizar la fusión del azúcar (Nieto, 2009) y por lo tanto mantener durante más tiempo el buen aspecto del glaseado.

Otro ejemplo de películas comestibles con esta función son las que elabora la empresa NewGemFoods™, utilizadas como envolturas alternativas al sushi o pescado crudo (denominadas como Origami Sushi Wraps®) que son visualmente más atractivas que la alga nori, o bien como sustitutos saludables de la tortilla que se usa para envolver los burritos (GemWraps®).

1.1.1.3. Protección mecánica

Los envases también se utilizan para mejorar las propiedades mecánicas de algunos alimentos frágiles, como los cereales o los alimentos liofilizados, de tal manera que faciliten su manipulación y transporte (Debeaufort y cols., 1998; Fernández Pan y Maté Caballero, 2011).

Los recubrimientos a veces protegen frente a daños mecánicos provocados por el rozamiento entre los componentes individuales de un producto (ej. cacahuetes de una bolsa). En este sentido, la cobertura *shellac* (goma laca) se aplica en especial en alimentos recubiertos con chocolate (tipo M&M) para proporcionar principalmente brillo, para proteger frente a los rasguños producidos por el rozamiento (Kramer, 2009) o para evitar que el chocolate se funda durante su almacenamiento o manejo (Martín-Belloso, Rojas-Graü y Soliva-Fortuny, 2009).

1.1.1.4. Soporte de aditivos

Los envases comestibles se emplean como una manera eficaz de añadir aditivos (por ejemplo, colorantes, especias, aromas) que impliquen una mejora en las propiedades sensoriales o que supongan incluso un aumento de las propiedades nutricionales (vitaminas, minerales, etc.).

Las películas y recubrimientos permiten añadir también otros compuestos con propiedades activas, antimicrobianos y antioxidantes principalmente, que protejan de la oxidación o inhiban el crecimiento microbiano tanto de patógenos como de responsables del deterioro. Recientemente se ha visto que las películas son adecuadas como portadoras de sustancias o bacterias con propiedades bioactivas (probióticos), con el fin de mejorar no sólo la conservación sino también para aportar determinadas propiedades beneficiosas a los alimentos. El desarrollo y diseño de envases con propiedades activas o bioactivas ha permitido sobretodo mejorar la vida útil de alimentos tan perecederos como son los productos pesqueros. Este tipo de envases se detallará en el apartado de envases activos.

1.1.1.5. Otras funciones

La envoltura o tripa a base de colágeno representa probablemente una de las películas comestibles comerciales con más éxito desde un punto de vista comercial, ya que se emplean como sustitutos de las tripas naturales en la elaboración de productos cárnicos tipo salchicha o embutido. Estas envolturas se utilizan sobre todo para mantener la integridad estructural de los productos cárnicos (Chapman y Potter, 2004), pero también tienen otras funciones beneficiosas como la de retrasar la pérdida de humedad, oxidación lipídica, decoloración, mejora de la apariencia del producto o como portador de aditivos alimentarios (Catherine Nettles, 2006; Gennadios, Hanna y Kurth, 1997; Véronique, 2008).

Otra aplicación de los envases comestibles consiste en su empleo como pegamento para adherir determinados condimentos o diferentes componentes de un alimento. Como ejemplo los tentempiés tipo barrita y *snacks* de cereales (Kramer, 2009), en los que se requiere unir diferentes componentes entre sí (cereales, semillas, frutos secos).

Todas estas funciones a las que hace referencia este capítulo pueden desarrollarse en menor o mayor medida, dependiendo de los componentes, estructura y composición de los envases comestibles. Además, en función del alimento interesará potenciar unas acciones frente a otras, ya que no todos los alimentos tienen las mismas necesidades en cuanto al mantenimiento de su calidad o de su seguridad. Por esta razón, la elección de los materiales (ej. biopolímeros) y aditivos debe realizarse de acuerdo al objetivo, naturaleza del producto y el método de aplicación (Debeaufort y cols., 1998).

1.1.2. PRINCIPALES COMPONENTES DE PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

La elaboración de los envases comestibles requiere de al menos un componente capaz de formar una matriz estructural. Esta capacidad la poseen algunos **biopolímeros** y **lípidos**, y por tanto, suelen ser la base de los envases comestibles. Muchas veces resulta imprescindible la adición de aditivos como los **plastificantes** a la formulación de estos envases, puesto que sin ellos la película resultante sería excesivamente frágil y muy poco flexible. Además de los plastificantes se pueden incluir **otros aditivos**, tal vez no tan estrictamente necesarios como los anteriores pero que su inclusión en la fórmula supone una mejora en las propiedades tecnológicas y funcionales de las envolturas. Por lo tanto, la presente memoria se centrará en los principales componentes de las películas (biopolímeros, lípidos y plastificantes), aunque también se hará mención a otros aditivos que resultan interesantes en la formulación de los envases comestibles.

1.1.2.1. Materiales formadores de películas y recubrimientos comestibles

Los materiales utilizados en la preparación de recubrimientos y películas proceden de diversas fuentes del reino animal y vegetal, tanto terrestre como marino, y así como procedente de los microorganismos (Tharanathan, 2003). Algunos de estos biopolímeros se obtienen a partir de los residuos generados de la pesca, de la agricultura o de la ganadería. Desde un punto de vista medio ambiental, el aprovechamiento de residuos resulta de gran interés puesto que se consigue obtener un rendimiento y valorizar estos desechos, reducir su cantidad y por lo tanto los costes y problemas de su eliminación.

La naturaleza de estos compuestos es muy variada, siendo principalmente de origen proteico (gelatina, proteína del suero de la leche, zeína, gluten, proteína de soja, etc.), polisacárido (celulosa, gomas, almidón, quitosano, agar, pectinas, etc.) y lipídico (ceras, grasas, aceites). Las características de las películas y recubrimientos vienen determinadas, en parte, por la naturaleza de estos compuestos y por esta razón, para explicar de forma simplificada las propiedades de los envases comestibles, se han clasificado en tres categorías en función del material de base utilizado en su formulación:

- Hidrocoloide: proteína y polisacáridos (biopolímeros).
- Lípidos.
- Mezclas: hidrocoloides y lípidos.

1.1.2.1.1. Películas y recubrimientos constituidos a base de hidrocoloides

La capacidad de los biopolímeros para interactuar entre si y con el resto de los componentes durante la formación del recubrimiento viene dado por su naturaleza, peso molecular, cargas, etc., es decir, la estructura del biopolímero condicionará la función del recubrimiento.

En líneas muy generales, la formación de una red macromolecular de un biopolímero tipo hidrocoloide requiere de algunas etapas: en primer lugar la solubilización (parcial o total) que permita una ruptura de enlaces intermoleculares de baja energía que estabilicen a los polímeros en su estado nativo; de esta manera se facilita un reordenamiento y orientación de las cadenas poliméricas y una interacción con el resto de componentes que forman la película (esta estructura se estabiliza durante el secado) (Cuq, Gontard, Cuq y Guilbert, 1998; Mauri y Añón, 2008).

1.1.2.1.1.1. Películas y recubrimientos constituidos a base de proteínas

Para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles a base de proteína se han utilizado proteínas de diferente origen, tanto animal como vegetal. Así se pueden encontrar en la literatura películas de gelatina (Giménez, Gómez-Estaca, Alemán, Gómez-Guillén y Montero, 2009), caseína, proteína aislada o concentrada del suero lácteo (Banerjee y Chen, 1995), gluten de trigo (Gontard y Ring, 1996) y proteína de soja (Brandenburg, Weller y Testin, 1993), entre otras.

Los biopolímeros proteicos forman redes macromoleculares tridimensionales que se estabilizan mediante diversos tipos de enlaces (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes y puentes disulfuro), los cuales dependen de su composición aminoacídica. Los enlaces se pueden favorecer durante el procesado, tanto por las soluciones en las que se encuentra como por el tratamiento térmico y modo de secado. Así, por ejemplo, una película a base de proteína de huevo, que contiene gran cantidad de cisteína, puede favorecer la formación de enlaces covalentes tipo puentes disulfuro en condiciones térmicas adecuadas, lo cual favorece la insolubilización de la película (Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca y Montero, 2012). Asimismo, la forma de la proteína es de gran importancia para la formación de estas redes que conforman la matriz. Las proteínas de alto peso molecular y fibrilares -como el colágeno, la gelatina y las proteínas miofibrilares- pueden formar redes más amplias con buenas propiedades mecánicas (Guillbert y Graille, 1994). En cambio, las proteínas globulares, frecuentemente de bajo peso molecular (como las proteínas aisladas de soja y proteínas sarcoplásmicas), hacen redes más compactas y menos elásticas, con menor resistencia (Mauri y Añón, 2008). También se puede modificar la estructura de la proteína por desnaturalización y agregación, pudiendo ofrecer de esta manera variaciones en las propiedades que generan al constituir la red filmogénica.

Todas estas variables y la gran diversidad de características de las distintas proteínas permiten obtener un amplio abanico de posibilidades y propiedades de las películas constituidas a partir de estos biopolímeros. En general, si bien las películas a base de proteínas presentan buenas propiedades de barrera frente al oxígeno y dióxido de carbono, son susceptibles a la humedad (Cha y Chinnan, 2004; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997).

La capacidad antioxidante que poseen determinadas proteínas aporta un valor añadido a las películas y recubrimientos elaborados a partir de ellas. Varios estudios describen las propiedades antioxidantes de las proteínas tanto de origen animal como vegetal tales como las proteínas de la leche (Cervato, Cazzola y Cestaro, 1999), zeína de maíz (Wang, Fujimoto,

Miyazawa y Endo, 1991), gliadina del trigo (Iwami, Hattori y Ibuki, 1987) o gelatina de pescado (Alemán, Giménez, Montero y Gómez-Guillén, 2011).

Entre la gran variedad de proteínas utilizadas para la elaboración de envases comestibles, la gelatina posee excelentes propiedades físicas y fácil manejo, por lo que se seleccionó para la elaboración de las películas y los recubrimientos comestibles de la presente memoria. Por este motivo se describe con más detalle.

1.1.2.1.1.1.1. Gelatina

La gelatina se obtiene a partir de la hidrólisis parcial del colágeno, el cual se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza formando parte de la piel, tendones, sistema vascular, huesos, espinas, escamas y tejido conectivo de los animales. Esta proteína se obtiene principalmente a partir de la piel y huesos de mamíferos terrestres, fundamentalmente vacuno y porcino. Sin embargo recientemente se ha incrementado la producción de gelatina a partir de productos de la pesca. Este aumento se debe a la sustitución de la gelatina de origen vacuno y porcino por la gelatina de origen marino. Las razones inicialmente han sido socio-culturales (productos *kosher* y del islam) o sanitarias (ej. encefalopatía espongiiforme), si bien últimamente se ha incrementado el interés en el aprovechamiento de subproductos y residuos generados en la industria pesquera y de acuicultura (ej. pieles y huesos), como fuente de gelatina (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero y Montero, 2011).

La gelatina se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria debido a sus excelentes propiedades gelificantes, hidratantes, formadora y estabilizadora de emulsiones y espumas, propiedades viscoelásticas o filmogénicas. En esta última propiedad se basa el desarrollo y diseño de envases comestible. La gelatina es rica en aminoácidos tales como la prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina, los cuales interaccionan durante la preparación de las películas y como consecuencia de ello, forman enlaces cruzados intra- e intramoleculares entre las cadenas proteicas (Dangaran, Tomasula y Qi, 2009). Las películas o recubrimientos basadas en gelatinas se han diseñado para recubrir los alimentos con el fin de reducir el transporte de agua, oxígeno y grasas en productos cárnicos (Gennadios, McHugh, Weller y Krochta, 1994). Si bien este tipo de películas presentan buenas propiedades de barrera a los gases (oxígeno y al dióxido de carbono), sus valores de permeabilidad al vapor de agua suele ser altos debido a que la gelatina es altamente hidrofílica (Ioannis, 2002), al igual que la mayoría de las proteínas y otros hidrocoloides. Por esta razón, para la formulación de películas o recubrimientos se recurre a la combinación de la gelatina con otras proteínas para mejorar las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua de la gelatina.

Este es el caso por ejemplo de la formación de películas complejas utilizando proteína aislada de soja y gelatina en diversas proporciones (Denavi y cols., 2009). Estos autores observaron que la formulación que contenía un 25% de proteína aislada de soja y 75% de gelatina de piel de bacalao mostró una mejora de la fuerza a la rotura hasta 1,8 o 2,8 veces mayor que la obtenida por las formulaciones con solo gelatina o proteína de soja, respectivamente, mientras que la elevadísima elasticidad que presentan las películas de gelatina de bacalao y la relativa baja permeabilidad al vapor de agua de las películas de aislado de soja se mantuvo.

Las propiedades de las películas varían en función de la procedencia de la gelatina puesto que la composición de aminoácidos de gelatinas de distintas especies es diferente, especialmente en lo que respecta a los aminoácidos mayoritarios de la gelatina (glicina, prolina e hidroxiprolina) (Gómez-Guillén y cols., 2011). Así se ha visto recientemente que las películas a base de gelatina de atún, que contienen un bajo número de residuos de prolina e hidroxiprolina, presentaron valores de deformación a la ruptura aproximadamente 10 veces mayores que los obtenidos por las películas a base de gelatina de piel bovina (Gómez-Estaca, Gómez-Guillén, Fernández-Martín y Montero, 2011). Del mismo modo, Avena-Bustillos, Olsen y cols. (2006) observaron que los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas a base de gelatina de pescado de aguas frías fueron significativamente más bajos que los de las películas a base de gelatina de pescado de aguas templadas o de mamífero, atribuyendo este hecho a la composición de aminoácidos de la gelatina de pescado de aguas frías (con un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos y bajo nivel de hidroxiprolina).

1.1.2.1.1.2. Películas y recubrimientos constituidos a base de polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros hidrosolubles de cadena larga, que se emplean en la industria alimentaria para compactar, espesar y gelificar o bien para proporcionar dureza y textura crujiente a los alimentos (Catherine y Susan, 2002). Entre los polisacáridos utilizados en la preparación de películas y recubrimientos se encuentran la celulosa y sus derivados, almidón, pectinas, alginatos, carragenatos, quitosano, entre otros.

Los polisacáridos pueden ser lineales o ramificados y se componen de la repetición de un mismo monosacárido o varios. Asimismo se pueden encontrar polisacáridos con carga neutra (ej. agar, metilcelulosa), carga negativa (alginato de sodio, carragenano, pectina) o carga positiva (quitosano) en función de los grupos químicos unidos a los monosacáridos. Estas características estructurales determinan las diferencias entre un polímero y otro en cuanto a su solubilidad, propiedades gelificantes, emulsificantes, espesantes, sinergia o

incompatibilidad entre polisacáridos o entre diferentes componentes (ej. proteínas, minerales, ácidos y lípidos), e incluso determinan sus propiedades formadoras de películas.

Las características de las películas preparadas a partir de este tipo de materiales vienen determinadas también por la estructura del polisacárido, ya que influye el número de enlaces de hidrógeno intermoleculares establecidos entre las cadenas del polímero. El peso molecular del polisacárido también juega un papel importante en las propiedades finales de las películas. Los polímeros lineales de alto peso molecular y no iónico forman películas fuertes, como es el caso del agar y la metilcelulosa. En cambio, los polisacáridos más ramificados, con o sin carga aniónica, forman películas más débiles (Nieto, 2009).

En general, los polisacáridos forman películas con buenas propiedades mecánicas y de barrera al O₂ y CO₂, pero no a la humedad (al igual que las proteínas) debido a que son también muy hidrofílicos (García, Martino y Zaritzky, 1998; Kester & Fennema, 1986; Nisperos-Carriedo, 1994), si bien es cierto que su resistencia al agua es menor que el de las películas basadas en proteínas.

Como ejemplos de biopolímeros polisacáridos en este capítulo se describirán sólo el quitosano y el agar por ser los materiales utilizados para la elaboración de los recubrimientos y películas en la presente memoria. El quitosano se seleccionó principalmente por sus conocidas propiedades antimicrobianas y antioxidantes, mientras que el agar se eligió por ser un biopolímero de carga neutra, relativamente inerte, por lo que presenta menos interacción con los componentes del alimento o del envase.

1.1.2.1.1.2.1. Quitosano como polímero con capacidad filmogénica

El quitosano es un polímero lineal derivado de la N-desacetilación parcial de la quitina (véase Figura 2). La quitina se localiza en el exoesqueleto de los crustáceos, en la pared de los hongos y en otros materiales biológicos (algas verdes) y representa uno de los biopolímeros más abundantes de la naturaleza, después de la celulosa. La estructura del quitosano está formado por unidades de glucosamina y N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces β -(1→4) (Figura 2).

Bajo el nombre común de quitosano se esconde en realidad un amplio grupo de polímeros que se diferencian entre sí principalmente por su peso molecular (50 KDa a 2000 KDa) o valor de viscosidad y grado de desacetilación o porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula del quitosano (50-98%) (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos y Montero, 2005; Rinaudo, 2006). Estos tres parámetros son básicos en la caracterización de los quitosanos ya que sus características o propiedades vienen determinadas en parte por ellos.

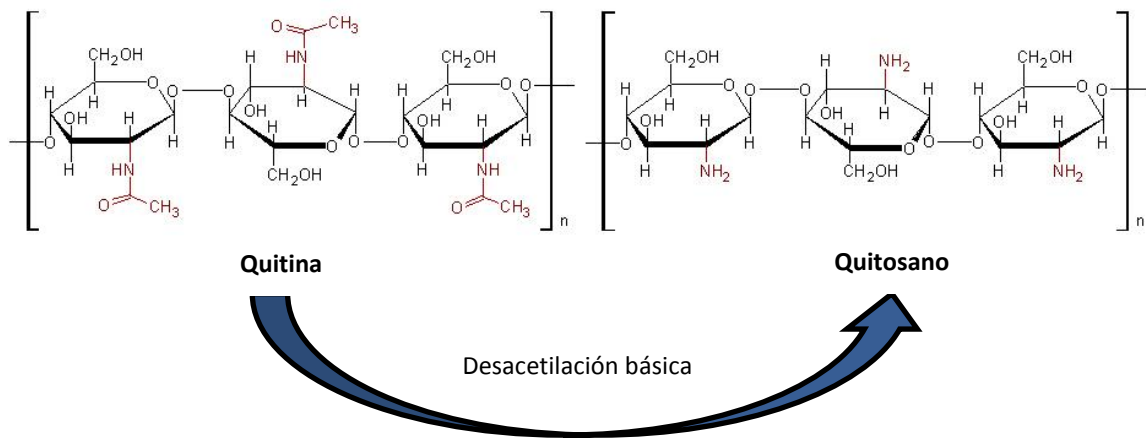


Figura 2. Estructura de la quitina y del quitosano.

Debido a las excelentes propiedades funcionales y biológicas que posee, el quitosano se ha empleado tanto solo como en combinación con otros polímeros naturales (almidón, gelatina, alginatos y otros), en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, agraria, tratamiento de aguas y cosmética (Kong, Chen, Xing y Park, 2010). En los últimos años este polímero se ha aplicado en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles por ser un material biodegradable, no tóxico y biocompatible y con capacidad filmogénica. En general, las películas y recubrimientos de quitosano son claros, fuertes, flexibles y con buenas propiedades de barrera al oxígeno y dióxido de carbono, pero como biopolímero polisacárido presentan una alta permeabilidad al vapor de agua. Sin embargo, algunos autores describen que las propiedades de las películas varían en función del grado de acetilación y peso molecular del quitosano utilizado para la formación de las mismas. En este sentido, Park, Marsh y Rhim (2002) observaron que los quitosanos con pesos moleculares altos forman películas más fuertes. Las propiedades mecánicas de las películas también aumentaron en este estudio cuando el ácido acético se utilizó como solvente para la preparación de las mismas (Park y cols., 2002). Por otra parte, Ki Myong, Jeong Hwa, Sung-Koo, Weller y Hanna (2006) demostraron que los quitosanos con un grado de acetilación alto forman películas con valores bajos de permeabilidad al vapor de agua, los cuales no se modificaron por la variación de pH producida por la utilización de ácido acético como solvente. Pero además de los factores intrínsecos del propio quitosano como peso molecular promedio, grado de desacetilación y viscosidad, son otros muchos los factores a tener en cuenta para evaluar su efecto sobre las

propiedades físico químicas de los recubrimientos y películas, y sobre sus propiedades activas como antimicrobianos y antioxidantes; entre estos factores extrínsecos caben destacar, por ejemplo: pH, ácido utilizado para solubilizar el quitosano, presencia de plastificantes, grado de humedad de la cobertura, etc.

Los recubrimientos de quitosano se aplican en su mayor parte en frutas y vegetales (Davis D., 1989; El Ghaouth, Arul, Ponnampalam y Boulet, 1991a, 1991b) por su capacidad para formar coberturas semi-permeables (Nisperos-Carriedo, 1994). Este tipo de coberturas al ser semi-permeables pueden alterar la atmosfera interna, de tal modo que producen un retraso de la maduración y una disminución en la velocidad de transpiración en frutas y vegetales (Bourtoom, 2008; Nisperos-Carriedo, 1994). Estas películas y recubrimientos también se han utilizado para aumentar la calidad y extender la vida útil de otros alimentos, como por ejemplo, el pescado (López-Caballero, Gómez-Guillén, Pérez-Mateos y Montero, 2005), principalmente por las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que el quitosano posee, y no tanto por las propiedades físicas (ej. permeabilidad selectiva frente a determinados gases). El quitosano como ingrediente activo con propiedades antioxidantes y antimicrobianas se describe en el apartado 1.2.1.1.1.

1.1.2.1.1.2.2. Agar

El agar (también denominado agar-agar) se obtiene a partir de dos algas rojas: *Gelidium* sp. y *Gracilaria* sp., principalmente; y está constituido por una mezcla heterogénea de dos clases de polisacáridos: agarosa (fracción gelificante) y agarpectina (fracción no-gelificante), la cual se encuentra ligeramente ramificada y sulfatada (Rhim, Lee y Hong, 2011). La proporción de cada una de las fracciones varía en función de la especie de alga y las condiciones ambientales. Esta proporción afecta a las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y reológicas del agar (O'Sullivan y cols., 2010). El agar de uso alimentario se compone primordialmente por agarosa puesto que la agarpectina es eliminada durante su fabricación. La agarosa es un polímero lineal con un peso aproximado de 120 kDa y está constituida por unidades repetitivas del disacárido agarobiosa, cuya estructura es (1→4)-β-D-galactopiranosas-(1→3)-α-3,6-anhidro-L-galactosa.

El agar se utiliza en microbiología, principalmente para la preparación de medios de cultivo, pero también como laxante, como espesante para sopas, gelatinas vegetales, helados y algunos postres o como agente aclarador de la cerveza. Además de estos usos, recientemente se ha empleado en la preparación de películas y recubrimientos comestibles debido a las interesantes características que posee (Catherine y Susan, 2002). Las películas de agar son

claras y fuertes en general, aunque son frágiles y poco flexibles. Además tiene la particularidad de ser insolubles en agua en condiciones ambientales, al igual que el agar solo. La naturaleza lineal y no iónica del agar permite que las moléculas hidratadas se asocien más estrechamente, formando una red que se estabiliza por enlaces de hidrógeno intermoleculares durante el secado de la película (Nieto, 2009). La incorporación de antimicrobianos a este tipo de coberturas alarga la vida útil de la carne de ave y ternera (Ayres, 1959; Meyer, Winter y Weiser, 1959), aunque por otro lado, no evita las pérdidas de humedad (Catherine y Susan, 2002).

1.1.2.1.2. Películas y recubrimientos constituidos a base de lípidos

Las ceras y las grasas fueron los primeros materiales utilizados para cubrir los alimentos. Las ceras se emplean desde hace siglos en China para la conservación de frutas, con datos que se remontan al siglo XII (Gontard, Thibault, Cuq y Guilbert, 1996; Krochta y Baldwin, 1994), mientras que la utilización de las grasas data del siglo XVI para prevenir la contracción de la carne (Baker, Baldwin y Nisperos-Carriedo, 1994; Kester y Fennema, 1986). Hoy en día, los lípidos solos o en combinación con otros compuestos, se aplican como envases comestibles en carnes, pescados, frutas, vegetales, semillas, caramelos, quesos, alimentos frescos, curados, congelados o procesados (Rhim y Shellhammer, 2005).

En la actualidad, para la preparación de películas con características hidrofóbicas se utilizan, en orden de eficacia como películas de barrera: ceras, lacas (*shellac*), ácidos grasos y alcoholes, glicéridos acetilados y compuestos a base de cacao y sus derivados. La mayor o menor eficacia para actuar como barrera depende de la composición química de la molécula, es decir, de la presencia de elementos polares, longitud de la cadena hidrocarbonada y el grado de insaturación o acetilación (Debeaufort y Voilley, 2009).

En general este tipo de coberturas actúan como barrera al agua ya que son poco polares, si bien forman películas gruesas y frágiles (Bourtoom, 2008) que pueden adherirse mal a las superficies hidrofílicas (Ben y Kurth, 1995) y que en algunos casos pueden tener incluso una escasa permeabilidad a O₂, CO₂ y etileno (Hernández, 1994).

1.1.2.1.3. Películas y recubrimientos constituidos a base de mezclas de biopolímeros

Los biopolímeros de diferente naturaleza o estructura se pueden combinar entre sí de tal manera que se compensen las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Así se han descrito películas y recubrimientos basados en mezclas de proteínas y polisacáridos, proteínas y lípidos o polisacáridos y lípidos. Estas combinaciones se consiguen: a) incorporando el componente inmisible (lípido) dentro de la solución filmogénica (hidrocoloide) mediante la formación de

una emulsión, suspensión o dispersión, b) incorporando los diferentes componentes en sucesivas capas (películas y recubrimientos multicapa), o por último c) mezclando los compuestos con un disolvente en el que los diversos biopolímeros sean miscibles (Bourtoom, 2008; Kamper y Fennema, 1985; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997). De este modo las propiedades mecánicas, de barrera a gases y humedad o la adhesión de las coberturas se mejoran con la combinación de varios biopolímeros (Baldwin, Nisperos-Carriedo y Baker, 1995). Las posibilidades son infinitas y en la literatura existe una gran variedad de copolímeros con diferentes propiedades (Bourtoom, 2008). En este sentido, la adición de lípidos a las películas y recubrimientos constituidos a base de hidrocoloides (carbohidrato o proteínas) mejora las propiedades de barrera a la humedad y al oxígeno de las mismas. Así, por ejemplo, la incorporación de aceite de girasol (2 g/L) a películas basadas en almidón disminuye los valores de permeabilidad al vapor de agua debido a la hidrofobicidad que aporta (García, Martino y Zaritzky, 2000). Otras veces, para mejorar las propiedades mecánicas de las películas y recubrimientos se recurre a la combinación de varios hidrocoloides. Esto es el caso de las películas basadas en quitosano, a las que se han añadido otros agentes formadores de películas y recubrimientos tipo hidrocoloide, con el propósito de incrementar sus propiedades mecánicas, como por ejemplo, almidón (Vásconez, Flores, Campos, Alvarado y Gerschenson, 2009; Xu, Kim, Hanna y Nag, 2005), proteínas séricas (Ferreira, Nunes, Delgadillo y Lopes-da-Silva, 2009) o gelatina (Arvanitoyannis, Nakayama y Aiba, 1998), entre otros. Xu y cols. (2005) elaboraron películas con quitosano y almidón, y descubrieron que las películas con mayor contenido en almidón mostraron una menor tasa de transmisión de vapor al agua y mayores valores de tensión máxima y elongación a la rotura.

1.1.2.2. Aditivos

Los aditivos son componentes que se añaden a las películas o recubrimientos para proporcionarles las características o cualidades de las que carecen o para mejorar las que poseen. El grupo más importante dentro de los aditivos lo conforman los plastificantes puesto que su adicción resulta a veces imprescindible para la formación de un envase comestible, especialmente en el caso de las películas y por esta razón merece una sección aparte.

1.1.2.2.1. Plastificantes

Las películas a base de polisacáridos o proteínas suelen ser quebradizas y poco flexibles por lo que requieren de la adicción de plastificantes (Gennadios y cols., 1994). Los plastificantes son compuestos de pequeño peso molecular que se añaden a las coberturas para mejorar su flexibilidad y propiedades mecánicas (Dangaran y cols., 2009). La adición de

plastificantes modifica la organización polimérica de la red proteica tridimensional, disminuyendo las fuerzas de atracción intermoleculares, incrementando el volumen libre y favoreciendo la movilidad de las cadenas (Banker, Gore y Swarbrick, 1966). Numerosos autores han estudiado el efecto que produce el tipo y concentración de los plastificantes hidrofílicos en las propiedades de las películas de proteínas (Bourtoom, Chinnan, Jantawat y Sanguandeeul, 2006; Coupland, Shaw, Monahan, Dolores O'Riordan y O'Sullivan, 2000; Cuq, Gontard, Cuq y Guilbert, 1997; Nathalie Gontard, Guilbert y Cuq, 1993; Gounga, Xu y Wang, 2010; Sobral, Dos Santos y García, 2005). El efecto plastificante se evidencia más cuando la molécula empleada es más pequeña y más hidrofílica. Hay que restringir su uso, ya que un exceso puede tener efectos negativos sobre las propiedades de barrera de las películas. Entre los plastificantes más frecuentes se encuentran los polioles (sorbitol, glicerol, polietilenglicoles y los derivados del glicerol), azúcares y ácidos grasos. Los polioles son particularmente efectivos como plastificantes, siendo el glicerol el más comúnmente empleado en las formulaciones de películas de proteínas. Por otro lado, el sorbitol es un agente crioprotector además de plastificante, y combinado con el glicerol aumenta la permeabilidad al vapor del agua y la resistencia mecánica de las películas, aunque reduzca un poco la flexibilidad que le aporta el glicerol (Chick y Ustunol, 1998). Este hecho, unido a que el glicerol produce además mayor absorción de humedad que el sorbitol (Cho y Rhee, 2002), hace que normalmente se utilice una combinación a partes iguales entre ambos polioles para conseguir de este modo unos efectos intermedios.

1.1.2.2.2. Otros aditivos

Además de los plastificantes existen otros aditivos que se añaden para mejorar las propiedades tecnológicas de las películas o recubrimientos. Los antiadherentes, humectantes o emulsionantes (ej. lecitina) son algunos de los ejemplos de esta clase de aditivos (Kramer, 2009). En este sentido los compuestos antiadherentes (ej. polisorbatos) se añaden a las películas o recubrimientos basados en almidón para hacerlas menos pegajosas y de esta forma evitar que tanto las películas como la superficie de los alimentos recubiertos se adhieran unas con otras. Los humectantes mantienen la película hidratada de forma que garantizan su flexibilidad y elasticidad en condiciones ambientales con baja humedad (Kramer, 2009). Por otra parte los emulsionantes son sustancias que se añaden a la solución filmogénica para la formación o estabilización de las emulsiones, especialmente en la elaboración de mezclas de biopolímeros de distinta naturaleza (ej. proteínas, o carbohidratos y lípidos). A veces se utilizan para aumentar la adherencia entre el alimento y el recubrimiento, o se dispone entre dos

capas de películas de diferente polaridad como ocurre en los sistemas multicomponente (Quezada-Gallo, 2009).

Asimismo hay otros aditivos que se añaden a las películas y recubrimientos para mejorar las propiedades sensoriales o nutricionales de los alimentos o de los mismos envases, como es el caso de los saborizantes, aromatizantes, colorantes, nutrientes o nutraceuticos, etc.

Otros aditivos habitualmente empleados son aquellos que confieren propiedades activas principalmente antimicrobianas o antioxidantes, a los envases, o incluso bioactivas. La adición de estos aditivos conlleva un aumento de las propiedades funcionales de las películas y recubrimientos comestibles y que implican, en definitiva, una mejora en la calidad y seguridad del alimento cuando se protege con este tipo de envases. Dada la importancia que este tipo de aditivos tiene en la presente memoria se dedicará a continuación un capítulo aparte.

1.2. ENVASES ACTIVOS Y BIOACTIVOS COMESTIBLES

En los últimos años se han desarrollado diferentes e innovadoras estrategias que prolonguen la vida útil de los alimentos o incluso aumenten la calidad o seguridad de los mismos con una mayor eficacia que las tecnologías tradicionales (pasteurización, irradiación, refrigeración, atmósferas modificadas, etc.). En este sentido han ido surgiendo diversas tecnologías, como las altas presiones, fluidos supercríticos, altas frecuencias, los pulsos luminosos, los pulsos eléctricos, los ultrasonidos o los **envases activos**, cuya aplicación en la industria son una realidad, aunque los productos tratados con estas tecnologías todavía no son muy numerosos, al menos con algunas de ellas. La novedad en sí principalmente reside en la utilización conjunta de algunas de estas tecnologías para mejorar su efectividad sin que su tratamiento sea muy drástico, retomando así el concepto de tecnologías de barrera y de mínimo procesado.

Entre estas tecnologías, los envases activos han cobrado gran protagonismo en los últimos años. Estos envases se realizan con materiales a los cuales se les ha añadido agentes activos (antimicrobiano, antioxidante, etc.), con el objeto de alargar la vida útil y mantener o incluso aumentar la calidad o seguridad del alimento. Para el diseño y desarrollo de envases activos se utilizan como base materiales no comestibles (papel, cartón, plásticos, metales o una combinación de ellos) (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan van den Beuken y Tobback, 2008) y materiales comestibles (biopolímeros) (Martín-Belloso y cols., 2009), aunque en este último caso en menor escala. Este capítulo se centrará sólo en los envases activos comestibles.

Es importante señalar que el envase bioactivo comestible se diferencia del envase activo en que aquel tiene además una repercusión sobre la salud del consumidor, ya que da lugar a alimentos más saludables. Algunos ejemplos de envases bioactivos son las películas o recubrimientos que contienen vitaminas, fibra dietética, fitoquímicos, prebióticos, enzimas o probióticos (Martín-Belloso y cols., 2009), que contienen compuestos con reconocido efecto positivo en el organismo del consumidor.

Los agentes activos con o sin propiedades bioactivas se incorporan a la formulación del envase comestible de tal forma que la liberación de éstos se realice por contacto directo entre la película y el alimento. Una vez liberado el compuesto debe ejercer su acción biológica sobre el alimento. Dicho así parece una tarea sencilla, pero no lo es tanto porque en ocasiones los componentes de la formulación del envase dificultan la liberación del principio activo, mientras que también puede suceder que el principio activo no difunda porque interacciona con el alimento, etc. Así por ejemplo, para la selección de los principios activos que formarán parte del envase comestible se debe tener en cuenta no sólo su efectividad frente al microorganismo diana sino también las posibles interacciones entre el principio activo, envase y los componentes del alimento. Estas interacciones pueden modificar la actividad antimicrobiana o antioxidante, la liberación o difusión del principio activo o modificar las características finales de los envases comestibles.

A pesar de ello, la incorporación de compuestos activos a través de los envases comestibles ofrece una mayor ventaja que la aplicación directa del compuesto ya que en este último caso se requiere mayor cantidad de conservante en contacto con el alimento para producir el mismo efecto protector. Asimismo, la adición de agentes activos a los envases comestibles permite controlar la velocidad de difusión, por ejemplo del agente antimicrobiano, de tal manera que se consiguen concentraciones altas de los compuestos activos en la superficie del producto (donde la contaminación es frecuente) durante un periodo de tiempo más largo (López, Sánchez, Batlle y Nerin, 2007).

La protección de un alimento mediante el empleo de envases activos comestibles se realiza abordando diferentes estrategias, dependiendo del tipo de deterioro o daño que queramos evitar (oxidación, pardeamiento, degradación de grasas o proteínas, contaminación microbiológica, cambios de textura, etc.), y en base a esto se seleccionan los materiales y agentes activos más convenientes para alcanzarlo. Por lo tanto las posibilidades que ofrecen las películas y recubrimientos para el diseño de envases activos con diferentes propiedades funcionales son enormes. Sin embargo no siempre resulta empresa fácil diseñar envases comestibles con ciertas propiedades activas y en este sentido, el desarrollo y aplicación de

películas y recubrimientos comestibles con características antimicrobianas en productos muy perecederos (ej. pescado) aún representa un reto para los investigadores.

1.2.1. AGENTES ACTIVOS INCORPORADOS A PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Como ya se ha mencionado con anterioridad, una forma de conseguir envases con propiedades activas es mediante la incorporación de agentes activos. Para el diseño y desarrollo de los envases activos comestibles de la presente memoria se han utilizado agentes potencialmente bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, puesto que la oxidación y el crecimiento microbiano (bacterias, levaduras y mohos) son dos procesos íntimamente relacionados con el deterioro de los alimentos.

Se entiende por antioxidante aquellas moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otros compuestos tales como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Gülçin, 2012; Halliwell, Murcia, Chirico y Aruoma, 1995). Estas moléculas actúan mediante uno o varios de los siguientes mecanismos: 1) “secuestro” de los radicales libres o especies reactivas (llamados oxidantes o prooxidantes) y posterior transformación de los mismos en radicales estables, inertes o de baja reactividad; 2) prevención de la formación enzimática de especies reactivas, inhibiendo la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes (ej. xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa, etc.); 3) inhibición de la formación de especies reactivas dependiente de metales; 4) activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes (ej. superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, etc.); 5) absorción de la luz UV; 6) creación de una capa protectora entre el aceite y la superficie del aire (ej. fosfolípidos); 7) regeneración parcial de otros antioxidantes, como por ejemplo, la vitamina E, y 8) mediante la captación de oxígeno (Gramza y Korczak, 2005; Magalhaes, Segundo, Reis y Lima, 2008; Singh y Singh, 2008). Los métodos más frecuentemente utilizados para determinar la actividad antioxidante de un compuesto se describen en el apartado 1.2.1.2.1.

Los antioxidantes añadidos a los envases comestibles permiten aumentar la estabilidad de los componentes de los alimentos al inhibir o retrasar la oxidación de lípidos u otros compuestos (proteínas, vitaminas, etc.), manteniendo su valor nutricional, sabor y color al prevenir la rancidez oxidativa, degradación y decoloración (Quezada-Gallo, 2009). Asimismo estos compuestos al ingerirse con el envase pueden ejercer una acción protectora frente a los efectos perjudiciales producidos por los radicales libres en el organismo del consumidor o retrasar el progreso de muchas enfermedades crónicas (Gulcin, 2012). Los antioxidantes incorporados a recubrimientos y películas comestibles son numerosos, por ejemplo, se

encuentran el ácido ascórbico, ácido cítrico, glutatión, cisteína, entre otros (Martín-Belloso y cols., 2009).

Por otra parte, los compuestos con propiedades antimicrobianas se utilizan para aumentar la vida útil o seguridad de los alimentos mediante el control de la microbiota, ya sea propia o adquirida. Entre los antimicrobianos más comúnmente empleados en envases comestibles destacan los ácidos orgánicos, quitosano, polipéptidos como la nisina, sistema lactoperoxidasa, extractos de plantas y aceites esenciales (Campos, Gerschenson y Flores, 2011).

En general, para la elaboración de envases activos comestibles, la tendencia es elegir antimicrobianos y antioxidantes seguros (no tóxicos) y procedentes de fuentes naturales, debido en parte a que muchos consumidores demandan productos más frescos, poco o nada procesados, seguros y más saludables, pero con una menor cantidad de aditivos sintéticos (Burt, 2004; Devlieghere, Vermeiren y Debevere, 2004). En este sentido, los antimicrobianos y antioxidantes de origen natural son preferibles a los sintéticos para el diseño de envases comestibles, ya que al ser compuestos naturales están menos asociados a los efectos adversos ocasionados por los conservantes sintéticos. Sin embargo, la toxicidad de los agentes activos naturales empleados en este tipo de tecnologías (envasado activo comestible) debe evaluarse igualmente (Jung, 2002).

En la literatura se describen una gran variedad de ingredientes activos/bioactivos naturales o no, utilizados o propuestos para el diseño y desarrollo de envases activos comestibles con objeto de evitar el deterioro de los alimentos. Sin embargo, a pesar de la extensa lista de sustancias activas, existen grandes limitaciones en su uso o en su efectividad. Por ejemplo, los aceites esenciales tienen un olor muy intenso, por lo que se deben utilizar en pequeña cantidad; otros son poco efectivos en las dosis permitidas en la legislación (ej. sorbatos, etc.). Por lo tanto, hoy por hoy sigue siendo un reto encontrar el compuesto activo ideal para el desarrollo de envases activos comestibles.

Esta memoria se centra en los agentes activos con propiedades antimicrobianas o antioxidantes procedentes de fuentes naturales, tanto de origen animal como vegetal y en agentes de naturaleza microbiana con propiedades bioactivas. En base a esto, los ingredientes activos utilizados se clasifican en función del origen: animal, vegetal y microbiano. Asimismo se expondrá la estructura química y las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los agentes activos que han tenido mayor relevancia en cada categoría, tales como el quitosano, extractos de plantas (aceites esenciales y el extracto de té verde) y las bacterias ácido lácticas. En la memoria también se revisan las propiedades antimicrobianas y antioxidantes y la

aplicación de los envases activos o bioactivos comestibles preparados a partir de estos mismos compuestos.

1.2.1.1. Compuestos activos naturales de origen animal

Muchos de los sistemas antimicrobianos de origen animal están con frecuencia implicados en los mecanismos de defensa del huésped (Tiwari y cols., 2009). La naturaleza de estos antimicrobianos naturales es muy variada puesto que se encuentran enzimas, péptidos, proteínas, lípidos o polisacáridos con propiedades antimicrobianas (Tiwari y cols., 2009) y esto implica que tanto sus propiedades activas como su mecanismo de acción sea muy variada también. Dentro de este grupo el quitosano destaca por el doble papel que puede desempeñar en los envases comestibles: como biopolímero y como compuesto activo. Esta última función se expondrá a continuación ya que las características como biopolímero se mencionaron en el apartado 1.1.2.1.1.2.1.

1.2.1.1.1. Quitosano como compuesto activo

El **quitosano** posee un potencial extraordinario y numerosas propiedades en el campo de la tecnología de alimentos basadas en sus propiedades funcionales (Rinaudo, 2006). Entre ellas, desde el punto de vista tecnológico cabe destacar su poder antimicrobiano, de formación de películas protectoras, y como antioxidante, por lo que contribuye a aumentar la vida útil de los alimentos (Dallan y cols., 2007; Kumar, Muzzarelli, Muzzarelli, Sashiwa y Domb, 2004). Otras aplicaciones en la industria están relacionadas con la inmovilización de enzimas y en la encapsulación de compuestos nutraceuticos (Shahidi y Abuzaytoun, 2005). Desde el punto de vista fisiológico, el quitosano tiene también una gran importancia por actuar como agente reductor de la absorción intestinal de lípidos y regulador de la motilidad del tránsito intestinal (Shahidi, Arachchi y Jeon, 1999); agente hipocolesterolémico, por lo que se utiliza como suplemento dietético (Gallaher y cols., 2002) y efecto sobre la restauración de lesiones y actividad inmune, etc. (Dallan y cols., 2007). Dada su importancia en la conservación de alimentos, a continuación se describen con más detalle las propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

Propiedades antimicrobianas del quitosano

La capacidad antimicrobiana del quitosano se ha demostrado frente a varias bacterias patógenas y del deterioro, hongos filamentosos y levaduras (Campos y cols., 2011; Kong y cols., 2010) presentes en diversos alimentos (Friedman y Juneja, 2010).

Hoy en día, los mecanismos por los cuales el quitosano ejerce su actividad antimicrobiana aún no han sido esclarecidos (Lárez Velásquez, 2008). Sin embargo, algunos autores proponen varios mecanismos que se mencionan a continuación, y que se relacionan con su carácter catiónico:

1) Las interacciones electroestáticas entre las cargas (+) del quitosano y las cargas (-) de la membrana celular pueden modificar las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo (Helander, Nurmiäho-Lassila, Ahvenainen, Rhoades y Roller, 2001), impedir el flujo normal de nutrientes/deshechos (Chung y cols., 2004) o bien producir daños a la membrana con la consecuente salida de material intracelular (Liu, Du, Wang y Sun, 2004; Raafat, von Bargen, Haas y Sahl, 2008).

2) Quelación del quitosano con metales divalentes de la pared celular que son cruciales para el mantenimiento de su estabilidad (Rabea, Badawy, Stevens, Smagghe y Steurbaut, 2003).

3) Interacción selectiva del quitosano con trazas de metales que pueden causar la inhibición de la producción de toxinas y del crecimiento microbiano (Sudarshan, Hoover y Knorr, 1992).

La capacidad antimicrobiana del quitosano y los diferentes modos de acción mencionados vienen determinados por varios factores, como el peso molecular o tiempo de almacenamiento del quitosano, tipo de microorganismo (ej. bacterias Gram-negativos (G-) o Gram-positivos (G+) o el pH del medio. Así, por ejemplo, si el pH del medio es inferior al pKa del quitosano (pH~ácido), las interacciones electroestáticas jugarán un papel importante en la actividad antimicrobiana, ya que se producirá la protonación de los grupos amino presentes en cada una de las unidades de glucosamina del quitosano, que se cargará positivamente formando una estructura llamada polielectrolito catiónico. Este polielectrolito es más soluble en medio acuoso y según muchos autores presenta una mayor capacidad antimicrobiana. El quitosano cargado positivamente interacciona con los componentes cargados negativamente presentes en la superficie de la membrana del microorganismo, ejerciendo su actividad. Sin embargo, si el pH del medio es superior al pKa, la actividad antimicrobiana está mediada por otros factores como pueden ser la capacidad quelante del quitosano (Kong y cols., 2010).

Propiedades antioxidantes del quitosano

Las propiedades antioxidantes del quitosano se deben a su capacidad para captar radicales libres y su capacidad quelante.

La capacidad secuestradora del quitosano se relaciona con la formación de un radical macromolecular estable por reacción entre el grupo amino libre residual del quitosano (NH_2) en estado protonado (NH_3^+) y el radical libre (Siripatrawan y Harte, 2010; Xue, Yu, Hirata, Terao y Lin, 1998; Yen, Yang y Mau, 2008). Esta capacidad, al igual que la actividad antimicrobiana está influida por factores como el peso molecular del quitosano, concentración (Kim y Thomas, 2007) o grado de acetilación (Park, Je y Kim, 2004). Kim y Thomas (2007) investigaron el efecto antioxidante de varios quitosanos con diferente peso molecular (30, 90 y 120kDa) a diferente concentración (0.2%, 0.58% y 1%) en salmón (*Salmo salar*). La capacidad secuestradora fue mayor en los quitosanos de menor peso molecular (30 kDa) y mayor concentración, excepto en el quitosano de 120 kDa que no mostró diferencias a ninguna concentración.

Como ya se mencionó, la actividad antioxidante del quitosano también se relaciona con su capacidad quelante. Así el quitosano retrasa la oxidación de los lípidos en sistemas modelo de pescado mediante la quelación del ión ferroso, presente en la ferritina, hemoglobina y mioglobina (Friedman y Juneja, 2010), eliminando de este modo la actividad pro-oxidante del ión ferroso o previniendo su conversión a ión férrico (No, Meyers, Prinyawiwatkul y Xu, 2007). Se cree que en la quelación del ión Fe^{2+} participan el grupo hidroxilo y el grupo amino presentes en carbono 6 y 2 del quitosano, respectivamente (Yen y cols., 2008). Asimismo, Xue y cols. (1998) proponen que la capacidad antioxidante del quitosano no sólo se debe a la formación de complejos con los iones metálicos sino también a la combinación de éste con los lípidos. De acuerdo con Qin (1993) la habilidad del quitosano para quelar iones está fuertemente relacionada con el grado de acetilación, ya que los quitosanos altamente acetilados poseen una baja capacidad antioxidante debido al bajo número de grupos amino libres. Yen y cols. (2008) obtuvieron resultados similares en quitosanos con diferente grado de acetilación.

Envases comestibles con quitosano

Los recubrimientos y películas formulados con quitosano se han aplicado a una gran variedad de alimentos (frutas, vegetales, pescado, carne, etc.) con el fin de alargar su vida útil (C. S. Chen, Liao y Tsai, 1998; Krochta y De Mulder-Johnston, 1997; López-Caballero y cols., 2005; Nisperos-Carriedo, 1994; No y cols., 2007; Simpson, Gagne, Ashie y Noroozi, 1997).

Este aumento de la vida útil se debe en parte a las propiedades antimicrobianas que aporta el quitosano a las películas y recubrimientos. En este sentido, López-Caballero y cols. (2005) elaboraron una cobertura con una mezcla de gelatina y quitosano y lo aplicaron en hamburguesas de bacalao. Estas coberturas impidieron el deterioro del pescado al disminuir

los valores de nitrógeno básico volátil total y los recuentos microbianos, en particular, los recuentos de bacteria Gram-negativos y de algunos organismos específicos del deterioro. Las películas y recubrimientos a base de quitosano se han aplicado también con éxito en zanahoria (Durango, Soares y Andrade, 2006), fresas (Park, Stan, Daeschel y Zhao, 2005) o jamón (Ouattar, Simard, Pielt, Bégin y Holley, 2000) con el mismo fin, inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o del deterioro.

Algunos autores mencionan que la efectividad del quitosano como antimicrobiano en los envases comestibles depende en cierto modo de la técnica aplicada, ya que su disponibilidad para actuar como conservante es mayor cuando está disuelto en la solución filmogénica que cuando se encuentra formando parte de una película (Vásconez, Flores, Campos, Alvarado y Gerschenson, 2009; Zivanovic, Chi y Draughon, 2005). Con el objeto de aumentar la acción antimicrobiana, el quitosano se suele combinar con otros agentes antimicrobianos como el sorbato potásico, nisina y aceites esenciales (Hosseini, Razavi y Mousavi, 2009; Pranoto, Rakshit y Salokhe, 2005; Vásconez y cols., 2009). Aunque la incorporación de otros agentes antimicrobianos supone un aumento de la actividad antimicrobiana, a la vez implica una modificación de las propiedades físicas y mecánicas de las coberturas. Hosseini y cols. (2009) describen que las películas de quitosano con aceites esenciales de tomillo, clavo y canela, en general inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el tomillo el aceite que mostró mayor actividad. Las películas sin aceites esenciales no mostraron inhibición del crecimiento, hecho atribuido a la incapacidad del quitosano a difundir a través del agar (medio de cultivo). Por otra parte, los aceites esenciales modificaron las propiedades físicas y mecánicas de las películas, causando incluso rotura de la red que fue inducida por los aceites esenciales. Pranoto y cols. (2005) obtuvieron resultados semejantes en películas de quitosano con aceite de ajo.

Los envases formulados con quitosano también exhiben propiedades antioxidantes que permiten alargar la vida útil de los alimentos, si bien los trabajos en la literatura al respecto son menos numerosos. Como ejemplo, se mencionan las coberturas a base de quitosano y aceite de pescado elaboradas por Duan, Cherian y Zhao (2010). Estos recubrimientos incrementaron hasta tres veces los lípidos totales y los ácidos grasos omega-3, redujeron la oxidación de lípidos e inhibieron el crecimiento de microorganismos psicotróficos en bacalao fresco (*Ophidian elongates*) y no produjeron cambios de color en el pescado, aunque sí disminuyeron el pH y el contenido de humedad de las muestras. En otro estudio, Souza y cols. (2010) consiguen aumentar la vida útil 3 días en salmón (*Salmo salar*) conservado a 0 °C

mediante la utilización de recubrimientos a base de quitosano, lo que se manifiesta por una disminución de los recuentos de los aerobios totales y una reducción significativa en los valores de ácido tiobarbitúrico (TBA) a partir del día 9 de conservación.

1.2.1.2. Compuestos activos naturales de origen vegetal

Desde la antigüedad, las hierbas y especias han sido empleadas como condimentos y como conservantes naturales para prevenir el deterioro y aumentar la vida útil de los alimentos debido a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que exhiben (Davidson, Post, Bramen y McCurdy, 1983.; Lewis, 1984; Morros, 2009; Nakatani, 1994; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López y Pérez-Álvarez, 2011). Sin embargo, el interés por los extractos y aceites esenciales de hierbas y especias ha crecido en los últimos años debido a la tendencia actual por reducir o incluso reemplazar el uso de los conservantes convencionales químicos, menos “naturales”, y por aportar las propiedades beneficiosas de estos productos al alimento y al consumidor.

La eficacia antimicrobiana y antioxidante de estos extractos vegetales se determina por la estructura química de sus componentes y por la concentración de los mismos. Los principales grupos presentes en los extractos de plantas son los compuestos fenólicos (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y sus derivados, cumarinas, lignanos, taninos, flavonoides, quinonas, etc.), alcaloides, terpenoides, lecitina y otros compuestos (poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos y glucosidos) (Cowan, 1999). Así, los compuestos fenólicos presentes en gran porcentaje son los principales responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos vegetales (Beuchat y Golden, 1989). Los compuestos fenólicos o polifenoles son un amplio grupo de sustancias, con diferente estructura química y actividad, que provienen del metabolismo secundario de las plantas (Figura 3). Se localizan en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos donde llevan a cabo diversas funciones como protección frente a factores externos (radiación UV, mordiscos de animales y ataque de insectos, bacterias, virus u hongos) o participación en los mecanismos de atracción o repulsión (olor, color).

POLIFENOLES

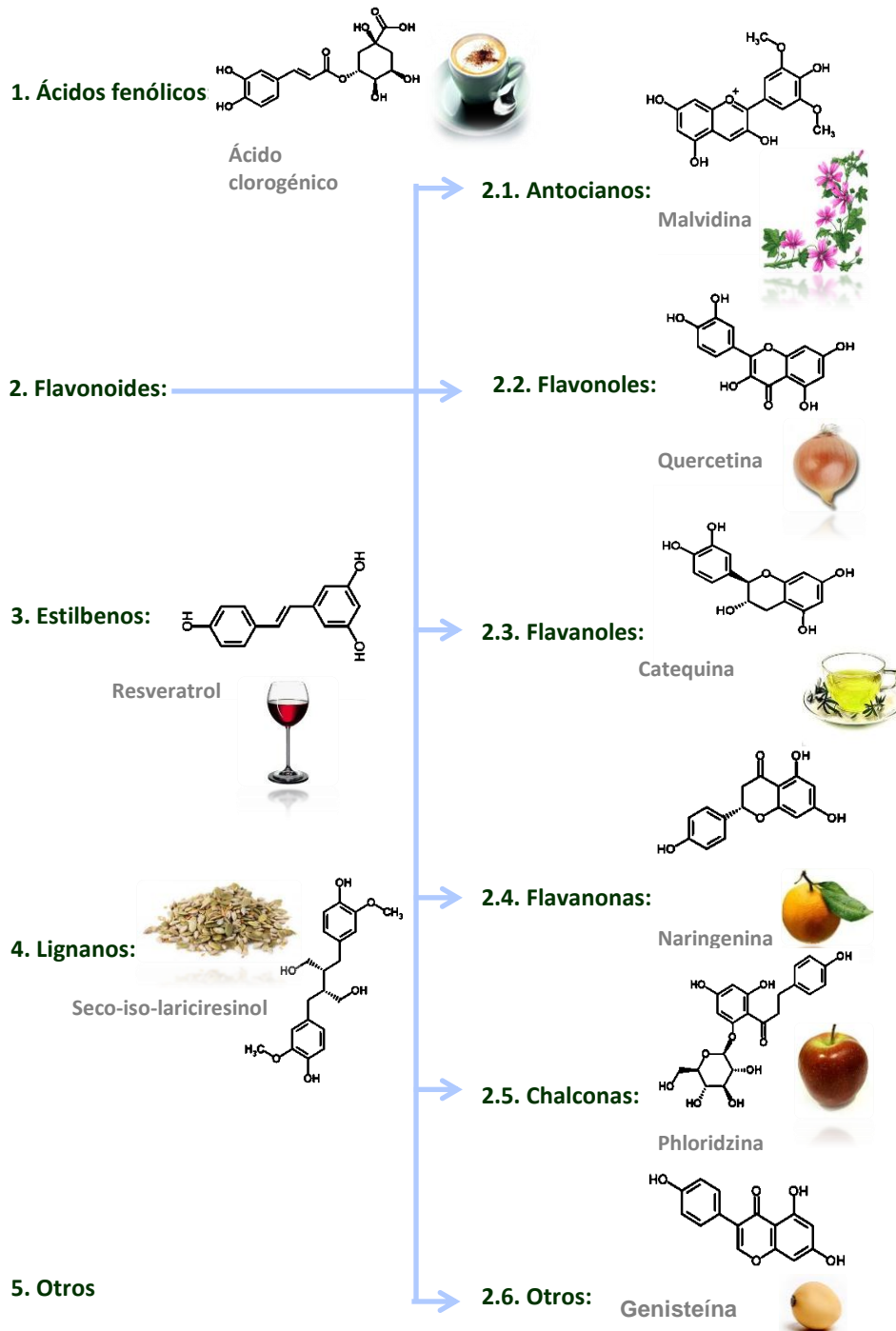


Figura 3. Algunos ejemplos de polifenoles.

Los extractos de plantas contienen también otros compuestos minoritarios, que contribuyen también a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas ya que tienen un efecto sinérgico o sumatorio en combinación con los componentes mayoritarios (ej. polifenoles). De hecho, en varios estudios se concluye que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es mayor que la mezcla de sus componentes mayoritarios (Canillac y Mourey, 2001; Gill, Delaquis, Russo y Holley, 2002; Rota, Herrera, Martínez, Sotomayor y Jordán, 2008), lo que sugiere que los componentes minoritarios también son críticos en la actividad antimicrobiana (Burt, 2004). Asimismo se ha demostrado un efecto sinérgico entre diferentes componentes mayoritarios, tales como el limoneno/1,8-cineol (van Vuuren y Viljoen, 2007), cinamaldehído/eugenol, timol/eugenol, carvacrol/eugenol y timol/carvacrol (Iten, Saller, Abel y Reichling, 2009; Pei, Zhou, Ji y Xu, 2009).

El efecto antimicrobiano o antioxidante de los extractos vegetales potencialmente bioactivos sobre un determinado producto varía en función de los siguientes factores (Ceylan y Fung, 2004; Zaika, 1975):

- Composición del extracto: cualitativa (componentes activos) y cuantitativa (concentración). En la composición influyen, a su vez, las características de la planta (región, geográfica, clima, parte de la planta, momento y temporada de recolección), tipo de extracción, estabilidad de los componentes, etc.

- Método de análisis: por ejemplo el método utilizado para medir la actividad antimicrobiana (método de difusión en disco de agar, pocillo en agar, etc.) o antioxidante (ABTS, radical superóxido, etc.), tipo de microorganismo analizado (cepa, estado de la célula, etc.), concentración (tamaño de inóculo).

- Producto analizado: tipo (medio de cultivo, bebida o alimento), presencia de aditivos (antimicrobianos, antioxidantes, etc.), carga microbiana, composición del alimento (contenido en proteínas, etc.), etc. En este sentido, el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas depende del pH y la solubilidad del extracto en el sistema modelo ya que los extractos de plantas con pH bajos y alta solubilidad suelen ser más efectivos (Perumalla y Hettiarachchy, 2011).

Todos estos factores hacen que exista una gran variedad de extractos con diferentes actividades. La relación es enorme y por esta razón dentro de este grupo sólo se abordarán aquellos extractos que han tenido mayor relevancia para la presente memoria, es decir, los aceites esenciales (oleosos y aromáticos) y el extracto de té verde (acuoso).

1.2.1.2.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos oleosos que se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas: flores, brotes, semillas, hojas, ramitas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Burt, 2004). El método más comúnmente empleado para la elaboración de estos aceites es mediante la destilación por arrastre de vapor.

Los aceites se consideran como metabolitos secundarios que juegan un papel importante en la defensa de las plantas, puesto que muchos de ellos poseen propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, insecticidas, antivirales, antifúngicas y antioxidantes. Su composición cambia en función de la especie de planta, pero en general, los aceites esenciales contienen entre 85-95% de compuestos volátiles y un 1-15% de compuestos no volátiles. Los compuestos volátiles son una mezcla de terpenos, terpenoides y otros constituyentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Sánchez-González, Vargas, González-Martínez, Chiralt y Chafer, 2011).

Propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales tienen actividad frente a un amplio espectro de microorganismos, como por ejemplo frente a bacterias responsables del deterioro o patógenos transmitidas por alimentos (Sánchez-González y cols., 2011). Los principales componentes de los aceites esenciales de plantas, hierbas y especias responsables del efecto antimicrobiano son los compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides (Tiwari y cols., 2009).

Burt (2004) revisa las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y describe de forma general y aproximada varios aceites esenciales en función de su actividad antimicrobiana (de mayor a menor): orégano / clavo / canela > tomillo > menta > romero > mostaza > salvia. Del mismo modo algunos componentes de los aceites esenciales se clasifican por orden de eficacia (de mayor a menor): eugenol > carvacrol > ácido cinámico > estragol > cinamaldehído > citral/geraniol, si bien algunos autores demuestran que el eugenol es menos efectivo que el carvacrol (Ben Arfa, Combes, Preziosi-Belloy, Gontard y Chalier, 2006; Gutiérrez-Larraínzar y cols., 2012). En general, en la literatura se describe que los aceites esenciales con altos niveles de eugenol (pimienta inglesa, clavo, laurel, hoja canela), carvacrol, timol, aldehído cinámico (corteza canela y aceite de casia) y citral (mirto limón y lima) son potentes antimicrobianos (Lambert, Skandamis, Coote y Nychas, 2001; Lis-Balchin, Deans y Eaglesham, 1998; Naidu y Davidson, 2000).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales no ha sido aún dilucidado, pero se cree posible que varios mecanismos actúen conjuntamente, debido básicamente a la gran variedad de compuestos químicos que contiene un único aceite esencial (Carson, Mee y Riley, 2002; Skandamis y Nychas, 2001). Algunos de estos mecanismos no se encuentran separados entre sí y pueden ser una consecuencia del anterior.

La mayoría de los autores coinciden en que la actividad antimicrobiana está relacionada con su hidrofobicidad. Esta característica les permite atravesar la pared celular y membrana citoplasmática y ocasionar importantes daños funcionales y estructurales en la bacteria: degradación o deterioro de la pared celular, daño de la membrana citoplasmática y mitocondrial, cambios en la permeabilidad de la membrana celular, inhibición de enzimas, supresión de la síntesis de toxinas bacterianas, daño de las proteínas, salida de contenido celular, coagulación del citoplasma y fallo de la fuerza protón-motriz (Burt, 2004; Sánchez-González y cols., 2011).

Para estudiar el modo de acción de un aceite esencial en concreto se suelen utilizar los compuestos mayoritarios puros, solos o en combinación, lo que simplifica mucho el estudio y permite analizar el efecto antimicrobiano de un compuesto en concreto y determinar si existe un efecto sinérgico o incluso antagónico entre diferentes componentes. Por esta razón, la mayoría de los trabajos sobre el mecanismo de acción de los aceites esenciales se centran más en los compuestos mayoritarios y no tanto en un aceite esencial en concreto, del que se estudia si tiene actividad antimicrobiana o no, y sus componentes mayoritarios. En este sentido en la bibliografía se describe el mecanismo y espectro de acción de compuestos como el eugenol, carvacrol, timol, etc. A modo de ejemplo, la actividad antimicrobiana del eugenol, componente mayoritario del aceite esencial de clavo, está relacionada con su capacidad para permeabilizar la membrana celular e interactuar con las enzimas de la bacteria (Hyldgaard, Mygind y Meyer, 2012). Se cree que el grupo hidroxilo del eugenol participa en la interacción e inhibición de las enzimas. Así, el eugenol inhibe enzimas de la bacteria como la ATPasa, histidina descarboxilasa, amilasa y proteasa (Burt, 2004; Gill y Holley, 2006; Thoroski, 1989; Wendakoon y Morihiko, 1995).

Propiedades antioxidantes de los aceites esenciales

La actividad antioxidante de varios aceites esenciales se ha evaluado por diferentes métodos físico-químicos que determinan diferentes capacidades como: la inhibición de la oxidación de los lípidos (ej. método tiocianato férrico, test del β -caroteno-ácido linoleico, técnica de medida de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico-TBARS, método Rancimat);

secuestradora de radicales libres (ej. ensayo del 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo-DPPH-, 2,2'-azino-bis (3-etilbezotiazolin-6-sulfonato)-ABTS, radicales hidroxilo o anión superóxido); reductora (ej. *Ferric ion Reducing Antioxidant Power* o *Ferric Reducing Ability of Plasma*-FRAP) o quelante, etc. (Goze y cols., 2010; Miguel, 2010; Viuda-Martos, Ruiz Navajas, Sánchez Zapata, Fernández-López y Pérez-Álvarez, 2010; Yang, Jeon, Lee, Shim y Lee, 2010). El método más empleado para la medida de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales es el ensayo DPPH debido a su simplicidad y sensibilidad, y en muchas ocasiones se usa como único método para hacer una primera prospección (Miguel, 2010). Es más, si este test da positivo se suele comprobar la capacidad antioxidante por otros métodos como los ya mencionados. De este modo se ha demostrado la capacidad antioxidante de varios aceites esenciales procedentes de plantas muy conocidas como el romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), clavo (*Eugenia caryophyllus* o *Syzygium aromaticum*) orégano (*Origanum vulgare* L.), albahaca (*Ocimum basilicum*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia officinalis*) (Viuda-Martos y cols., 2010; Wei y Shibamoto, 2010; Yang y cols., 2010), etc. o de variedades más raras como el achachairú (*Garcinia brasiliensis*) (Martins y cols., 2008), pterocarya de hojas de fresno (*Pterocarya fraxinifolia*) (Ebrahimzadeh, Nabavi y Nabavi, 2009), shen jar (*Psammogeton canescens*) (Gholivand, Rahimi-Nasrabadi, Batooli y Ebrahimabadi, 2010), etc. Muchos trabajos comparan capacidad antioxidante de diferentes aceites esenciales medida por diferentes métodos. Así, por ejemplo Viuda-Martos y cols. (2010) estudiaron la actividad antioxidante de 5 tipos de aceites esenciales (tomillo, clavo, orégano, salvia y romero) por los métodos DPPH, FRAP, TBARS, capacidad para quelar el Fe^{2+} y Rancimat; y encontraron que el clavo fue el aceite esencial que mostró los valores más altos por el método DPPH y FRAP, mientras que el tomillo, romero y orégano presentaron los niveles más altos en TBARS, capacidad quelante de metales y método Rancimat, respectivamente. Asimismo, es muy frecuente comparar la actividad antioxidante de varios aceites con otros conservantes sintéticos como el BHT (hidroxitolueno butilado). En este sentido se ha visto que, por ejemplo, los aceites esenciales de romero y salvia poseen una actividad antioxidante mayor al BHT en cuanto a su capacidad para inhibir el deterioro oxidativo en paté (Estévez, Ramírez, Ventanas y Cava, 2007).

La mayoría de los estudios sobre capacidad antioxidante intentan buscar una correlación lineal entre la actividad antioxidante y la composición, especialmente con los compuestos mayoritarios de un aceite esencial en concreto. La actividad antioxidante se relaciona con la presencia de compuestos fenólicos y terpenólicos (Sánchez-González y cols., 2011). Sin embargo, de acuerdo con Adorjan y Buchbauer (2010) la actividad antioxidante de los aceites

esenciales se debe a la presencia de los compuestos fenólicos (ej. timol, carvacrol, eugenol, etc.) más que a los mono- y sesquiterpenos. Así, por ejemplo, la actividad antioxidante del aceite esencial de clavo se ha relacionado con su contenido rico en eugenol, ya que éste compuesto ha demostrado tener diferentes propiedades, tales como secuestradora de radicales libres, quelante o reductora (Chaieb y cols., 2007; Gutiérrez-Larraínzar y cols., 2012; Jirovetz y cols., 2006; Ogata, Hoshi, Urano y Endo, 2000). Algunos estudios sobre la relación estructura-actividad del eugenol indican que el anillo fenólico y la cadena lateral juegan un papel importante en esta actividad antioxidante (M. Ito, Murakami y Yoshino, 2005).

Envases comestibles con aceites esenciales

Las películas y recubrimientos de diferente origen (proteico, polisacárido, etc.) incorporan una gran variedad de aceites esenciales con el objetivo de crear envases activos con propiedades antimicrobianas/antioxidantes que supongan una mejora en la conservación de varios tipos de alimentos: frutas (Rojas-Graü y cols., 2007; Sánchez-González y cols., 2011), carne (Chi, Zivanovic y Penfield, 2006; Emiroglu, Yemis, Coskun y Candogan, 2010; Gill y cols., 2002) y pescado (Ojagh, Rezaei, Razavi y Hosseini, 2010). Así, se ha observado que su aplicación en los alimentos puede significar una reducción o inhibición del crecimiento microbiano o incluso una reducción de la oxidación de sus compuestos y por lo tanto una extensión de la vida útil del producto recubierto. En esta línea, Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier y Lacroix (2004) evaluaron la capacidad de las películas basadas en proteína de leche con 1% de aceite esencial de orégano o pimienta para controlar el crecimiento de *Pseudomonas* spp. y *E. coli* 0157:H7 que fueron previamente inoculadas en carne de vacuno. Las películas con aceite esencial redujeron los recuentos microbianos a lo largo de los 7 días de conservación; las películas con mayor inhibición del crecimiento microbiano fueron las de orégano, mientras que las que contenían pimienta presentaron una mayor actividad antioxidante.

Las propiedades físicas de las coberturas se ven afectadas por la presencia de los aceites esenciales. Así se ha visto que la incorporación de aceites esenciales dentro de la matriz polimérica produce una mejora en los valores de permeabilidad al vapor de agua y gases (Rojas-Graü y cols., 2007; Sánchez-González, Cháfer, Chiralt y González-Martínez, 2010; Sánchez-González, González-Martínez, Chiralt y Cháfer, 2010). Generalmente los valores de permeabilidad al agua de las películas disminuyen en proporción a la cantidad de aceite esencial. Por ejemplo, las películas de quitosano sin aceites esenciales poseen escasa barrera a la humedad a los 20 °C, pero la adición del aceite esencial de bergamota (3%) reduce de

forma significativa los valores de permeabilidad al vapor de agua casi el 50% (Sánchez-González, Cháfer y cols., 2010).

Los aceites esenciales producen modificaciones en las propiedades mecánicas de las películas. Rojas-Graü y cols. (2007) observaron una reducción significativa de las propiedades mecánicas (tensión) de películas basadas en alginato-puré de manzana con la incorporación de diferentes aceites esenciales, si bien la permeabilidad al vapor de agua y oxígeno no se modificó.

Asimismo, la adición de aceites a las películas y recubrimientos reducen la transparencia, brillo y color de las coberturas (Sánchez-González, Cháfer y cols., 2010; Sánchez-González, González-Martínez y cols., 2010). Sin embargo, el cambio de color de la película es insignificante cuando la concentración de aceite empleada en la elaboración de las películas es baja (Pranoto, Salokhe y Rakshit, 2005; Zinoviadou, Koutsoumanis y Biliaderis, 2009).

La mayor parte de los autores coincide en señalar que el empleo de aceites esenciales en la conservación de los alimentos imparte propiedades sensoriales indeseables a los alimentos, (Burt, 2004). Sin embargo de acuerdo con Sánchez-González y cols. (2011) una forma para paliar los intensos aromas de los aceites u otros efectos indeseables (toxicidad) es mediante la incorporación de estos compuestos naturales en películas biodegradables, ya que de este modo, se requiere menos cantidad de aceite que cuando se administran directamente en el alimento. En este sentido Ojagh y cols. (2010) estudiaron el efecto de los recubrimientos basadas en quitosano con aceite esencial de canela sobre trucha conservada a 4 °C y observaron una mejora en la calidad del pescado (cuatro días), al disminuir la oxidación lipídica y el crecimiento microbiano, sin afectar a las propiedades sensoriales evaluadas (textura, color, sabor, olor y apariencia general). Sin embargo, los recubrimientos a partir de puré de manzana, alginato y aceites esencial de limoncillo aplicados en manzana cortada produjeron cambios inaceptables en el color y la textura de la fruta a partir del día 7 de conservación (Rojas-Graü y cols., 2007).

Salvo algunos casos excepcionales, los aceites esenciales en las películas aportan olores y sabores indeseables a los alimentos, y por ello en ocasiones es recomendable la utilización de otros agentes antimicrobianos y antioxidantes que aporten menos olores u sabores.

1.2.1.2.2. Extracto de té verde

El té es una infusión preparada a partir de los brotes y hojas secas de la planta del té (*Camellia sinensis* variedad *sinensis* y *assamica*) y representa una de las bebidas más consumidas del mundo, después del agua (Graham, 1992), por encima incluso del café, cerveza, vino y bebidas gaseosas sin alcohol (Costa, Gouveia y Nobrega, 2002; Rietveld y Wiseman, 2003). Los té se clasifican en función del grado de fermentación al que han sido sometidas las hojas de té durante el proceso de fabricación, en tres grupos principales: té no fermentado (té verde), fermentado (té negro/rojo, Pu-Erh) y semi-fermentado (té oolong) (Cabrera, Artacho y Giménez, 2006). En los últimos años el té verde ha recibido una mayor atención, debido en parte a los múltiples beneficios para la salud que poseen sus extractos, ya que éstos presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antihipertensivas y anticancerígenas, entre otras.

La composición química del té o de sus extractos es compleja y está constituida por polifenoles (flavonoides: catequinas y flavanoles principalmente), alcaloides (cafeína, teobromina, teofilina, etc.), compuestos volátiles, pigmentos, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas (vitamina C), minerales y otros compuestos no caracterizados (Karori, Wachira, Wanyoko y Ngure, 2007). Muchos de estos compuestos se consideran responsables de las propiedades beneficiosas del té verde (Bolling, Chen y Blumberg, 2009; Isiguki, Takakuwa y Takeo; Weisburger y Chung, 2002); si bien es cierto que la mayoría de las actividades biológicas del té verde se atribuyen a la presencia de los polifenoles (Higdon y Frei, 2003). Los polifenoles mayoritarios del té son los flavanoles, principalmente catequinas y sus esteres de galato, y flavonoles como quercetina, kaempferol y sus glucósidos (Figura 4) (Rice-Evans, Miller y Paganga, 1996).

En concreto, las catequinas tienen un peso importante en el té dada su alta concentración en comparación con los otros compuestos fenólicos. Dentro de este grupo destacan la epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) y epigallocatequina-3-galato (EGCG) (Del Rio et al, 2004). No obstante, también nos podemos encontrar en el té los epímeros de dichas catequinas: catequina (C), galocatequina (GC), catequina-3-galato (CG) y galocatequina-3-galato (GCG) (Figura 5) (Victoria K. Ananingsih y cols.). El EGCG es la catequina más característica, abundante y activa del té verde por lo que se suele utilizar como indicador de calidad (Pelillo y cols., 2002; R. Wang, Zhou y Jiang, 2008).

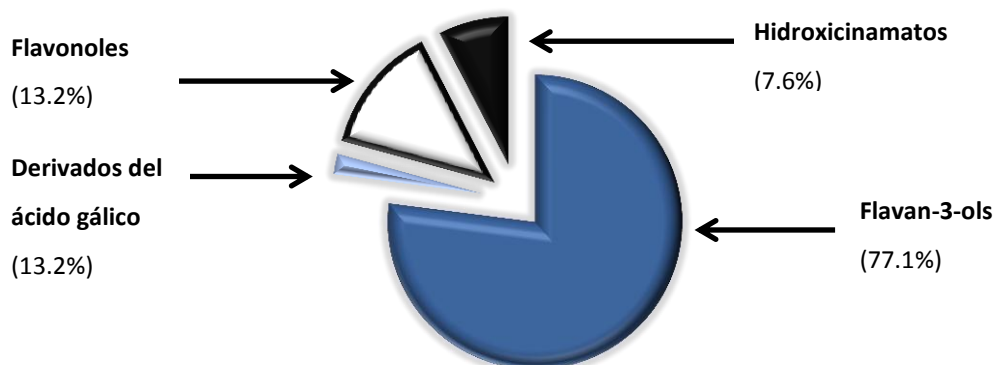
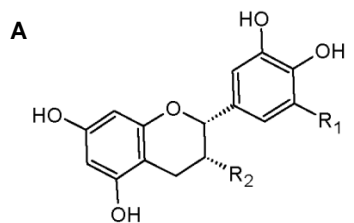


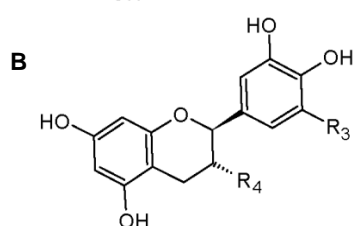
Figura 4. Porcentaje de los diferentes tipos de polifenoles en té verde (Adaptada de Del Rio y cols., 2004).

Las características, y por tanto, las propiedades beneficiosas de los extractos están determinadas por su composición, que depende del tipo y condiciones de cultivo de la planta del té (variedad, edad de la hoja, clima, prácticas de horticultura, lugar, etc.) (Graham, 1992; Lee y cols., 2010; Vinson y Dabbagh, 1998). La composición también depende de las condiciones de extracción: cantidad, solventes (agua, etanol, etc.), tiempo y tipo de presentación (polvo, hojas sueltas o bolsitas) (Komes, Horžić, Belščak, Ganić y Vulić, 2010; Rusak, Komes, LDkić, Horžić y Kovač, 2008.), etc. Aunque los extractos de té se pueden elaborar por diferentes vías, la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el té se obtienen mediante una extracción sencilla con agua caliente (Lin, Chen y Harnly, 2008), sin perder de este modo las propiedades beneficiosas (Hamilton-Miller, 1995; Dufresne y Farnworth, 2001; Cabrera y cols., 2006; Friedman, 2007). Pero además, los extractos acuosos se pueden aplicar en numerosos productos alimentarios sin modificar de forma acusada sus propiedades sensoriales, como se ha visto en la aplicación de coberturas con té verde para la conservación de productos frescos cortados. En este caso, el producto adquiere los beneficios del té, pero sin perder sus características (Chiu y Lai, 2010). A pesar de las muchas diferencias atribuidas a las distintas variedades, no hay apenas referencias en la literatura sobre la variabilidad en la composición de los diferentes extractos de té verde, y el modo en el cual puede repercutir en sus propiedades biológicas.

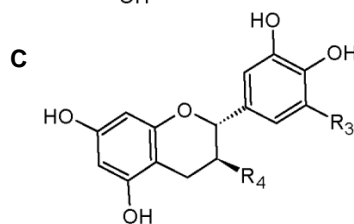
CATEQUINAS DEL TÉ



A) Epicatequinas	Abrev.	R ₁	R ₂
(-)- Epigalocatequina galato	(-)-EGCG	OH	G
(-)-Epicatequina galato	(-)-ECG	H	G
(-)-Epigalocatequina	(-)-EGC	OH	OH
(-)-Epicatequina	(-)-EC	H	OH



B) No epicatequinas	Abrev.	R ₃	R ₄
(-)-Galocatequina galato	(-)-GCG	OH	G
(-)-Galocatequina	(-)-GC	OH	OH
(-)-Catequina galato	(-)-CG	H	G



C) Catequina	Abrev.	R ₃	R ₄
(+)-Catequina	(+)-C	H	OH

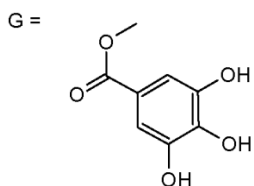


Figura 5. Estructura química de las catequinas del té verde: A) epicatequinas, B) no epicatequinas y C)(+)-catequina. Fuente adaptada de Ananingsih, Sharma y Zhou (2011).

Propiedades antimicrobianas del té verde

Los polifenoles del té verde han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre diferentes tipos de bacterias, tanto Gram + como Gram - (Gadang, Hettiarachchy, Johnson y Owens, 2008). En este sentido, el té ha mostrado actividad frente a un amplio número de bacterias, entre las que se encuentran bacterias patógenas transmitidos por los alimentos como *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Samonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, bacterias del deterioro o frente a bacterias responsables de las caries como *Streptococcus mutans*, entre otras (Friedman, 2007; Perumalla y Hettiarachchy, 2011). No obstante, se ha visto que los extractos acuosos de té verde no ejercen ningún efecto sobre bacterias intestinales, lácticas o bacterias probióticas beneficiosas (Almajano, Carbó, Jiménez y Gordon, 2008).

Algunos autores proponen diferentes mecanismos de acción para explicar el efecto antimicrobiano producido por los compuestos activos del té, principalmente catequinas. Alteración de la morfología celular (Sivarooban, Hettiarachchy y Johnson, 2008b), inhibición de enzimas esenciales (Gradišar, Pristovšek, Plaper y Jerala, 2007; Navarro-Martínez y cols., 2005), inhibición de la energía del metabolismo (Chinnam y cols., 2010), inhibición de la síntesis de la pared y membrana celular (Cushnie y Lamb, 2011), inhibición de la síntesis de ADN y ARN bacteriano (Mori, Nishino, Enoki y Tawata, 1987) o producción de peróxido de hidrógeno a partir de la oxidación de las catequinas (Arakawa, Maeda, Okubo y Shimamura, 2004), son algunos de los mecanismos propuestos en la literatura.

La estructura química de las catequinas influye en su actividad antimicrobiana, ya que según sea la estructura permitirá una mayor o menor interacción con los componentes de la pared celular bacteriana. La presencia de esteres de ácido gálico en las catequinas favorece la interacción con la bicapa lipídica, y por lo tanto ocasionar daños a la estructura de la membrana (Hashimoto, Kumazawa, Nanjo, Hara y Nakayama, 1999). Así, por ejemplo, EGCG y ECG son dos de las catequinas más potentes debido al grupo galoil presente en su estructura (Shimamura, 2007).

Propiedades antioxidantes del té verde

Los compuestos fenólicos presentes en el té verde, principalmente flavonoides, demuestran tener buenas propiedades antioxidantes en numerosos estudios relacionados con su aplicación en alimentos, debido a su capacidad para actuar como: donantes de hidrógeno, agentes reductores o quelantes de iones metálicos (Gramza y cols., 2006). Los grupos hidroxilo presentes en los polifenoles del té forman la parte activa de la molécula, ya que gracias a ellos

los compuestos fenólicos pueden interactuar con los radicales libres que intervienen en la oxidación lipídica e inhibir este proceso (Mitsumoto, O'Grad, Kerry y Buckley, 2005). Asimismo, los polifenoles del té verde tienen también capacidad secuestradora de radicales libres (Rice-Evans, Miller y Paganga, 1997), radicales superóxido, peroxinitrito o capacidad quelante de cobre y hierro. En este último caso, los polifenoles previenen la formación de radicales libres catalizados por metales (Lin y Liang, 2000). La capacidad secuestradora de las catequinas está relacionada con su estructura química, en concreto con la presencia del doble enlace entre los carbonos C₂ y C₃ y los grupos O-dihidroxi y O-hidroxiketo (Rice-Evans y cols., 1997). La EGCG tiene mayor capacidad secuestradora de radicales libres, seguido de ECG, EC y EGC. Este dato indica que la actividad antioxidante de las catequinas depende de la estructura química, posición y número de hidroxilos (Perumalla y Hettiarachchy, 2011). Además de la estructura química, las propiedades antioxidantes de los extractos de té verde dependen de la concentración, solubilidad, accesibilidad de los grupos activos a los compuestos oxidantes y la estabilidad del producto (Guo y cols., 1999).

Envases comestibles con extracto de té verde

El interés por utilizar los extractos de té verde como aditivos de los alimentos ha aumentado y se prevé que continúe creciendo en la industria alimentaria debido a las interesantes propiedades biológicas (antioxidantes y antimicrobianas, entre otras) que presentan y que suponen una mejora en la conservación de los productos. Además y a modo de ejemplo, la adición de extracto de té verde en un determinado producto alimenticio significa una mejora en el mismo, incluso bajo un punto de vista comercial. Este es el caso de bebidas comerciales como Juver Té Verde® o TriNa T- Apple®, por la buena imagen que tiene el té verde en la actualidad debido a sus conocidas propiedades beneficiosas. Sin embargo la incorporación de extractos de té verde en películas y recubrimientos es muy reciente y apenas hay trabajos sobre sus propiedades antimicrobianas/antioxidantes y su aplicación en alimentos.

Los envases comestibles con extracto de té verde se han aplicado recientemente en contados productos: salchichas (Ku, Hong y Song, 2008; Siripatrawan y Noipha, 2012; Theivendran, Hettiarachchy y Johnson, 2006), lomo de cerdo (Hong, Lim y Song, 2009) y ensalada de fruta, lechuga y filetes de cerdo (Chiu y Lai, 2010), con el objetivo de mejorar la seguridad, mantener su calidad o extender su vida útil. Hong y cols. (2009) estudiaron el efecto antimicrobiano y antioxidante de las películas basadas en gelatina-*Gelidium corneum* a las que se incorporó extracto de té verde (2.8%) sobre la conservación del lomo de cerdo (4°C),

previamente inoculado con *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Las muestras recubiertas con la película con extracto de té verde mostraron una reducción en los recuentos de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de 1.11 y 1.14 unidades logarítmicas (Log UFC/g), respectivamente, en comparación con el control a partir del día 4 de conservación. Sin embargo, sólo se observó una disminución significativa en los valores de rancidez oxidativa medida por índice del ácido tiobarbitúrico (peroxidación lipídica) de 0.59 mg MDA/kg a partir del día 10 con respecto al control. En otro estudio se aplicaron películas basadas en aislado de proteína de soja, a las que se incorporó extracto de té verde al 1% en salchichas (tipo *Turkey Frankfurt*) previamente inoculadas con *L. monocytogenes* y conservadas a 4 °C y 10 °C; y no obtuvieron una inhibición significativa en los recuentos de *Listeria* a lo largo del estudio de conservación (Theivendran y cols., 2006). Los autores lo atribuyeron a que las películas contenían una baja concentración de extracto de té verde, ya que la adición de más cantidad de extracto a la formulación les causaba problemas durante su preparación.

La actividad antimicrobiana del extracto de té no se pierde una vez incorporado al envase, aunque si se aumenta la concentración del extracto se consigue un efecto inhibitorio en detrimento de la calidad de la película. Este hecho coincide con lo descrito por Kim y cols. (2006) en películas preparadas a partir de aislado de proteína de soja y extracto de té verde. Las películas con un 4% de extracto de té verde inhibieron en mayor medida a *Streptococcus mutants* y *Staphylococcus aureus* que las que contenían un 2%. Estos autores observaron que a mayor concentración de extracto, las películas adquirieron un color parduzco y sus propiedades físicas (resistencia a la tracción y resistencia a la rotura) empeoraron, atribuido a que el té verde interfiere en la formación de las interacciones entre proteína-proteína, que posibilita la formación de las películas. Sin embargo otros autores ensayaron extracto de té verde en diferentes concentraciones (comprendidas entre 0 y 20%) y obtuvieron una mejora en los valores de resistencia a la tracción en películas preparadas a base de quitosano con concentraciones de té superiores al 5% (Siripatrawan & Harte, 2010). Estos mismos autores observaron una menor transparencia de las películas, mientras que las propiedades de permeabilidad al vapor de agua incrementaron con la adicción de concentraciones superiores de extracto de té verde. Las diferencias en cuanto a las propiedades físicas entre estos dos trabajos (Siripatrawan y Harte, 2010; Kim y cols., 2006) posiblemente se deban al tipo de biopolímero utilizado en la preparación de las películas, ya que los polifenoles del té interactúan con las proteínas o con el quitosano perjudicando o favoreciendo la estabilidad de la red polimérica.

Con respecto a la modificación sensorial que puede producir la aplicación de recubrimientos y películas con extracto de té verde sobre los alimentos, sólo se han encontrado dos trabajos en la literatura, uno en lechuga (Chiu y Lai, 2010) y otro en salchichas (Siripatrawan y Noipha, 2012). Chiu y Lai (2010) evaluaron las propiedades antimicrobianas de recubrimientos a base de almidón de tapioca/goma de hoja decolorada *hsian-tsau* y extracto de té verde. Posteriormente se estudió su aplicación en lechuga conservada a 4 °C previamente inoculada con *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes* y, por último, se hizo el análisis sensorial (aparición, sabor, aroma, aceptabilidad e intención de compra). Los recubrimientos mostraron actividad antimicrobiana, redujeron drásticamente los recuentos de *S.aureus* y *L.monocytogenes* a partir de las 48h de conservación en 6 y 3 unidades logarítmicas, respectivamente, y mejoraron las propiedades sensoriales evaluadas en la lechuga en el momento de aplicación, aunque a las 48 h no hubo diferencias significativas con respecto al control. Siripatrawan y Noipha (2012) estudiaron la utilización de películas formadas a partir de quitosano y extracto de té verde como posible envase activo para la extensión de la vida útil de salchichas de cerdo. Las muestras recubiertas con las películas exhibieron los valores más bajos en TBA (peroxidación lipídica), análisis microbiológico (recuento de microorganismos totales y mohos y levaduras), color y textura. La aceptación global de las muestras problema fue mayor que en el control ya que el quitosano y del extracto de té verde redujeron los efectos del deterioro microbiológico y oxidativo

A pesar de estos resultados prometedores, no se conocen más aplicaciones en otros alimentos, como por ejemplo el pescado. La aplicación de envases comestibles de distinta naturaleza a los que se incorpora extractos de té verde, solos o en combinación con otros compuestos, constituye por tanto un campo abierto de estudio de gran interés.

1.2.2. BACTERIAS INCORPORADAS A ENVASES COMESTIBLES

En los últimos años, una de las alternativas en la conservación es incorporar bacterias o sus metabolitos a los alimentos con el fin de frenar el deterioro y contaminación microbiológica de los alimentos, con pocos o mínimos cambios de sus cualidades sensoriales. Esta alternativa de conservación se engloba dentro del término conocido como **bioconservación**, y generalmente se utiliza en combinación con otras técnicas tradicionales (tratamientos térmicos, refrigeración, reducción de la actividad de agua o pH, etc.).

1.2.2.1. Bioconservación

La bioconservación se define como la extensión de la vida útil y el aumento de la seguridad de un alimento a través del uso de una microflora natural o controlada y de sus productos antimicrobianos (Stiles, 1996). Las bacterias más empleadas en este método de conservación son las **bacterias ácido lácticas** (BAL), que pueden estar habitualmente presentes o no en la microflora natural del alimento al cual se aplican (Rodgers, 2001). Dentro de este grupo de bacterias se incluye un amplio número de microorganismos Gram +, que presentan la característica común de producir como metabolito mayoritario el ácido láctico, a partir de la fermentación de los carbohidratos (Ananou, Maqueda, Martínez-Bueno y Valdivia, 2007). Las bacterias ácido lácticas pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenoccus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* y *Bifidobacterium* (Leroi, 2010). Esta flora se encuentra de forma natural en muchos alimentos (lácteos, carne, fruta, vegetales, etc.), así como en la cavidad oral, intestino y órganos genitales de animales y humanos (Leroi, 2010). Este tipo de bacterias se utilizaron hace miles de años para la fermentación de la leche, carne, vegetales y frutas. La fermentación permite la producción de nuevos alimentos que se caracterizan principalmente por poseer mayor estabilidad que los productos originales. Sin embargo, a diferencia de la fermentación, en la bioconservación se busca que los productos sean estables pero sin producirse cambios nutricionales, sensoriales (olor o sabores nuevos) ni físico-químicos en el alimento (Leroi, Arbey, Joffraud y Chevalier, 1996).

La bioconservación se ha aplicado en diferentes alimentos, sobre todo en productos lácteos, vegetales y cárnicos, y en menor proporción en productos marinos (Leroi, 2010), con el objeto de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o microorganismos del deterioro de los alimentos y favorecer el crecimiento de otros microorganismo, de naturaleza generalmente ácido láctica, que alteren mínimamente el alimento. En ocasiones el consumo de estas bacterias lácticas supone un beneficio para el consumidor una vez ingeridos. Este es el caso de los probióticos, que se definen como microorganismos vivos que aportan efectos beneficiosos sobre el huésped, ya que mejoran el balance microbiano intestinal (Adhikari, Mustapha, Grün y Fernando, 2000) cuando se ingieren en cantidades adecuadas, en torno a 10^6 UFC/g (Samona y Robinson, 1991). Los probióticos más estudiados en modelos alimentarios incluyen los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Soccol y cols., 2010). Los beneficios potenciales y funciones biológicas de los probióticos en humanos incluyen producción de ácido acético y láctico, inhibición de patógenos, reducción del riesgo de cáncer de colon, reducción de los niveles de colesterol en el suero, mejora de la absorción de calcio y

la activación del sistema inmune, entre otros (Gibson y Roberfroid, 1995; Kim, Tanaka, Kumura y Shimazaki, 2002; Mitsuoka, 1990). Los beneficios que aportan los probióticos al consumidor conllevan un amplio desarrollo de los probióticos en la industria alimentaria y a numerosas investigaciones para estudiar su aplicación en diferentes alimentos (productos lácteos, soja, frutas, vegetales, legumbres, cereales, etc.) (Champagne, 2009; Soccol y cols., 2010).

Mecanismo de acción de la BAL y sus metabolitos

Las bacterias ácido lácticas pueden inhibir o impedir el crecimiento de bacterias patógenas o del deterioro mediante la producción ácido láctico u otros ácidos orgánicos que provocan la acidificación del medio y, por tanto, una disminución del pH en los alimentos que perjudica a las bacterias ácido-sensibles. También pueden ejercer su acción por competición con los patógenos por el sustrato (vitaminas, minerales, elementos traza y péptidos), modificación redox o producción de otras moléculas inhibitorias, como peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y bacteriocinas (Leroi, 2010).

Otra forma de inhibir el crecimiento de microorganismos es mediante la utilización de metabolitos microbianos. Así las bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas de bajo peso molecular sintetizados en el ribosoma de las BAL. Son, en general, termoresistentes, aparentemente hipoalergénicas, inactivas frente a células eucariotas y fácilmente degradables por enzimas proteolíticas del intestino humano (Ananou y cols., 2007). Algunos autores consideran que el espectro de inhibición de estas proteínas o péptidos es reducido, ya que actúan sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, es decir, frente a Gram + (Requena y Peláez, 1995). Sin embargo estudios recientes han demostrado que la actividad antagónica de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas también se ha observado contra algunos microorganismos Gram-negativos (Todorov y Dicks, 2005). Las bacteriocinas inhiben a otros microorganismos mediante el bloqueo de la síntesis de la pared celular o bien mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática de células bacterianas sensibles. La formación de estos poros provoca una pérdida de iones K, ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas, que a su vez originan la pérdida del potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, disminución en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, provocando finalmente la muerte celular (Ojcius y Young, 1991; Todd, 1993). Entre ellas, la bacteriocina más conocida y caracterizada es la nisina debido a su seguridad y efectividad frente a bacterias Gram + patógenas transmitidas por los alimentos y del deterioro (Ananou y cols., 2007; Requena y Peláez, 1995).

Envases comestibles con bacterias

La aplicación directa de las bacterias y sus metabolitos sobre los alimentos constituye una de las formas más clásicas de bioconservación. Sin embargo, los envases comestibles ofrecen la posibilidad de proporcionar bacterias, con características protectoras o probióticas o sus metabolitos, a los alimentos a los que se aplican. En este sentido, la mayoría de los trabajos se han enfocado principalmente en estudiar el efecto antimicrobiano de los envases comestibles con bacteriocinas, principalmente nisina (Campos y cols., 2011), sobre determinados alimentos o bacterias, y apenas hay trabajos sobre la efectividad de las películas y recubrimientos con bacterias ácido lácticas aplicadas en el envasado de alimentos. Esto es debido, seguramente, a que conllevan más dificultades trabajar con cultivos de bacterias que con compuestos aislados (bacteriocinas). Así, por ejemplo, uno de los retos que conlleva trabajar con cultivos puros es asegurar la supervivencia de las bacterias en las películas y recubrimientos, y que una vez aplicados en el alimento pasen a él. Los primeros trabajos fueron los realizados por Tapia y cols. (2007). En este estudio, *B. lactis* B12, bacteria probiótica, se añadió en la formulación de recubrimientos basados en alginato y gelano, que posteriormente se aplicaron en fruta fresca cortada. Así, *B. lactis* B12 pasaron a la fruta tras la aplicación de la cobertura y los valores de esta bacteria se mantuvieron por encima de los 10^6 UFC/g durante 10 días en papaya y manzana. Estos resultados abrieron, por lo tanto, un nuevo campo de investigación como es la incorporación de probióticos a los alimentos a través de la utilización de envases comestibles.

Es también muy importante que las bacterias sobrevivan o que incluso crezcan en la película o solución filmogénica con aditivos antimicrobianos/antioxidantes. Del mismo modo, resulta interesante estudiar cómo las bacterias lácticas pueden interactuar con los diferentes componentes de la película, especialmente si ésta contiene aditivos antimicrobianos/antioxidantes de tipo polifenólico, puesto que es conocido que este tipo de bacterias pueden metabolizar estos compuestos.

Además de la viabilidad de las películas con bacterias, se ha estudiado el efecto protector de estas coberturas. Así, el primer estudio relacionado con este tema corresponde al trabajo de Gialamas, Zinoviadou, Biliaderis y Koutsoumanis (2010). En este trabajo se añadió *Lactobacillus sakei* en películas comestibles preparadas a partir de caseinato de sodio, con el objetivo de estudiar el efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (previamente inoculada en carne de vacuno fresca). *L. sakei* migró a la carne, dónde se multiplicó e inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes*. Así se demostró que el envasado de

los alimentos mediante el uso de películas con bacterias protectoras inmovilizadas contribuye a aumentar la seguridad de los alimentos.

1.3. DIGESTIÓN DE ENVASES ACTIVOS

La digestión de alimentos se puede afrontar mediante experimentos *in vivo* e *in vitro*. Los estudios *in vitro* están más extendidos que los estudios *in vivo*, puesto que son más económicos, rápidos y sobretodo menos invasivos que los estudios *in vivo* (Boisen y Eggum, 1991). Además, los estudios *in vitro* resultan más útiles cuando se quiere estudiar la digestión de compuestos tóxicos. Por ello se han diseñado diferentes modelos de digestión *in vitro* que simulan las condiciones y reacciones que ocurren en la boca, estómago, intestino delgado y grueso para estudiar principalmente algunos de los siguientes análisis.

Estos modelos son de muy diferente grado de complejidad dependiendo de lo que se desee evaluar:

- cambios estructurales que pueden sufrir por ejemplo determinados compuestos presentes en el alimento bajo el efecto de enzimas digestivos, condiciones de pH, y/o de las bacterias de la microflora del colon (Aura, 2005).
- digestibilidad de los componentes, es decir, la facilidad con la cual los nutrientes se convierten en el aparato digestivo en compuestos útiles para la nutrición. Comprende dos procesos: 1) la digestión, que incluye la transformación (hidrólisis) de las moléculas complejas de los alimentos en moléculas más pequeñas, y 2) la absorción de estas pequeñas moléculas en el intestino (Manríquez, 1994).
- bioaccesibilidad, que indica la fracción de compuesto que después de ser digerido es susceptible de ser absorbido (Tagliacuzzi, Verzelloni, Bertolini y Conte, 2010).
- biodisponibilidad, que determina la fracción de compuesto ingerido que finalmente alcanza la circulación sistémica (Holst y Williamson, 2008).
- liberación de los componentes alimentarios bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Mandalari y cols., 2010).

Los diferentes modelos de digestión que hay en la literatura se diferencian principalmente en cuatro aspectos (Hur, Lim, Decker y McClements, 2011):

a) Número y tipo de pasos incluidos en la digestión: boca, estómago, intestino delgado y grueso. Dependiendo de la parte que incluya el modelo se estudiarán diferentes parámetros. Así, por ejemplo, los modelos del colon sirven para aclarar el papel de la microbiota en el metabolismo de las formas no digeridas de la dieta.

b) Composición y pH de los fluidos digestivos utilizados en cada paso de la digestión (enzimas, sales, buffers, etc.). Éstos deben seleccionarse de acuerdo al fluido (gástrico, pancreático, hepático, etc.), objeto de estudio o tipo de muestra (Boisen y Eggum, 1991).

c) Fuerzas mecánicas y flujos de fluido utilizados en cada paso de la digestión.

d) Tipo de parámetro medido: en función del objetivo se puede estudiar digestibilidad/degradación, bioaccesibilidad, biodisponibilidad, estabilidad de la muestra y cambios de localización (ej. liberación de componentes encapsulados), estructurales y químicos.

Otros parámetros suelen ser comunes a todos los modelos. Así la temperatura suele ser de 37 °C y el tiempo de tránsito de la muestra en cada punto de la digestión está en torno a 2 h aproximadamente (Hur y cols., 2011).

Las diferencias que pueden existir entre un modelo y otro dificultan la comparación de resultados entre diversos estudios. Además los resultados *in vitro* distan de los resultados *in vivo*, debido en parte a la dificultad en simular con exactitud los fenómenos físico-químicos y fisiológicos altamente complejos que ocurren en el tracto digestivo humano. Asimismo, en la digestión *in vivo* influyen además otros muchos factores que en ocasiones no se toman en consideración en este tipo de modelos, como son: factores individuales (edad, sexo, estado mental, etc.), ambientales (momento del día, etc.), propiedades del alimento (cantidad total, composición, tamaño de partícula, etc.) (McClements, Decker y Park, 2008). Por ello los estudios *in vitro* siempre constituyen una aproximación a lo que acontece realmente a nivel fisiológico.

La digestión *in vitro* se ha aplicado en una gran variedad de alimentos de diferente origen: vegetal (almidón, té, arroz o pan), cárnicos, lácteos, marinos y emulsiones (Hur y cols., 2011). No obstante, no se han encontrado trabajos en la literatura relacionados con la digestión de envases comestibles, a pesar de que éstos se pueden ingerir conjuntamente con el alimento y que en algunos casos contienen compuestos activos que se podrían liberar en el aparato digestivo y ser susceptibles de sufrir cambios o bien digeridos o absorbidos. Durante la formulación y procesado de alimentos se pueden producir determinadas interacciones entre los distintos componentes, como en el caso particular de los recubrimientos. Estas interacciones son muy diferentes, y en algunas ocasiones se establecen enlaces que dificultan la digestión y liberación de compuestos en el tracto gastrointestinal.

1.4. LEGISLACIÓN RELACIONADA CON LAS PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Las películas y recubrimientos se pueden considerar como alimentos, ingredientes alimentarios, aditivos alimentarios, sustancias en contacto con alimentos o envases alimentarios (Debeaufort y cols., 1998). Por lo tanto, estos productos deben estar regulados de acuerdo a la función/es que desempeñen:

- ❖ Como alimento o ingrediente alimentario debe contener sustancias seguras, aptas para uso alimentario (grado alimentario) y no tóxicas. Pero, además todas las instalaciones de proceso deben ser aprobadas para la elaboración de alimentos y cumplir estrictamente con las actuales Buenas Prácticas de Fabricación (*Good Manufacturing Practice*) (Guilbert, Gontard y Gorris, 1996; Guilbert y Gontard, 1995; Jung, 2002; Nussinovitch, 2007). Los diferentes componentes utilizados en los envases comestibles deben ser sustancias seguras, y utilizarse dentro de las limitaciones marcadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (en inglés *European Food Safety Authority*, EFSA) (Morros, 2009).
- ❖ Como vehículo de aditivo alimentarios deben seguir la normativa con respecto al uso de aditivos alimentarios. En Europa sólo se permiten los aditivos aprobados por la Comunidad Europea y publicados en las Listas Positivas, que son nombradas con unos números de identificación de carácter internacional que deben figurar en los envases y que comienzan por la letra E (Europa). Si la autorización es sólo para un país irá precedida de la inicial del país correspondiente (Morros, 2009). La utilización de los alimentos está regulado por el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios.
- ❖ Como *envase activo*, en caso de contener aditivos antimicrobianos/antioxidantes por ejemplo, debe ajustarse a las normas marcadas en este tipo de productos. En Europa existe el Reglamento (CE) Nº 450/2009 de la Comisión sobre materiales y objetos activos e inteligentes destinados a entrar en contacto con los alimentos. Este reglamento define los envases activos como aquellos materiales y objetos activos “destinados a prolongar la vida útil o a mantener o mejorar el estado del alimento envasado. Están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán sustancias en el alimento envasado o en su entorno o absorberán sustancias del alimento o su entorno”. Sin embargo esta normativa no contempla los envases comestibles, y solo considera el envase activo que no se consume y está en contacto con el alimento.

Por otro lado, los envases pueden contener determinados ingredientes que provoquen trastornos de salud. Uno de los casos más típicos son las alergias en ciertas personas, como es el caso de las coberturas preparadas a partir de proteína del trigo (gluten), leche (suero, caseína), soja y proteína de cacahuete (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2009). En estos casos, la presencia de este tipo de alérgenos en las películas y recubrimientos se debe indicar de forma clara en el etiquetado (Franssen y Krochta, 2003).

II. HIPÓTESIS

II. HIPÓTESIS

La utilización de envases comestibles previene el deterioro de los alimentos. Continuamente se busca mejorar las propiedades de los envases comestibles mediante la incorporación de compuestos activos, principalmente antioxidantes y antimicrobianos.

La utilización de compuestos activos (extractos vegetales, hidrocoloides, probióticos, etc.) en los envases biodegradables y comestibles constituye una oportunidad, ya que los envases pueden actuar como vehículo de estos compuestos y permitir que lleguen al alimento. Además, los envases los liberan y difunden de forma controlada, para lograr una mayor efectividad en la difusión de los mencionados compuestos durante un tiempo más prolongado. Estos efectos se pueden alcanzar, modificar o adaptar con distintas formulaciones de los envases. Los polímeros constituyen la matriz para formar el envase, que puede ser de diversos orígenes y cuya naturaleza determinará las propiedades del envase.

La mayoría de los biopolímeros utilizados proceden de los residuos de la industria agroalimentaria, pesca y acuicultura, lo cual favorece la sostenibilidad medioambiental, no solo por la utilización de fuentes alternativas al plástico convencional sino por reducir el volumen de residuos a tratar, confiriendo un valor añadido.

La naturaleza de los compuestos activos es muy variada, aunque se tiende a utilizar agentes activos naturales. Entre estos compuestos naturales se encuentran los extractos vegetales, ampliamente difundidos en la naturaleza. Su utilización se ve limitada por modificar las propiedades sensoriales de los alimentos. La búsqueda de compuestos efectivos que no confieran propiedades organolépticas diferentes es complicado; esto se agrava especialmente en el caso de pescados magros, carentes de pigmentación y con sabor muy suave. Por tanto, en caso de utilizar aceites esenciales (más efectivos como antimicrobianos y antioxidantes y, a su vez más olorosos y de color intenso) la aplicación ha de ser más diluida, para que no llegue a afectar a las propiedades sensoriales del alimento. Sin embargo, muchos extractos acuosos organolépticamente no producen tantos cambios pero no son tan efectivos.

Una de las novedades es la incorporación de probióticos a los envases comestibles. El envase puede vehicular el probiótico, para que éste pueda manifestar sus propiedades y/o características como bioconservantes y como probióticos propiamente dicho.

La biotransformación de ciertos compuestos polifenólicos de los extractos seleccionados por las bacterias probióticas podrían modificar las propiedades del envase.

Dado que son comestibles, estos envases, por su composición, presentan valor nutricional. Además, los compuestos bioactivos, tanto si han difundido al alimento como si permanecen en el envase, pueden ejercer su potencial bioactivo al ser ingeridos, siempre y cuando los compuestos se liberen de la matriz polimérica para ser susceptibles de ser absorbidos durante el proceso de digestión gastrointestinal.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Memoria consiste en el desarrollo y aplicación de recubrimientos comestibles para conferir estabilidad y alargar la vida útil de los productos pesqueros.

Para abordar dicho objetivo, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de envases comestibles con aceites esenciales y aplicación en productos pesqueros.

1.1. Selección de aceites esenciales antimicrobianos para su incorporación a matrices complejas (gelatina-quitosano).

1.2. Aplicación de envases en la conservación de pescado refrigerado: salmón (*Salmo salar*) y bacalao (*Gadus morhua*).

2. Estudio de la composición de extractos acuosos de té verde (*Camellia sinensis*) en relación a su funcionalidad y desarrollo de envases comestibles.

2.1. Selección de un extracto de té verde (*Camellia sinensis*) según sus propiedades biológicas entre distintas variedades en base a su composición química.

2.2. Caracterización, evaluación de propiedades activas y liberación de compuestos activos de películas con extracto de té verde.

3. Incorporación de bacterias lácticas en envases comestibles y estudio de su viabilidad durante la conservación de filete de merluza.

4. Desarrollo de películas complejas para la bioconservación de productos pesqueros.

4.1. Viabilidad de los probióticos en presencia de los polifenoles mayoritarios del té verde y del extracto de té verde.

4.2. Biotransformación de los compuestos polifenólicos mayoritarios del té verde y del extracto de té verde.

4.3. Bioconservación de productos pesqueros mediante la aplicación de películas complejas constituidas por probióticos y extracto de té verde.

5. Bioaccesibilidad de compuestos procedentes de películas comestibles mediante un modelo de digestión gastrointestinal simulada *in vitro*.

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

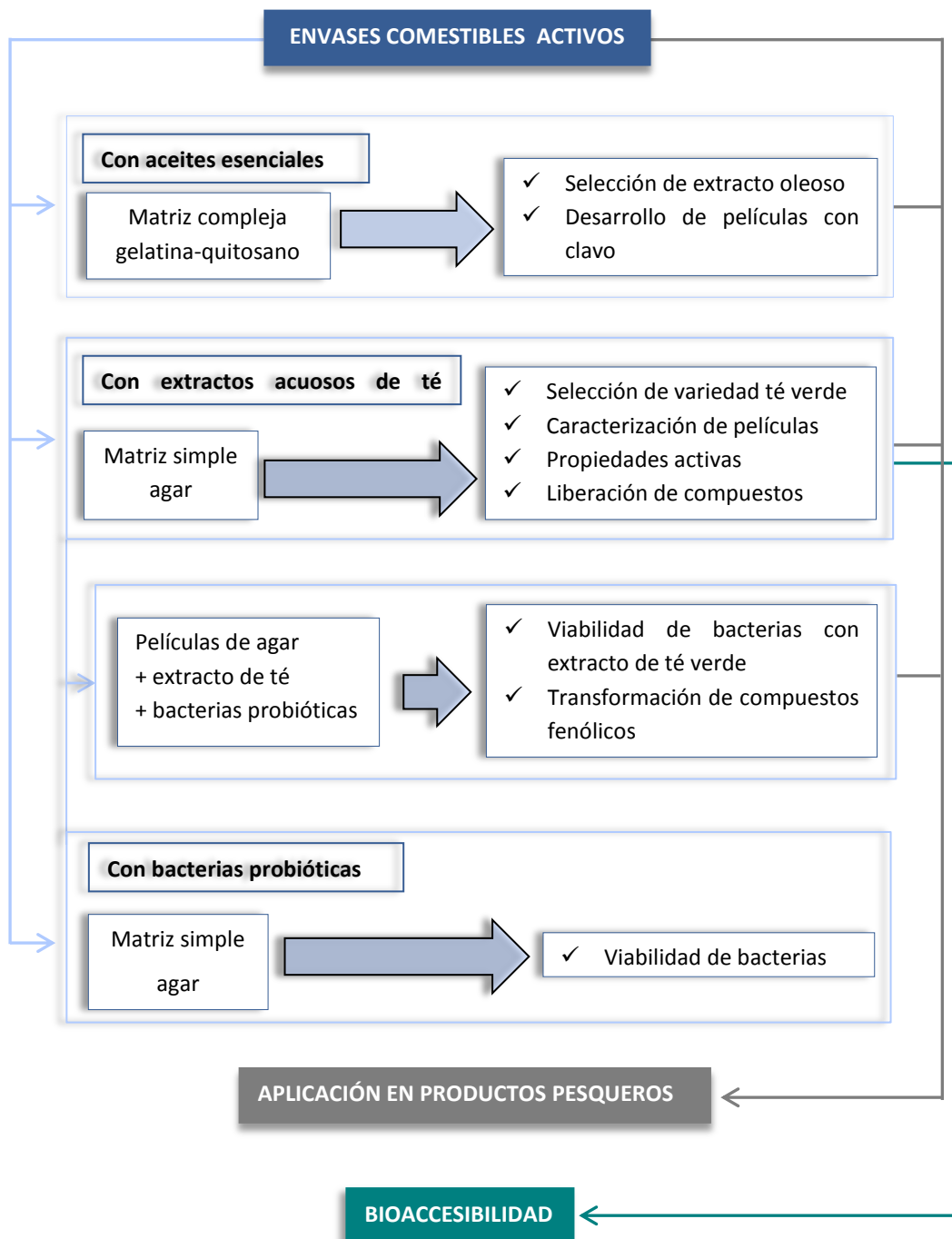


Figura 1. Representación esquemática del diseño experimental.

V. TRABAJO EXPERIMENTAL

V. TRABAJO EXPERIMENTAL

1. DESARROLLO DE ENVASES COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES Y APLICACIÓN EN PRODUCTOS PESQUEROS

Objetivo 1.1. Selección de aceites esenciales antimicrobianos para su incorporación a matrices complejas (gelatina-quitosano).

Para realizar la selección de los aceites esenciales se estudió la actividad antimicrobiana de 8 tipos de aceites (clavo, hinojo, ciprés, lavanda, tomillo, verbena, pino, y romero) frente a 18 géneros de bacterias, seleccionadas en base a su importancia como microorganismos del deterioro, patógenos y probióticos (artículo 2, primera parte). El clavo fue el aceite esencial con mayor actividad antimicrobiana por lo que se escogió para el diseño de las películas basadas en gelatina con o sin quitosano. La gelatina provenía de dos orígenes diferentes: pescado (artículo 1, primera parte) y bovina (artículo 2, primera parte). Posteriormente las propiedades antimicrobianas de estas películas se ensayaron frente a 4 microorganismos (*Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria innocua* y *Escherichia coli*) con el objeto de comprobar si el aceite esencial de clavo mantenía su actividad una vez incorporado a la matriz compleja.

Objetivo 1.2. Aplicación de envases en la conservación de pescado refrigerado: salmón (*Salmo salar*) y bacalao (*Gadus morhua*).

Las películas basadas en gelatina de pescado (artículo 1, segunda parte) y bovina (artículo 2, segunda parte) formuladas con quitosano y aceite de clavo se aplicaron en la conservación de salmón (artículo 1) y bacalao (artículo 2). Estos trabajos se recogen en los siguientes artículos:

Artículo 1. *Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil.* *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 46-52. doi: 10.1080/10498850802581252.

Artículo 2. *Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation.* *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.

2. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE TÉ VERDE (*Camellia sinensis*) EN RELACIÓN A SU FUNCIONALIDAD Y DESARROLLO DE ENVASES COMESTIBLES

Objetivo 2.1. Selección de un extracto de té verde (*Camellia sinensis*) según sus propiedades biológicas entre distintas variedades en base a su composición química.

El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos acuosos de 6 variedades de té verde (*Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi*, *Canela Té Verde*, *Lung Ching*, *China White Hair* y *Wu Lu Mountain*), obtenidos en las mismas condiciones. La selección de entre 6 variedades de té se realizó en base a su composición química (polifenoles, carbohidratos, minerales y aminoácidos) y sus propiedades antioxidantes (FRAP, ABTS, Photochem) y antimicrobianas. Para ello, un análisis multivariante establece correlaciones entre los diferentes parámetros estudiados y determina si las diferencias en la composición química de las 6 variedades afectaron a su actividad. La variedad de té verde *Wu-Lu-Mountain* fue seleccionada para la formulación de las películas por su alto contenido en polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Este trabajo está recogido en el artículo 3 de la presente memoria.

Artículo 3. *Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (*Camellia sinensis* L.) as an expression of its chemical composition.* *LWT - Food Science and Technology.*

Objetivo 2.2. Caracterización, evaluación de propiedades activas y liberación de compuestos activos de películas con extracto de té verde.

En este trabajo se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas y activas de películas comestibles simples de agar y complejas de agar/gelatina con extracto de té verde (*Camellia sinensis*, variedad *Wu Lu Mountain*), además de la liberación de compuestos polifenólicos. Los resultados de este trabajo se muestran en el artículo 4:

Artículo 4. *Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract.* *Food Hydrocolloids.*

3. INCORPORACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN ENVASES COMESTIBLES Y ESTUDIO DE SU VIABILIDAD DURANTE LA CONSERVACIÓN DE FILETE DE MERLUZA

Este estudio evaluó la supervivencia de dos especies de bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*) incorporadas en envases comestibles (películas y recubrimientos). Posteriormente los envases de gelatina con bifidobacterias se aplicaron en merluza refrigerada sometida con/sin alta presión, para establecer su papel durante la conservación. Estos resultados se recogen en el artículo 5 de la presente memoria:

Artículo 5. Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*

4. DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPLEJAS PARA LA BIOCONSERVACIÓN DE PRODUCTOS PESQUEROS

Objetivo 4.1. Viabilidad de los probióticos en presencia de los polifenoles mayoritarios del té verde y extracto de té verde.

Objetivo 4.2. Biotransformación de los compuestos polifenólicos mayoritarios del té verde y extracto de té verde.

En primer lugar se evaluó la supervivencia de las cepas probióticas comerciales (*Lactobacillus paracasei* LAFTI@L26, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI@L10 y *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* LAFTI@B94) en los seis tipos de extractos acuosos de té verde (las mismas variedades de té estudiadas en el objetivo 2.1) y en los polifenoles mayoritarios del té verde 5 catequinas y 5 flavonoles (estándares), y por último se determinó las actividades enzimática β -glucosidasa, β -galactosidasa y α -ramnosidasa de las tres cepas.

Posteriormente se estudiaron los cambios producidos en la concentración de polifenoles y la capacidad biológica, tanto del extracto acuoso de té *Wu Lu Mountain* como en las soluciones estándares, antes y después de la incubación con el probiótico *B. animalis* B94 durante 72 h.

Los resultados de estos estudios se recogen en los artículos 6 y 7 de la presente memoria:

Artículo 6. Survival and metabolic activity of probiotic in green tea. *LWT - Food Science and Technology.*

Artículo 7. Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols by probiotic bacteria. *Journal Agricultural and Food Chemistry.*

Objetivo 4.3. Bioconservación de productos pesqueros mediante la aplicación de películas complejas constituidas por probióticos y extractos de té verde

Este experimento investigó la aplicación de películas complejas constituidas a base de agar, extracto de té verde y probióticos (*L. paracasei* L26 y *B. animalis* B94) en la conservación (4 °C, 15 días) de filetes de merluza previamente inoculada con *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum* con el objeto de simular un proceso de deterioro. Los resultados de esta investigación se recogen en el artículo 8 de la memoria

Artículo 8. *Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish self-life. Food Microbiology.*

5. BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS PROCEDENTES DE PELÍCULAS COMESTIBLES MEDIANTE UN MODELO DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA IN VITRO

Las películas basadas en agar con extracto de té verde (objetivos 2.2. y 4.2), además de proteger al pescado durante la conservación, también podrían ser una fuente de compuestos activos beneficiosas (ej. polifenoles) siempre y cuando estos compuestos se liberen de la película durante la digestión, siendo susceptibles de absorberse. En este trabajo estudia la bioaccesibilidad de los polifenoles presentes en las películas de agar-extracto de té verde durante las condiciones de digestión simuladas del tracto gastrointestinal superior mediante la utilización de un modelo gástrico dinámico y un modelo duodenal estático. Los resultados de este trabajo se recogen en el artículo 9:

Artículo 9. *Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible film during simulated human digestion. Food Research International. doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.024.*

ARTÍCULO 1

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2009)

Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil

Journal of Aquatic Food Product Technology, 18(1-2), 46-52. doi: 10.1080/10498850802581252

Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil

J. GÓMEZ-ESTACA, A. LÓPEZ DE LACEY, M. C. GÓMEZ-GUILLÉN,
M. E. LÓPEZ-CABALLERO, and P. MONTERO
Institute of Refrigeration (CSIC), Madrid, Spain

*Edible films based on fish-skin gelatin incorporated with chitosan and/or clove essential oil were elaborated and their antimicrobial activity was tested on *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, and *Escherichia coli*. The films incorporated with the clove essential oil were the most effective although differences were observed depending on the biopolymeric matrix in which it was included. When a clove added film was applied to the preservation of raw sliced salmon, a reduction of the growth of total bacteria was observed after 11 days of storage at 2°C. So, edible films based on fish gelatin can be used as an active packaging applied to fish products.*

KEYWORDS *fish-skin gelatin, chitosan, clove essential oil, antimicrobial, salmon*

INTRODUCTION

Consumption of fish and fish products is recommended due to good digestibility and the high content of polyunsaturated fatty acids. Nevertheless, fish is also a highly perishable food and so, many strategies have been developed to limit its spoilage. Packaging and refrigerating are common practices that are generally applied in combination. Newer technologies and treatments are being employed, such as natural antimicrobials from plant origin or covering

This research was financed by the Ministerio de Educación y Ciencia, under projects I3-2006701141 and AGL2005-02380.

Address correspondence to M. E. López-Caballero, Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais, 10, 28040-Madrid, Spain. E-mail: mlopez@if.csic.es

with edible films or coatings prepared with natural polymers from several sources.

Edible films and coatings improve food storage, mainly as a result of their ability to act as barriers to water, preventing dehydration. They also protect against oxygen and light, reducing lipid oxidation. Furthermore, active substances like plant extracts can be added, conferring antimicrobial and/or antioxidant properties (Gennadios et al., 1997) that can improve the stability of food, including fish products (Gómez-Estaca et al. 2007). Oregano essential oil has already been included in the formulation of such edible films (Oussalah et al., 2004; Zivanovic et al., 2005), but there is no information about developing edible films containing clove essential oil. Despite this, some studies deal with the inclusion of clove essential oil in plastic films (López et al., 2007).

There are many studies dealing with the antibacterial activity of oils over a wide range of microorganisms (Deans and Ritchie, 1987; Hammer et al., 1999; Dorman and Deans, 2000; Lambert et al., 2001; Burt, 2004). The antimicrobial activity seems to be related both to the presence of specific phenolic compounds and to a disruption of the lipidic bacterial membranes, disturbing the structures and rendering them more permeable (Burt, 2004). Some essential oils, such as mint, rosemary, or oregano, were studied either *in vitro* or applied to foods; but others, such as the clove essential oil, are not extensively described.

The aim of this work was to test the usefulness of clove essential oil as a natural antimicrobial additive when included into edible films based on fish gelatin or fish gelatin plus chitosan.

MATERIALS AND METHODS

Formulation of the Films

The film forming solutions were prepared using gelatin from catfish skins (LAPI GELATINE, Italy) alone (single films) or in combination (complex films) with chitosan (Guinama, Valencia, Spain; 95% deacetylation degree). Single gelatin film forming solutions were prepared in a concentration of 8 g of gelatin/100 ml of distilled water. For complex gelatin-chitosan film forming solutions, 6 g of gelatin and 2 g of chitosan per 100 ml solution were used. Chitosan was previously dissolved in 30 ml acetic acid 0.15 M. Sorbitol (0.15 g/g gelatin or gelatin plus chitosan) plus glycerol (0.15 g/g gelatin or gelatin plus chitosan) were employed as plasticizers for all formulations. For the clove-added films, food grade clove essential oil (Eladiet, Barcelona, Spain) was added to a concentration of 0.75 ml/g biopolymer (gelatin or gelatin plus chitosan), using soya lecithin as an emulsifying agent, and homogenizing with an Ultraturrax blender (position 5, 1 min; T25 basic, IKA-Werke GMBH & Co. KG, Staufen, Germany). All mixtures were warmed and stirred at 45°C to obtain a good blend. The films were then obtained by

casting 40 ml into square plastic dishes (144 cm²) and drying at 45°C in a forced-air oven for 15 h to yield a uniform thickness (200 μm; $p \leq .05$) in all cases. Four different types of films were then obtained: a gelatin film; a gelatin-chitosan film; a gelatin clove-added film; and a gelatin-chitosan clove added film. Prior to analyses, the films were conditioned in desiccators for 2 days at 22°C over a saturated solution of NaBr (58% relative humidity).

Antimicrobial Activity of the Films

The antimicrobial activity of the films was tested following a plate diffusion assay over four microorganisms selected by their importance as healthy, spoilers, and/or potentially pathogenic microorganisms, obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, *Listeria innocua* CECT 910, and *Escherichia coli* CECT 515.

For antimicrobial activity measurements, spread plates of Brain Heart Infusion Agar (Oxoid, Basingstoke, UK) were inoculated with 100 μL of bacterial cultures grown overnight (10⁸–10⁹ CFU/ml) in Brain Heart Infusion Broth, BHI (Oxoid). Culture conditions of the selected microorganisms are presented in Table 1. Circular pieces of the different films (approximately 1.5 cm diameter) were laid onto the plate's surface and after incubation, the clear zone surrounding the circles (inhibition zones) was considered as a measurement of the antimicrobial activity. The measurement of the inhibition zones, expressed as a percentage of the total agar plate surface, was performed with specific software for digital image analysis (MIP 4 ADV, Consulting de Imagen Digital, S.L. & Microm España). A PAL standard 50 Hz monochrome video system was used for image digitations. Analyses were performed in triplicate.

Microbial Counts on Salmon

Slices of salmon (approximately 200 g each) purchased at a local market were covered or not with the gelatin-chitosan film containing clove essential

TABLE 1 Culture Conditions (Media, Temperature, and Time) for the Selected Microorganisms

Strain	Culture media	Incubation temperature	Incubation time
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	BHIA	37°C	24 h
<i>Listeria innocua</i> CECT 910	BHIA	37°C	48 h
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CECT 903	BHIA	37°C	48 h
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT 378	BHIA	(CO ₂ cabinet flow) 25°C	24 h

BHIA = Brain Heart Infusion Agar.

oil, and vacuum-packed in bags (Cryovac BB-1, Grace, Barcelona, Spain). Batches were stored at 2°C for 11 days. The microbiological analyses were as follows: A total amount of 10 g of muscle, from different packages, was collected and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of buffered 0.1% peptone water (Oxoid, Basingstoke, UK) in a vertical laminar-flow cabinet (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, Spain). After 1 min in a Stomacher blender (model Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate dilutions were prepared. Total bacterial counts were performed on spread plates of Iron Agar (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) plus 0.5% NaCl incubated at 15°C for 3 days as previously described (López-Caballero et al., 2000). Analyses were performed in triplicate.

Statistical Analysis

Statistical tests were performed using the SPSS® computer program (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way and two-way analyses of variance were carried out, differences between pairs of means being assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test with a level of significance of $p \leq .05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Results for antimicrobial activity of the films are given in Table 2. Neither the single gelatin film (as expected) nor the complex gelatin-chitosan film showed any antibacterial activity. There are many reports showing that chitosan coatings and films are effective as antimicrobial treatments (Chen et al., 1998; Jeon et al., 2002; López-Caballero et al., 2005), but results differ greatly from experimental procedures. For example, Zivanovic et al. (2005)

TABLE 2 Antimicrobial Activity for the Selected Microorganisms (% of the Total Plate Surface). Results are the Mean \pm Standard Deviation

	<i>P. fluorescens</i> CECT 378	<i>L. acidophilus</i> CECT 903	<i>L. innocua</i> CECT 910	<i>E. Coli</i> CECT 515
Gelatin	0 a/x	0 a/x	0 a/x	0 a/x
Gelatin+chitosan	0 a/x	0 a/x	0 a/x	0 a/x
Gelatin+clove	5.93 \pm 0.02 b/x	10.55 \pm 0.46 c/y	6.38 \pm 0.02 b/x	9.95 \pm 0.72 c/y
Gelatin+chitosan+clove	6.02 \pm 0.08 b/x	7.91 \pm 0.79 b/x	6.04 \pm 0.77 b/x	6.49 \pm 0.42 b/x

Different letters in the same column (a, b) indicate significant differences among the different films for the same microorganism. Different letters in the same row (x, y) indicate significant differences among the different microorganisms for the same film.

found a chitosan film to inhibit neither *L. monocytogenes* nor *E. coli* when testing it *in vitro* according to the disk diffusion method; however, they found a 1–2 log cycle reduction when they applied the same film to the preservation of inoculated bologna slices.

The films incorporating the clove essential oil showed measurable antimicrobial power against the four microorganisms tested. *L. acidophilus* CECT 903 was the most sensitive microorganism, while *P. fluorescens* CECT 378 and *L. innocua* CECT 910 were the most resistant. There were some differences found in the antimicrobial activity depending on the matrix in which the clove essential oil was included. Thus, the gelatin-chitosan clove added film showed, in some cases (namely for *L. acidophilus* CECT 903 and *E. coli* CECT 515), a lower antimicrobial activity than the gelatin clove-added film. This effect could be due to the fact that gelatin and chitosan are highly reactive molecules establishing ionic and hydrogen bonding (Taravel and Domard, 1995) that diminishes the solubility of the resulting films, as we have seen in previous studies (unpublished data). As a result, the release of the essential oil could have been reduced and so, a lower antimicrobial activity recorded. According to Papadokostaki et al. (1997), polymer structure may affect the release of active components.

To test the role of the edible film during preservation of fish, a gelatin-chitosan clove added film was applied to raw sliced salmon, and a comparison to uncovered salmon was established (Figure 1). The gelatin-chitosan clove film was selected because previous studies in our laboratory have shown that the combination of gelatin and chitosan gives rise to a lower film water solubility which will ensure the stability of the film in contact with the fish surface during chilled storage. The initial counts were quite similar (around 4.3 log CFU/g) for both batches ($p \leq .05$) and held stable for 3 days. From day 3 onward, the counts in the not covered batch rose rapidly,

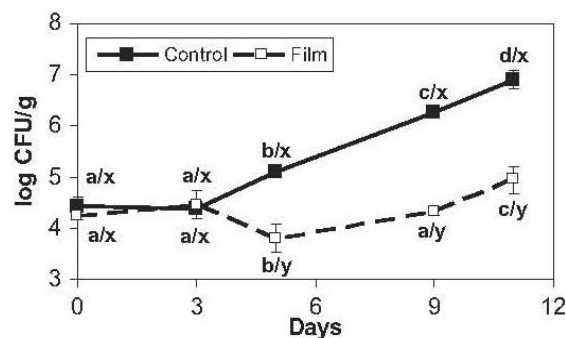


FIGURE 1 Total bacterial counts (Iron Agar, 15°C, 3 days) of the untreated sliced salmon (control batch) and the sliced salmon covered with the gelatin-chitosan clove added film (film batch). The letters a and b indicate significant differences ($p \leq .05$) within each treatment with storage time. The letters x and y indicate significant differences between the batches on each sampling date.

but the covered batch was steady up to day 9 ($p \leq .05$). At the end of storage (day 11), the counts of the batch covered with the gelatin-chitosan film were approximately 2 log cycles lower ($p \leq .05$). So the gelatin-chitosan clove added film shows good antimicrobial properties when applied to food, as did other films incorporated with chitosan and/or other essential oils on beef (Oussalah et al., 2004), bologna slices (Zivanovic et al., 2005) or cold-smoked sliced sardine (Gómez-Estaca et al., 2007).

The clove essential oil has shown good inhibitory effects over both pathogenic and spoilage microorganisms (Burt, 2004; Gómez-Estaca et al., 2008). The antimicrobial activity of the clove essential oil was maintained when it was incorporated into edible films, but differences were found as a function of the biopolymeric matrix employed. As mentioned above, gelatin-chitosan interactions in the film matrix could have impaired the release of active compounds present in the essential oil, thus lowering its effectiveness. Therefore, further studies regarding interactions of the matrix components are needed.

In conclusion, edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil can be promisingly used as active packaging applied to fish products.

REFERENCES

- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.
- Chen, C.-S., Liau, W.-Y., and Tsai, G.-J. 1998. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *J. Food Prot.* 61: 1124–1128.
- Deans, S. G., and Ritchie, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 5: 165–180.
- Dorman, H. J. D., and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308–316.
- Gennadios, R., Hanna, M. A., and Kurth, L. B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *Lebensm.-Wiss U.-Technol.* 30: 337–350.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., and Montero, P. 2008. Suitability of biodegradable gelatin films incorporated essential oils as antimicrobial agent/for fish preservation. *Submitted*
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., and Gómez-Guillén, M. C. 2007. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.* 105: 511–520.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., and Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86: 985–990.
- Jeon, Y.-J., Kamil, J. Y. V. A., and Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *J. Agric. Food Chem.* 20: 5167–5178.

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, G.-J. E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91: 453–462.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., and Nerín, C. 2007. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8814–8824.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., and Montero, P. 2005. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocol.* 19: 303–311.
- López-Caballero, M. E., Pérez-Mateos, M., Montero, P., and Borderías, A. J. 2000. Oyster preservation by high pressure treatment. *J Food Prot.* 63(2):196–201.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., and Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5598–5605.
- Papadokostaki, K. G., Amanratos, S. G., and Petropoulos, J. H. 1997. Kinetics of release of particules solutes incorporated in cellulosic polymer matrices as a function of solute solubility and polymer swellability. I. Sparingly soluble solutes. *J. Appl. Polym. Sci.* 67: 277–287.
- Taravel, M. N., and Domard, A. 1995. Collagen and its interaction with chitosan. 2. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials* 16: 865–871.
- Zivanovic, S., Chi, S., and Draughon, A. F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.* 70: M45–M51.

ARTÍCULO 2

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C. y Montero, P. (2010)

Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation

Food Microbiology, 27(7), 889-896



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation

J. Gómez-Estaca, A. López de Lacey, M.E. López-Caballero*, M.C. Gómez-Guillén, P. Montero

Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040-Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2009

Received in revised form

5 May 2010

Accepted 7 May 2010

Available online 15 May 2010

Keywords:

Essential oils

Antimicrobial

Gelatin

Chitosan

Fish

ABSTRACT

Essential oils of clove (*Syzygium aromaticum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Miller), cypress (*Cupressus sempervirens* L.), lavender (*Lavandula angustifolia*), thyme (*Thymus vulgaris* L.), herb-of-the-cross (*Verbena officinalis* L.), pine (*Pinus sylvestris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) were tested for their antimicrobial activity on 18 genera of bacteria, which included some important food pathogen and spoilage bacteria. Clove essential oil showed the highest inhibitory effect, followed by rosemary and lavender. In an attempt to evaluate the usefulness of these essential oils as food preservatives, they were also tested on an extract made of fish, where clove and thyme essential oils were the most effective. Then, gelatin–chitosan-based edible films incorporated with clove essential oil were elaborated and their antimicrobial activity tested against six selected microorganisms: *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Lactobacillus acidophilus*. The clove-containing films inhibited all these microorganisms irrespectively of the film matrix or type of microorganism. In a further experiment, when the complex gelatin–chitosan film incorporating clove essential oil was applied to fish during chilled storage, the growth of microorganisms was drastically reduced in gram-negative bacteria, especially enterobacteria, while lactic acid bacteria remained practically constant for much of the storage period. The effect on the microorganisms during this period was in accordance with biochemical indexes of quality, indicating the viability of these films for fish preservation.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The antibacterial activity of many essential oils over a wide range of microorganisms has been studied extensively (Deans and Ritchie, 1987; Hammer et al., 1999; Dorman and Deans, 2000; Burt, 2004), both *in vitro* and applied to foods. It is well known that the antimicrobial activity of essential oils is related to their chemical composition, mainly the phenolic components (Cosentino et al., 1999). Burt (2004) reviewed essential oils, the major components of which were, among others, carvacrol, thymol, γ -terpinene and p-Cymene (oregano and thyme), α -pinene, bornyl-acetate, camphor and 1,8-cineole (rosemary), eugenol and eugenyl acetate (clove, etc.). However, the composition of essential oils and the percentage of major components from a particular species of plant can differ depending on the harvesting season, geographical sources and even on the function of a part from the same plant. For example, carvacrol can be found in quantities ranging from just traces to up to 80% of oregano essential oil (Prudent et al., 1995).

Therefore, results for antimicrobial activity are not always conclusive.

Some published research suggested the possibility of using essential oils such as cinnamon and clove as natural antimicrobials in milk (Cava et al., 2007), lemon, sage, and thyme to preserve cheese (Gammariello et al., 2008), and coriander oil as a food ingredient (Burdock and Carabin, 2009). However, the use of essential oils in foods could be limited because they would confer very different flavours and smells from those natural to the food in question, as in the case of fish. Fish is highly perishable during refrigerated storage, mainly due to rapid microbial growth of microorganisms naturally present in fish or from contamination, which can occasionally result in either economic or health-related problems. Many strategies have been developed to inhibit spoilage and pathogenic microorganisms but there is still a need for new methods to further reduce or eliminate them.

On the other hand, Western society is experiencing a trend towards 'green' consumerism, a desire for fewer synthetic food additives and for products that impact less on the environment (Burt, 2004). This tendency has also led to research on developing new biodegradable packaging materials from natural polymers in order to achieve a partial alternative to plastic packaging. These films can be

* Corresponding author.

E-mail address: mlopez@if.csic.es (M.E. López-Caballero).

obtained from several sources (polysaccharide, lipid, protein) (Tharanathahan, 2003) which are in many cases waste products from fishing, agriculture or cattle farming. Moreover, essential oils can be applied to the formulation of edible films, providing them with additional antioxidant and/or antimicrobial properties which can extend shelf-life and reduce or inhibit food borne pathogens (Zivanovic et al., 2005; Oussalah et al., 2004).

There are some studies dealing with the antimicrobial properties of films based on milk-proteins, chitosan or alginates incorporated with various essential oils (oregano, rosemary, garlic, pimento, cinnamon) (Seydim and Sarikus, 2006; Oussalah et al., 2004, 2006; Zivanovic et al., 2005) with good results. In this regard, chitosan is a valuable component for producing biodegradable packaging films, among other reasons because of its film-forming capability as well as its antioxidant and antimicrobial properties (Jeon et al., 2002; López-Caballero et al., 2005). Some studies have considered the incorporation of aqueous plant extracts into the formulation of gelatin edible films (Gómez-Estaca et al., 2007) and the formulation of plastic films incorporated with clove essential oil (López et al., 2007). The effect of catfish gelatin coating containing origanum oil on some pathogenic bacteria (*Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*) was also reported (Min and Oh, 2009). However, information about either the incorporation of essential oils in gelatin films or the utilization of clove essential oil for this purpose has not been found.

The objective of this work was to test the antimicrobial properties of some selected essential oils over a range of bacteria of importance as pathogens or food spoilers. The most effective essential oil was applied to gelatin–chitosan biodegradable films and their antimicrobial activity was tested on certain microorganisms, including some related to fish spoilage. The effect of the film applied to fish during chilled storage was also tested.

2. Materials and methods

2.1. Essential oils and bacterial strains

Food grade essential oils of clove (*Syzygium aromaticum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Miller), cypress (*Cupressus sempervirens* L.), lavender (*Lavandula angustifolia*), thyme (*Thymus vulgaris* L.), herb-of-the-cross (*Verbena officinalis* L.), pine (*Pinus sylvestris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) were purchased at specialized local markets. Clove, cypress, lavender and rosemary were from Eladiet S.A. (Barcelona, Spain); pine and fennel were from Plantapol S.L. (Zaragoza, Spain); thyme and herb-of-the-cross were from El Sabinar (Burgos, Spain).

The antimicrobial activity of the oils was tested over the following bacterial strains obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Listeria innocua* CECT 910, *Citrobacter freundii* CECT 401, *E. coli* CECT 515, *Shigella sonnei* CECT 4887, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110, *Yersinia enterocolitica* CECT 4315, *Brochothrix thermosphacta* CECT 847, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Bacillus cereus* CECT 148, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Clostridium perfringens* CECT 486, *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898 and *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T. The strains were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) with 25% glycerol (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) until use. All the strains were grown in BHI broth (Oxoid) (supplemented with 3% NaCl for *V. parahaemolyticus* and 1% NaCl for *P. phosphoreum*). Organisms were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ excepting *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens*, incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; *B. thermosphacta* at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and *P. phosphoreum* at $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. In addition, *L. acidophilus* was

incubated under CO_2 flow and *C. perfringens* under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid).

2.2. Antimicrobial activity of the essential oils

2.2.1. Qualitative analyses

The antimicrobial activity of the essential oils over the selected microorganisms was as follows: agar plates of culture media were prepared; $10\text{ }\mu\text{l}$ of essential oil were added onto a well (10 mm diameter), previously done with a sterile core-bore on the agar which contained $10\text{ }\mu\text{l}$ of each bacterial strain overnight grown (10^8 CFU/mL). Chloramphenicol ($0.3\text{ g}/100\text{ ml}$) was used as antibiotic control. All the strains were cultured in Plate Count Agar (PCA), with the exception of *L. acidophilus* (de Man, Rogosa and Shape, MRS) and *V. parahaemolyticus* and *P. phosphoreum* (Iron Agar, IA, supplemented with 3 and 1% NaCl, respectively). Culture media was supplied by Scharlau, Barcelona, Spain (PCA and IA) and Oxoid (de Man, Rogosa and Shape, MRS). The incubation temperature for the organisms was the same as described above. The time of incubation was 48 h for *L. innocua*, *L. acidophilus* *C. perfringens*, *P. fluorescens* and *B. thermosphacta* and 72 h for *V. parahaemolyticus*, *A. hydrophila*, *S. putrefaciens* and *P. phosphoreum*. The remaining strains were incubated during 24 h. After incubation the microbial growth was observed and the degree of inhibition was expressed as follows: +++: totally inhibited; ++: partially inhibited; +: slightly inhibited; -: no inhibition.

The potential usefulness of these essential oils as antimicrobials for fish preservation was tested as well. For this purpose, a homogenate from chilled dolphinfish (*Coryphaena hippurus*), stored for 10 days at $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, was obtained. The homogenate was prepared by mixing 25 g of fish muscle with 225 ml of buffered 0.1% peptone water (Oxoid) in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) and homogenized in a Stomacher blender (model Colworth 400, Seward, London, UK) for 1 min. Then $10\text{ }\mu\text{l}$ of essential oil were placed in a 10 mm well containing $10\text{ }\mu\text{l}$ of fish homogenate and incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 72 h, as previously described for collection strains. The inhibition was expressed as mentioned above.

2.2.2. Quantitative analyses

The antimicrobial activity of the most effective essential oils (clove, rosemary thyme and lavender) was tested over six selected microorganisms (*L. acidophilus* CECT 903, *E. coli* CECT 515, *P. fluorescens* CECT 4898, *L. innocua* CECT 4032, *P. phosphoreum* CECT 4192 and *S. putrefaciens* CECT 5346T). These microorganisms were selected for their importance as healthy, spoilers and indicators of potentially pathogenic microorganisms of significance in fish. Spread plates of BHI Agar (Oxoid), were inoculated with $100\text{ }\mu\text{l}$ of those microorganisms overnight grown (10^8 CFU/mL). BHI containing 1% NaCl was used for *P. phosphoreum*. Filter paper disks (0.5 cm diameter), soaked with $40\text{ }\mu\text{l}$ of each essential oil, were put onto the plate surface. The time and temperature of incubation was the same as previously described for the qualitative analyses. After incubation the inhibition area was measured using specific software for digital image analysis (MIP 4 ADV, ver. 1. Consulting de Imagen Digital, S.L. & Microm España). Results are expressed as the percentage of inhibition respecting to the total plate surface.

2.3. Essential oil-added films

2.3.1. Formulation of the films

The film forming solutions were prepared using gelatin from bovine-hide (Sancho de Borja S. L., Zaragoza, Spain) alone (single films) or in combination (complex films) with chitosan (Guinama, Valencia; 95% deacetylation degree). Single gelatin film forming

solution was prepared by dissolving 8 g of gelatin per 100 ml of distilled water. Sorbitol (Panreac) (0.15 g/g gelatin) and glycerol (Panreac) (0.15 g/g gelatin) were added as plasticizers. For complex gelatin–chitosan film forming solutions, 6 g of gelatin plus 2 g of chitosan per 100 ml film forming solution were used. Gelatin was dissolved in distilled water, whereas chitosan (2 g) was dissolved in 0.15 M acetic acid (Panreac, Barcelona, Spain) (30 ml). Sorbitol (0.15 g/g gelatin plus chitosan) and glycerol (0.15 g/g gelatin plus chitosan) were added as plasticizers. All mixtures were warmed and stirred at 45 °C for 15 min to obtain a good blend. For preparing the clove-added film forming solution, the biopolymers (gelatin alone or gelatin plus chitosan) were previously dissolved as described above, using the same amount of sorbitol plus glycerol as plasticizers. Food grade clove essential oil was incorporated in a proportion of 0.75 ml/g biopolymer (gelatin alone or gelatin plus chitosan), and soya lecithin (Lucas Meyer, S. A., Barcelona, Spain) (0.125 g/g gelatin) was added as an emulsifying agent. The clove-added film forming solution was homogenized with an Ultraturrax blender (position 5, 1 min) (T25 basic, IKA-Werke GMBH & Co. KG, Staufen, Germany). The films were obtained by casting an amount of 40 ml in square plastic dishes (144 cm²) and drying at 45 °C in a forced-air oven for 15 h to yield a uniform thickness [200 µm ($p \leq 0.05$)] in all cases. Uniformity was verified by measuring the thickness in 9 points randomly. Four different types of films were then obtained: a gelatin film; a gelatin–chitosan film; a gelatin clove-added film; and a gelatin–chitosan clove-added film. Prior to analyses the films were conditioned in desiccators for 2 d at 22 °C over a saturated solution of NaBr (58% relative humidity).

2.3.2. Antimicrobial activity measurement

The clove essential oil was selected for inclusion on edible films based on gelatin and chitosan and its antimicrobial activity was tested over four microorganisms: *E. coli* CECT 515, *P. fluorescens* CECT 4898, *L. acidophilus* CECT 903 and *L. innocua* CECT 910. Spread plates of BHI Agar were inoculated with 100 µl of these bacteria overnight grown (10⁸ CFU/ml). Then, circular pieces of the different films (1.5 cm diameter) were laid onto the inoculated plate's surface and after incubation the observed inhibition zones –surrounding clear areas– were considered as a measurement of the antimicrobial activity (measured by digital image analysis as previously described). Culture conditions were as described before.

2.3.3. Water solubility

Film portions measuring 1 cm² were placed in aluminium capsules with 15 ml of distilled water and shaken gently at 22 °C for 15 h. The solution was then filtered through Whatman no. 1 filter paper to recover the remaining undissolved film, which was desiccated at 105 °C for 24 h. As previously described (Gómez-Estaca et al., 2008), film solubility was calculated by the equation $FS(\%) = ((W_0 - W_f)/W_0)100$, where W_0 was the initial weight of the film expressed as dry matter and W_f was the weight of the undissolved desiccated film residue.

2.4. Fish storage trial

Cod (*Gadus morhua*) filets purchased at a local market were cut in portions of (c.a. 100 g each), covered with the gelatin–chitosan film containing clove essential oil, and vacuum-packed in bags (Cryovac BB-1, Grace, Barcelona, Spain). Batches were stored at 2 ± 1 °C during 11 days.

2.4.1. pH

Approximately 5–10 g of muscle were homogenized with a double quantity (g/ml) of distilled water. After 5 min at ambient temperature, pH was determined with a pHm93 pH-meter and

a combined pH electrode (Radiometer, Copenhagen, Denmark). The experiments were repeated at least in triplicate.

2.4.2. Total volatile basic nitrogen (TVB-N)

Total volatile basic nitrogen (TVB-N) determinations were carried out in triplicate over the storage period using the method of Antonacopoulos and Vyncke (1989). 10 g ± 0.1 g of the ground sample were weighed in a suitable container and homogenized with 100 ml 6% perchloric acid solution for 2 min. After filtering, the extract was alkalized with 20% sodium hydroxide solution and submitted to steam distillation. The volatile base components were absorbed by an acid receiver and determined by titration. All analyses were performed at least in triplicate.

2.4.3. Microbiological assays

The microbiological analyses were as follows: a total amount of 10 g of muscle, from at least 3 different packages, was collected and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of buffered 0.1% peptone water (Oxoid, Basingstoke, UK) in a vertical laminar-flow cabinet (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, Spain). After 1 min in a Stomacher blender (model Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate dilutions were prepared for the following microorganism determinations: (i) total bacterial counts (TBC) on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 3 days; (ii) H₂S-producers organisms, as black colonies, on pour plates of Iron Agar incubated at 15 °C for 3 days; (iii) luminescent bacteria on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 5 days; (iv) *Pseudomonas* on spread plates of Pseudomonas Agar Base (Oxoid) with added CFC (Cetrimide, Fucidine, Cephalosporine) supplement for *Pseudomonas* spp. (Oxoid) incubated at 25 °C for 48 h; (v) *Enterobacteriaceae* on double-layered plates of Violet Red Bile Glucose agar (VRBG, Oxoid) incubated at 30 °C for 48 h [after first adding 5 ml of Tryptone Soy Agar (Merck, Darmstadt, Germany) and incubating at room temperature for 1 h]; (vi) lactic acid bacteria on double-layered plates of MRS Agar (Oxoid) incubated at 30 °C for 72 h. All microbiological counts are expressed as the log of the colony-forming units per gram (log CFU/g) of sample. All analyses were performed in triplicate.

2.5. Statistical analyses

Statistical tests were performed using the SPSS® computer program, version 15.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

The qualitative antimicrobial activity of the essential oils against the selected microorganisms is presented in Table 1. Clove essential oil presented the highest inhibitory effect, followed by rosemary and lavender. Pine, as in previous reports (Hammer et al., 1999), was the least effective followed by fennel. In general the more sensitive microorganisms were *C. perfringens*, *B. cereus* and *S. aureus*, while the most resistant ones were *Pseudomonas* spp., *C. freundii*, *Y. enterocolitica* and *Listeria* spp. These results can be attributed to the cell wall lipopolysaccharides of gram-negative bacteria, which may prevent active components from reaching the cytoplasmic membrane (Ouattara et al., 1997). One exception was *Listeria* spp., whose resistance was comparable to that of some gram-negative bacteria (Table 2). This fact had been reported previously (Kim et al., 1995), and this difference in resistance of gram-positive bacteria to the effects of essential oils may be due to

Table 1

Qualitative antimicrobial activity of the essential oils over 18 bacterial strains. +++: totally inhibited; ++: partially inhibited; +: slightly inhibited; -: no inhibited.

	Clove	Fennel	Cypress	Lavender	Thyme	Herb-of-the-cross	Pine	Rosemary	Chloramphenicol
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+++	+	++	+++	++	++	-	+++	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+++	++	++	++	++	++	-	++	+++
<i>Listeria innocua</i>	+++	-	+	+	+	+	-	++	+++
<i>Citrobacter freundii</i>	+++	-	-	+	-	-	-	+	+++
<i>Escherichia coli</i>	+++	++	-	++	+	-	-	++	+++
<i>Shigella sonnei</i>	+++	++	++	++	+	-	-	+++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	++	-	-	+	+	+	-	+++	+
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	+++	+	+	+	+	+	+	+	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+	+++	+++	++	++	++	+++	+++
<i>Bacillus cereus</i>	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+++
<i>Clostridium perfringens</i>	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+++	++	++	++	++	++	+	+++	+++
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+++	++	+++	+++	++	++	+	+	+++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+++	++	+	++	++	+	++	++	+++
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	+++	++	-	++	+++	+++	++	+++	+++
<i>Fish inoculum</i> ^a	+++	-	-	-	+++	+	-	++	+++

^a Made of fish (10-days chilled stored) in 0.1% peptone water (1:10 w/v).

variability between strains of the same species (Ouattara et al., 1997).

Deans and Ritchie (1987) tested *in vitro* the antimicrobial activity of fifty essential oils against more than 25 microorganisms and the clove essential oil was shown to be one of the most effective, as in the present work. In this connection, the essential oils of clove and rosemary inhibited, among others, *B. thermosphacta* and *P. fluorescens* (Ouattara et al., 1997). Some authors have also reported good inhibitory effects of clove and rosemary essential oils *in vitro* against pathogenic microorganisms like *L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus* or *S. aureus* (del Campo et al., 2000; Burt, 2004). Nevertheless, no information has been presented about the effect of clove essential oil on *S. putrefaciens*, which plays an important role in the spoilage of fish (López-Caballero et al., 2001). The present study, however, shows that this microorganism was also inhibited (Table 1).

In order to quantify their antimicrobial effect, the most effective oils (clove, lavender, rosemary and thyme) were tested on 6 selected microorganisms; two gram-positive (*L. acidophilus* and *L. monocytogenes*) and four gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. fluorescens*, *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens*). The inhibition zones, objectively measured through image analysis (Table 2), confirmed what has already been described above, since the major zones of inhibition corresponded to clove ($p \leq 0.05$). The effect of the other oils was similar for all microorganisms with the exception of *P. phosphoreum* and *L. innocua* ($p \leq 0.05$). Lavender only slightly inhibited gram-positive bacteria and pseudomonads, while no differences were observed at all between *E. coli* and *L. innocua*, and *L. acidophilus* and *P. fluorescens*, when grown with rosemary

essential oil ($p \leq 0.05$). The lowest inhibitory effect was for thyme (Table 2). *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens* had the highest inhibition areas with all the essential oils tested. This is promising for fish storage since both bacteria can be specific spoilage organisms for fish (Gram and Huss, 1996). Mejholm and Dalgaard (2002) found thyme and clove to have a similar effect on the specific growth rate of *P. phosphoreum* in liquid medium at 2 °C.

Concerning their use as food additives, essential oils have been employed in the preservation of a wide range of foods, including vegetables, rice, fruit, dairy products, fish, meat and poultry (Burt, 2004). In the present work, we tested *in vitro* the antimicrobial effect of some essential oils on an extract from fish muscle chill-stored for 10 days (total bacterial load was c.a. 10^6 CFU/g). Results showed that only clove and thyme essential oils provided total inhibition (+++), followed by rosemary (++) and herb-of-the-cross (+). In contrast, fennel, cypress, lavender and pine did not have any effect (Table 1). Regarding seafood, it has been shown that the application of oregano essential oil in the preservation of cod and salmon fillets (Mejholm and Dalgaard, 2002), thyme and oregano in Asian sea bass (Harpaz et al., 2003) and garlic in carp (Mahmoud et al., 2004) had antimicrobial effects which led to a shelf-life extension of the fish. Clove essential oil was the most effective essential oil tested in the present work (Tables 1 and 2). Burt (2004) reviewed the application of clove to preserve meat and poultry with promising results; however, to our knowledge no information has been produced about its use with fish products.

As far as the gelatin and gelatin–chitosan edible films are concerned, neither showed any antibacterial activity (Table 3). Nevertheless, chitosan coatings and films have been reported to be

Table 2

Quantitative antimicrobial activity of the essential oils.

Microorganisms/Essential oil	Clove	Lavender	Rosemary	Thyme	Chloramphenicol
<i>E. coli</i>	3.69 ± 0.4 b/B	1.22 ± 0.14 c/A	1.03 ± 0.05 b/A	0.8 ± 0.08 b/A	6.39 ± 0.15 b/C
<i>L. acidophilus</i>	2.83 ± 0.09 a/B	0.63 ± 0.03 a/A	0.65 ± 0.01 a/A	0.64 ± 0.02 a/A	6.42 ± 0.11 b/C
<i>L. innocua</i>	3.67 ± 0.15 b/B	0.79 ± 0.01 b/A	1.06 ± 0.02 b/A	0.77 ± 0.02 b/A	8.62 ± 0.29 c/C
<i>P. fluorescens</i>	2.86 ± 0.09 a/C	0.56 ± 0.01 a/A	0.62 ± 0.02 a/A	0.58 ± 0.02 a/A	1.11 ± 0.02 a/B
<i>P. phosphoreum</i>	10.61 ± 0.3 c/D	5.92 ± 0.33 d/C	3.69 ± 0.16 d/B	2.51 ± 0.32 d/A	17.96 ± 0.24 d/E
<i>S. putrefaciens</i>	15.74 ± 1.79 d/C	1.45 ± 0.15 c/A	2.71 ± 0.27 c/B	1.19 ± 0.06 c/A	17.87 ± 0.2 d/C

Different letters a, b... in the same column indicate significant differences among the bacteria for the same essential oil. Different letters A, B... in the same row indicate significant differences among the different essential oils for the same microorganism. Results are the mean ± standard deviation and are expressed as the percentage of inhibition (%) of the total plate surface.

Table 3
Antimicrobial activity of the films over the selected microorganisms.

Film/Microorganisms	<i>P. fluorescens</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>
G	0 a/A	0 a/A	0 a/A	0 a/A
G–Ch	0 a/A	0 a/A	0 a/A	0 a/A
G–Cl	9.07 ± 0.13 b/B	12.76 ± 2.51 b/B	7.46 ± 0.53 b/A	10.65 ± 1.37 b/B
G–Ch–Cl	9.51 ± 2.03 b/B	12.60 ± 3.42 b/B	6.42 ± 0.41 c/A	8.69 ± 0.42 c/B

G: gelatin film; G–Ch: gelatin–chitosan film; G–Cl: gelatin clove-added film; G–Ch–Cl: gelatin–chitosan clove-added film. Different letters a, b... in the same column indicate significant differences among the different films for the same microorganism. Different letters A, B... in the same row indicate significant differences among the different microorganisms for the same film. Results are the mean ± standard deviation and are expressed as the percentage of inhibition (%) of the total plate surface.

effective as antimicrobial agents (Jeon et al., 2002; López-Caballero et al., 2005; Fernández-Saiz et al., 2009) but this could be because results can differ so much depending on experimental procedures. Thus, a chitosan film did not inhibit either *L. monocytogenes* or *E. coli* when tested *in vitro* (the disk diffusion method) though a 1–2 log cycle reduction was found when the same film was employed in the preservation of inoculated bologna slices (Zivanovic et al., 2005). The antimicrobial capacity on several microorganisms depends on the conditions and methods of obtaining the chitosan-based films (Fernández-Saiz et al., 2009) and the composite formulation and release of the active groups (Fernández-Saiz et al., 2008).

The films incorporating the clove essential oil were antimicrobial against the four microorganisms tested, without significant differences between them ($p \leq 0.05$). The matrix in which the clove was added (gelatin [G–Cl film] or gelatin–chitosan [G–Ch–Cl film]) did not affect antimicrobial activity ($p \leq 0.05$) (Table 3). In contrast, when clove essential oil was added to films elaborated with a fish gelatin some differences in sensitivity to the film among microorganisms were found, *L. acidophilus* being the most sensitive while *P. fluorescens* and *L. innocua* were the most resistant (Gómez-Estaca et al., 2009). Furthermore, with regard to films incorporating clove, the fish gelatin–chitosan film was in some cases less effective than the gelatin one. The differences with respect to the present results are highly ascribable to the different degrees of gelatin interaction (as a function of their origin) with polyphenols (Gómez-Estaca et al., 2009) and chitosan (Gómez-Estaca et al., 2007), which may affect the capacity of the antimicrobial compounds.

When a film is placed over the food surface, its solubility largely determines the release of antimicrobial compounds (Papadokostaki et al., 1997). Gelatin film showed a low solubility value of $26.2 \pm 1.5\%$, similar to that reported by Bertan et al. (2005) ($\sim 30\%$) in bovine-hide gelatin films. The water solubility of the gelatin–chitosan film (G–Ch film) was similar to that for gelatin alone, according to previous experiences with this type of gelatin blended with chitosan (Gómez-Estaca, 2007). When the clove essential oil was added to the film (G–Cl batch) a significant ($p \leq 0.05$) increase in water solubility was observed ($41.1 \pm 1.5\%$). This fact is highly attributable to the establishment of protein–polyphenol interactions which weaken the interactions that stabilize the protein net. Orliac et al. (2002) found a similar behaviour when polyphenolic antioxidants were added to films produced from sunflower protein isolate. In contrast, when clove essential oil was added to the gelatin–chitosan matrix (G–Ch–Cl) the solubility of the film was maintained ($29.5 \pm 3.2\%$). This fact could be due to specific interactions between gelatin and chitosan that stabilize the film structure despite the presence of clove. According to Taravel and Domard (1995), gelatin and chitosan interact mainly by means of hydrogen bonding, which affects the physical properties of the mixtures. Thus, the clove-incorporated bovine-hide gelatin–chitosan film would release a lesser amount of antimicrobials but would maintain its integrity to a greater extent when applied to fish.

The pH of the cod was 6.7. This value increased to 7.3–7.4 during the first days of storage and then remained constant

until the end of storage. Herland et al. (2007) reported a pH of 6.99 in wild cod after 5 days in ice; this value then increased to 7.2 on day 15. However, in our work the pH decreased when the gelatin–chitosan film was applied to fish with values below 7 (Fig. 1) ($p \leq 0.05$). This drop can be partially attributed to the remains of acetic acid in which the chitosan was dissolved when incorporated into the film.

Initially, TVB-N in cod registered 13.5 mg TVB-N/100 g muscle and both lots evolved similarly during early storage (Fig. 2). Similar results in cod (12.19 ± 0.92 mg of TVB-N/100 g of flesh) were reported by López-Caballero et al. (2005). From day 3, TVB concentrations in control cod increased surpassing the amount of 30 mg N/100 g between days 4 and 5 of storage. Olafsdottir et al. (2006) found that with initial values of ca 10 mg N/100 g, the chilled cod exceeded 35 mg N/100 g between 7 and 11 days of storage. The cod-film lot progressed similarly to the control lot, although the formation of TVB was delayed (Fig. 2) ($p \leq 0.05$).

Microbial counts are shown in Fig. 3. Initially, the total viable bacteria count for cod was 6.1 log CFU/g. This load was probably high due to microorganisms acquired during processing in the market. Total bacteria increased significantly during the first days of storage, with approximate values of ≈ 9 log CFU/g on the third day (Fig. 3a) ($p \leq 0.05$). These counts are similar to those found by Hovda et al. (2007) in cod stored at 4 °C. *H₂S*-producing bacteria, as black colonies in Iron Agar, also had total counts that evolved in a similar way and constituted the major flora of cod. Luminescent bacteria, considered as presumptive *P. phosphoreum* (López-Caballero et al., 2002) were found in cod after 3 days of storage (6 log CFU/g), but this type of organism was not detected any more during the storage period. The microbiota of vacuum-packed fish from temperate marine waters is caused by *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens*; with differences in their initial numbers deciding which becomes the most important (Gram and Huss, 1996). Initially, *Pseudomonas* spp. counts were 3.3 log CFU/g, similar to

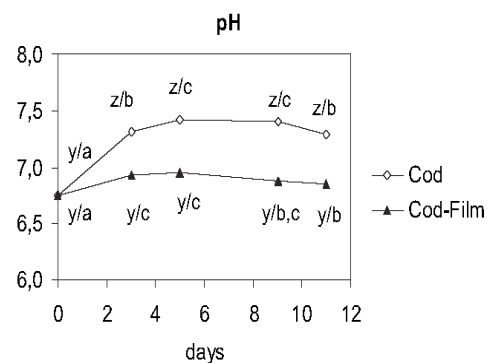


Fig. 1. pH of cod and cod-film stored at chilled temperatures (2 ± 1 °C). Different letters a, b... indicate significant differences ($p < 0.05$) on each lot as a function of storage time; different letters x, y... indicate significant differences ($p < 0.05$) among lots on each sampling date.

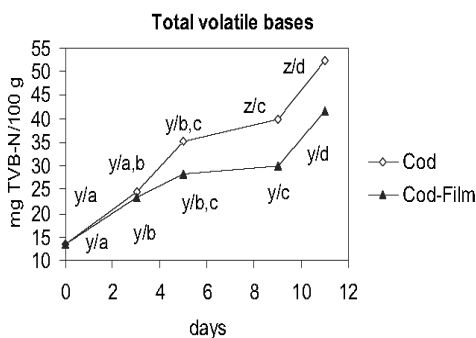


Fig. 2. Total volatile bases (mg TVB-N/100 g) of cod and cod-film stored at chilled temperatures (2 ± 1 °C). Different letters a, b... indicate significant differences ($p < 0.05$) on each lot as a function of storage time; different letters x, y... indicate significant differences ($p < 0.05$) among lots on each sampling date.

those found in cod patties (López-Caballero et al., 2005). As already mentioned and despite being present in substantial numbers, in our experiment *Pseudomonas* did not dominate cod flora (Fig. 3c). Lactic acid bacteria counts were 4.8 in raw cod but reached levels of around 6 log cycles at the end of storage ($p \leq 0.05$). Counts on VRBG for *Enterobacteriaceae* were found to be high, possibly due to handling during initial fillet preparation and their numbers increased during storage despite the storage temperature (Fig. 3e).

Chitosan–gelatin film incorporated with clove oil reduced or inhibited the studied microorganisms ($p \leq 0.05$) (Fig. 3a–e) and corresponded with the delay in TVB production registered by the cod-film lot (Fig. 2). This microbial inhibition could be attributed to the hydrophobic nature that enables essential oils and their components to partition in the lipids of the bacteria cell membrane and mitochondria while disturbing the structures and rendering it more permeable (Sikkema et al., 1994). This inhibition was especially drastic in H_2S -producing bacteria, since their growth was interrupted with the application of the film (Fig. 3b). Herland et al. (2007) reported that the differences in counts of H_2S -producing bacteria between different types of cod (farmed and wild) stored in ice could be related to chemical differences, pH being one of them, since low pH inhibits H_2S -producing bacteria. At low pH the hydrophobicity of an essential oil increases, facilitating its dissolution in the lipids of the bacteria cell membrane (Juven et al., 1994). In our work, differences in pH values between the two lots varied by approximately 1 unit (Fig. 1). *Enterobacteriaceae* counts were also below the detection limit from day 6. However, lactic acid bacteria were inhibited to a lesser extent by the clove film than other microorganisms, registering 4 log CFU/g after 14 days of storage (Fig. 3) ($p \leq 0.05$). Ouattara et al. (2000) found that whereas lactic acid bacteria were not affected by the antimicrobial films (films prepared by incorporating organic acids in a chitosan matrix, with or without the addition of lauric acid or cinnamaldehyde and placed on meat products), the growth of *Enterobacteriaceae* and *Serratia liquefaciens* was delayed or completely inhibited. Similar results with respect to lactic acid bacteria and *Enterobacteria* were obtained during the storage of fish patties protected by a chitosan-gelatin blend (López-Caballero et al., 2005). In the present work, the effect of film containing chitosan and clove on *P. phosphoreum* was not conclusive since, as mentioned before, these bacteria are only occasionally detected in cod. In connection with this (Mejholm and Dalgaard, 2002) reported that 0.01% clove inhibited the maximum specific growth of *P. phosphoreum* in liquid medium by 25.5 ± 10.6 while $\leq 0.025\%$ clove (v/v) inhibited growth by $>85\%$.

The intrinsic properties of the food (fat, protein, pH, etc.), as well as the environment in which the food is maintained (storage

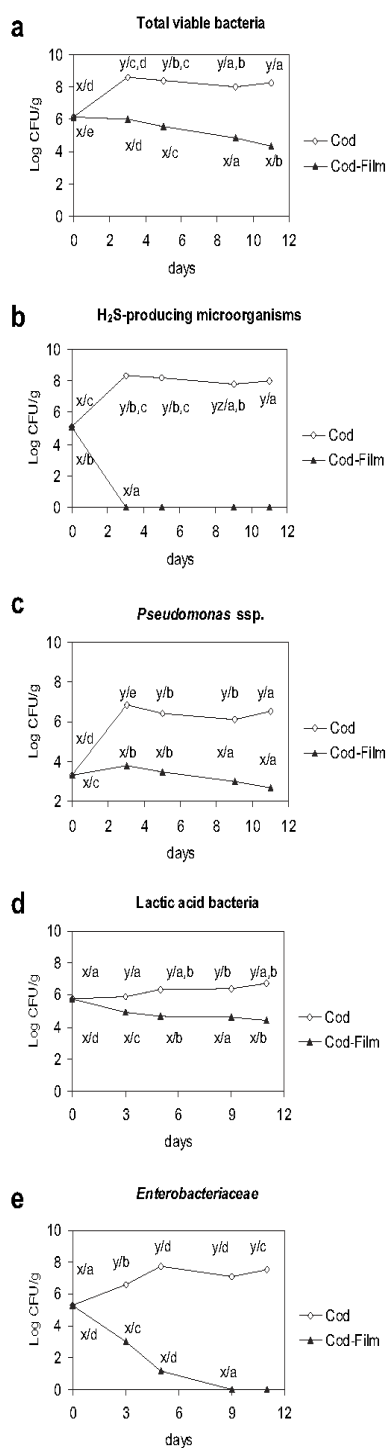


Fig. 3. Microbiological counts (log CFU/g) for the cod and cod-film: a (total bacterial counts), b (H_2S -producers microorganisms), c (*Pseudomonas* sp.), e (*Enterobacteriaceae*), d (lactic acid bacteria). Different letters a, b... indicate significant differences ($p < 0.05$) on each lot as a function of storage time; different letters x, y... indicate significant differences ($p < 0.05$) among lots on each sampling date.

temperature, packaging, etc.), may influence the effect of the essential oils on the microbiota (Tassou et al., 1995; Burt, 2004). Thus, factors such as low pH, storage temperature, decreased O_2 concentrations and high salt content enhance the antimicrobial

effect of the oils, while factors like high levels of protein and fat and low water activity seem to protect bacteria. Cod is a lean fish with pH close to 7, which does not impede the clove oil from acting. Ratledge and Wilkinson (1988) postulated that the sensitivity of gram-negative organisms to the essential oils is lower because of the outer membrane around the cell wall. However, these results are not in agreement with those obtained in our experiments, since *H₂S*-producer microorganisms, *Pseudomonas* spp. and *Enterobacteriaceae* were inhibited to a greater extent compared with lactic acid bacteria (Fig. 3).

In summary, of the eight essential oils tested, clove essential oil showed the highest inhibitory effect against both pathogenic and spoilage bacteria, as well as against the natural microbiota of the fish. The antimicrobial activity of the clove essential oil was maintained when it was incorporated in bovine-hide gelatin and chitosan edible films, with no difference between the matrices employed. Nevertheless, some differences were observed with regard to water solubility which could determine the release of antimicrobial compounds into food and affect the antimicrobial activity of the films, as the gelatin–chitosan–clove film is less soluble than the gelatin–clove film. This could be advantageous because essential oils could then be released more slowly so as to maintain sufficient concentration over a longer period of time. During fish storage, the clove film delayed or even prevented both the growth of microorganisms and the occurrence of total volatile nitrogen. Therefore films incorporating clove essential oil could assure an extended shelf-life for chill-stored fish.

Acknowledgements

This research was financed by the Ministerio de Educación y Ciencia, under projects I3-200670141 and AGL2005-02380.

Instituto del Frío is certified under the Quality Management System ISO9001:2000 by AENOR (Agencia Española de Normalización), (2008).

References

Antonopoulos, N., Vyncke, W., 1989. Determination of volatile bases in fish: a third collaborative study by the West European Fish Technologists Association (WEFTA). *Z. Lebensm. – Unters. – Forsch. A* 189, 309–316.

Bertan, L.C., Tanada-Palmu, P.S., Siani, A.C., Grosso, C.R.F., 2005. Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids* 19 (1), 73–82.

Burdock, G.A., Carabin, I.G., 2009. Safety assessment of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil as a food ingredient. *Food Chem. Toxicol.* 47 (1), 22–34.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.

Cava, R., Nowak, E., Taboada, 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J. Food Prot.* 70 (12), 2757–2763.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedei, E., Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 130–135.

Deans, S.G., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 165–180.

del Campo, J., Amiot, M.-J., Nguyen-The, C., 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *J. Food Prot.* 63, 1359–1368.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308–316.

Fernández-Saiz, P., Lagarón, J.M., Hernández-Muñoz, P., Ocio, M.J., 2008. Characterization of antimicrobial properties on the growth of *Staphylococcus aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. *Int. J. Food Microbiol.* 124 (1), 13–20.

Fernández-Saiz, P., Lagarón, J.M., Ocio, M.J., 2009. Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent. *J. Agric. Food Chem.* 57 (8), 3298–3307.

Gammariello, D., Di Giulio, S., Conte, A., Del Nobile, M.A., 2008. Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of Fior di Latte cheese, a typical Italian cheese. *J. Dairy Sci.* 91 (11), 4138–4146.

Gómez-Estaca, J., 2007. Tratamientos combinados de alta presión, antioxidantes naturales y envasado activo para preservar la calidad del pescado ahumado en frío. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, 419 pp.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., Gómez-Guillén, M.C., 2008. Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. *J. Food Eng.* doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.07.022.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C., 2007. Effect of functional edible films and high pressure-processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.* 105, 511–520.

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E., Montero, P., 2009. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 18, 46–52.

Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 121–137.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, 985–990.

Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A., 2003. Effects of herbal essential oils to extend the shelf life of freshwater-reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *J. Food Prot.* 66, 410–417.

Herland, H., Esaiassen, M., Olsen, R.L., 2007. Muscle quality and storage stability of farmed cod (*Gadus morhua* L.) compared to wild cod. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 16, 55–65.

Hovda, M.B., Sivertsvik, M., Lunestad, B.T., Rosnes, J.T., 2007. Microflora assessments using PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis of ozone-treated and modified atmosphere-packaged farmed cod filets. *J. Food Prot.* 70 (11), 2460–2465.

Jeon, Y.-J., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F., 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *J. Agric. Food Chem.* 20, 5167–5178.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626–631.

Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., 1995. Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839–2845.

López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C., 2007. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8814–8824.

López-Caballero, M.E., Sánchez-Fernández, J.A., Moral, A., 2001. Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained under different CO₂ and O₂ concentrations. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 277–287.

López-Caballero, M.E., Álvarez, M.D., Sánchez-Fernández, J.A., Moral, A., 2002. *Photobacterium phosphoreum* isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in model system under controlled atmospheres. *Eur. Food Res. Technol.* 215 (5), 390–395.

López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Pérez-Mateos, M., Montero, P., 2005. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocol.* 19, 303–311.

Mahmoud, B.S.M., Yamazaki, K., Muyashita, K., Shik, S.I., Dong-Suk, C., Suzuki, T., 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiol.* 21, 657–666.

Mehholm, O., Dalgaard, P., 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 27–31.

Min, B.J., Oh, J.H., 2009. Antimicrobial activity of catfish gelatin coating containing organum (*Thymus capitatus*) oil against gram-negative pathogenic bacteria. *J. Food Sci.* 74 (4), M143–M148.

Olafsdottir, G., Lauzon, H., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Kristbergsson, K., 2006. Evaluation of shelf life of superchilled cod (*Gadus morhua*) filets and the influence of temperature fluctuations during storage on microbial and chemical quality indicators. *J. Food Sci.* 71, S97–S109.

Orlic, O., Rouilly, A., Silvestre, F., Rigal, L., 2002. Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer* 43, 5417–5425.

Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5598–5605.

Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2006. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J. Food Prot.* 69, 2364–2369.

Quattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.-P., Bégin, A., 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 155–162.

Quattara, B., Simard, R.E., Piette, G.J., Bégin, A., Holley, R.A., 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 139–148.

Papadokostaki, K., Amanratos, S.G., Petropoulos, J.H., 1997. Kinetics of release of particulate solutes incorporated in cellulosic polymer matrices as a function of solute solubility and polymer swellability. I. Sparingly soluble solutes. *J. Appl. Polym. Sci.* 67, 277–287.

Prudent, D., Perineau, F., Bessiere, J.M., Michel, G.M., Baccous, J.C., 1995. Analysis of the essential oils of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.) – evaluation of its antibacteriostatic and fungistatic properties. *J. Essent. Oil Res.* 7, 165–173.

Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.-G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 3–22.

- Seydim, A.C., Sarikus, G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. Int.* 36, 639–644.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269 (11), 8022–8028.
- Taravel, M.N., Domard, A., 1995. Collagen and its interaction with chitosan. 2. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials* 16, 865–871.
- Tassou, C., m Drosinos, E.H., Nychas, G.-J.E., 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4–°C. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 593–600.
- Tharanathahan, R.N., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 71–78.
- Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A.F., 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.* 70, M45–M51.

ARTÍCULO 3

López de Lacey, A.M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2012)

Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (Camellia sinensis L.) as an expression of its chemical composition

LWT - Food Science and Technology

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF GREEN TEA (*Camellia sinensis* L.) AS AN EXPRESSION OF ITS CHEMICAL COMPOSITION

Ana M. López de Lacey^a, Efrén Pérez Santín^a, M. Elvira López-Caballero^{a,*}, Pilar Montero^a

^a Institute of Food Science, Technology and Nutrition, (ICTAN), CSIC. (formerly Institute of Refrigeration), C/ José Antonio Nováis, 10, 28040. Madrid, Spain.

*Corresponding author: E-mail address: elvira.lopez@ictan.csic.es

Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

ABSTRACT

The biological activity of different varieties of green tea (*Camellia sinensis* L.) aqueous extracts, (*Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi*, *Cinnamon Green*, *Lung Ching*, *China White Hair* and *Wu Lu Mountain*) was evaluated in terms of their antioxidant and antimicrobial properties and chemical composition. Principal components analysis revealed a positive correlation between the content of polyphenols, amino acids and antioxidant activity, and a negative correlation to microorganisms and minerals. The extracts with higher levels of total catechin, flavonol and amino acids (*Cinnamon Green* and *Wu Lu Mountain*) also had higher antioxidant activity. However, these varieties did not present marked difference compared to others regarding antimicrobial activity. *China White Hair*, with the lowest total catechin and amino acid content, medium flavonol levels, and low carbohydrate and mineral concentrations, had the lowest antioxidant activity. The antimicrobial activity of this variety against *Vibrio parahaemolyticus* and *Pseudomonas fluorescens* was superior to other varieties of tea with higher polyphenol content. The results showed that aqueous extracts from different varieties within green tea presented differences in their chemical composition, that the bioactive properties of extracts were not related to each other and that it was the whole set of components that defined the biological properties of tea extracts.

Key words: Green tea aqueous extracts, composition, polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity, pattern recognition.

1. INTRODUCTION

Tea produced from the leaves and buds of the *Camellia sinensis* L. plant is the second most consumed beverage in the world, well ahead of coffee, beer, wine and carbonated soft drinks (Costa, Gouveia, & Nobrega, 2002). Depending on the manufacturing process, teas are classified into several major types, with green tea being one of the non-fermented varieties. Green tea has perhaps the most beneficial properties and its effects on health have been widely described (Cabrera, Artacho, & Gimenez, 2006). The beneficial effects of green tea have been attributed to the presence of polyphenols, pigments, amino acids, vitamins, carbohydrates, minerals and purine alkaloids (Isiguki, Takakuwa, & Takeo, 1991; Weisburger & Chung, 2002; Bolling, Chen, & Blumberg, 2009). The major green tea polyphenols are catechins and their derivatives, epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECG) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Del Rio *et al*, 2004). Tea is also a source of flavonols such as derivatives of quercetin and kaempferol (Finger, Engelhardt, & Wray, 1991; Del Rio *et al*, 2004). There are also other compounds present in tea which are related to its biological properties. Thus, tea contains polysaccharides which have multi-functions such as hypoglycemic and hypolipidemic effects, antioxidant activity, immune system stimulation (Chen, Zhang, & Xie, 2005; Wang, Zhou, Li, Hou, Sun, & Wang, 2008), and could be a good source of dietary minerals (Fernández, Pablos, Martín, & González, 2002). Other interesting tea compounds are the amino acids that can be used as indicators of tea quality (Yao *et al.*, 2006) because of their contribution to taste and colour.

Although the extracts obtained from tea may be of different types, most of the green tea phenolic compounds can be obtained by hot water (Lin, Chen, & Harnly, 2008) while maintaining their biological properties (Hamilton-Miller, 1995; Dufresne & Farnworth, 2001; Cabrera *et al*, 2006; Friedman, 2007). An additional advantage is the safety of the aqueous extracts compared to those obtained with organic solvents; in addition, they could be incorporated in food products without changing their sensory properties. In this regard, green tea extract is already being used as an active compound in coatings used to preserve freshly cut food (Chiu & Lai, 2010). In this way, the product acquires the benefits of green tea while at the same time maintaining its attributes.

Although many studies have been published dealing with the composition of herbal teas prepared for consumption, the results are not comparable because the raw materials and extraction methods are different. Most of the studies establish differences in composition

between different tea processes used (green, black, oolong, etc.), but to our knowledge there are few studies that characterize varieties and compare them in terms of their composition and bioactive potential. The aim of this work was to evaluate and compare the antioxidant and antimicrobial activities of six varieties of green tea. To this end, multivariate analysis established correlations between the different parameters studied and determined if the differences in the chemical composition of the six varieties of green tea affected their activities.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemical

Minerals content: nitric acid and hydrogen peroxide (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain). Determination of carbohydrates: phenol, 96% sulphuric acid, low-alkalinity copper reagent, arsenomolybdate reagent, glucose (Sigma-Aldrich Chemie, Madrid, Spain). Analysis of amino acids: HCl, phenol and norleucine (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Determination of total phenols: Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Standard polyphenol compounds: (-)-epigallocatechin (EGC, CAS: 970-74-1), (+)-catequin (C, CAS:154-23-4), (-)-epicatequin (EC, CAS: 490-46-0), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG, CAS: 1257-08-5), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG, CAS: 989-51-5), rutin (CAS: 153-18-4), Hyperoside (CAS: 482-36-0), quercetin-3-*O*-glucoside (CAS: 482-35-9), kaempferol-3-*O*-rutoside (CAS: 17650-84-9), kaempferol-3-*O*-glucoside (CAS: 480-10-4) were purchased from Extrasynthese (Genay, Cedex, France). HPLC-MS: HPLC grade acetonitrile and formic acid (VWR international, Inc., Barcelona, Spain). HPLC grade water was prepared from distilled water using a Milli-Q system (Millipore Laboratory Bedford, MA). Antimicrobial activity: glycerol (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain). Antioxidant activity; FRAP: (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine), FeCl₃ and FeSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). ABTS: [2,2'-azino-*bis*-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], potassium persulphate, Vitamin C (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). Photochemiluminescence assay: ACW and ACL kit, reagent 2, reagent 3 (Photochem[®], Analytik Jena AG). Ascorbic acid and trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA).

2.2. Extraction of green tea

Six green teas in loose leaf were purchased from a local specialized tea store (La Antigua Plantación, Madrid, Spain) in spring 2010. Teas of different origin were chosen to be of great

use. The varieties selected were: *Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi*, *Cinnamon Green Tea*, *Lung Ching*, *China White Hair* and *Wu Lu Mountain* (the first three varieties from Japan and the last three from China). Dry green tea was ground into fine powder using a blender (Osterizer, By/Par Sunbeam, mo. 4153-50, México). To prepare water extract, the powder (35 g) was mixed with Milli-Q water (350 mL) at 80 °C for 30 minutes (Komes, Horžić, Belščak, Ganić, & Vulić, 2010), with continuous stirring. The slurry mixture was centrifuged at 12000 g for 10 minutes at 5 °C. The supernatant was filtered two times through Whatman filter papers N° 1. Finally, the filtered extract was stored at -20 °C before the analysis.

2.3. Determination of phenol compounds

2.3.1. Determination of Total Phenolic

The total phenolic content in tea extracts was determined spectrophotometrically according to a modified method of Slinkard and Singleton, (1977) with Folin-Ciocalteu's reagent. An aliquot of 20 µL of extract was mixed with 1.58 mL distilled water and oxidized with 100 µL Folin-Ciocalteu reagent sample. The reaction was neutralized with 300 µL sodium carbonate solution and incubated for 2 hours at room temperature. The absorbance of the resulting blue colour was measured in a spectrophotometer at 765 nm. Using gallic acid as standard total phenolic content was expressed as mg GA equivalent/mL of aqueous extract tea. All determinations were performed at least in triplicate.

2.3.2. Quantification by HPLC-MS

Reverse phase high performance liquid chromatography was performed to analyse phenolic compounds present in the aqueous green tea extract. The separation module consisted of an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany), equipped with a C18 size column (250 x 4.6 mm, 5µm, C18 Tracer Excel ODS-A column, Teknokroma) and a diode array detector (DAD). The samples were eluted with a gradient system consisting of solvent A (deionized water) and solvent B (acetonitrile) both containing 1% formic acid, used as the mobile phase, with a flow rate of 1 mL/min.

The temperature of the column was maintained at 25 °C and the injection volume was 20 µL. The gradient system started at 90% solvent A and decreased to 74% A within 40 min, followed by a decreased to 35% solvent A in 10 min. The final conditions were held for an additional 5 min. The peaks of the phenolic compounds were monitored by atmospheric

pressure electrospray ionization (ESI) source, operated in negative ion mode, with the electrospray capillary voltage set to 3000 V, a nebulizing gas flow rate 12 L/h, and a drying temperature of 350 °C. Mass spectrometry data were acquired in the scan mode (mass range m/z 200-700) and in the sim mode (m/z 289, 305, 441, 441, 447, 457, 609).

The quantification was carried out using the external standard method. Solutions of each standard at various concentration levels of 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L. were injected into the column and the elution was performed in the same manner with the samples. Each individual compound was quantified using a calibration curve of the corresponding standard compound. All determinations were performed at least in triplicate.

2.4. Determination of carbohydrates

2.4.1. Determination of total carbohydrates (reducing and non-reducing sugars)

Carbohydrate content in the green tea extracts was determined by Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, and Smith, (1956) with a slight modification. To an aliquot (10 μ L) of sample, 500 μ L of 4% aqueous solution of phenol was added, and then 2.5 mL of concentrated sulphuric acid was directly added to the surface of the solution. The mixture was heated in a water bath at 95 °C for 15 minutes. After heating, the samples were cooled-down in a water bath at room temperature for 5 min protected from light. The absorbance was read at 490 nm by means of an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japan). Colorimetric response was compared to a standard curve based on D-glucose. The carbohydrate content was expressed as mg/mL of glucose. All determinations were performed at least in triplicate.

2.4.2. Determination of reducing sugars. The determination for reducing sugars was

Carried out using the Nelson-Somogyi method, (Nelson, 1944). An aliquot (10 μ L) of sample, 1 mL low-alkalinity copper reagent was added. The final solution was heated in a bath at 100 °C for 10 minutes. After incubation 1 mL of arsenomolybdate reagent was added, and the solution was diluted to 5 mL with distilled water and was allowed to stand at least 15 min at room temperature. The absorbance was read at 500 nm by means of an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japan). Colorimetric response was compared to a standard curve based on D-glucose, The carbohydrate content was expressed as mg/mL of glucose. All determinations were performed at least in triplicate.

2.5. Minerals content

The microwave digestion system (Microwave digestion LabStation, Milestone Inc., Shelton, USA) was used to digest sample in presence of nitric acid and hydrogen peroxide (Panreac). Samples were made up to 100 mL with Milli-Q water. A Perkin-Elmer model 5100 Pc atomic absorption spectrophotometer (Massachusetts, USA) with an air- and acetylene-oxidizing flame was used to determine calcium (Ca), magnesium (Mg), sodium (Na), potassium (K), zinc (Zn), manganese (Mn), iron (Fe) and copper (Cu) cations in these solutions. Results were expressed in mg/100 mL of tea extract. All determinations were performed at least in triplicate.

2.6. Amino acids

An amount of 50 μ L of sample was dried and hydrolysed in vacuum-sealed glass tubes at 110 °C for 24 h in the presence of constant boiling 6 mol/L HCl containing 0.1% phenol and using norleucine (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Mo., USA) as the internal standard. After hydrolysis, samples were again vacuum-dried, dissolved in application buffer and injected into a Biochrom 20 amino acid analyser (Pharmacia, Barcelona, Spain). Theanine and serine were eluted at the same retention time, therefore their values are shown together.

2.7. Antioxidant activity

2.7.1. FRAP

The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay was carried out according to the method described by Benzie and Strain, (1996) with some modification. This assay measures the change in absorbance at 595 nm owing to the formation of a blue colored Fe^{II} -tripyritydyltriazine compound from the colourless oxidized Fe^{III} form by the action of electron donating antioxidants (Benzie, Chung, & Strain, 1999). An amount of 60 μ L of sample was incubated (37 °C) with 60 μ L of Milli-Q water and 900 μ L of FRAP reagent, containing 10 mmol/L of TPTZ (2,4,6-tripyritydyl-s-triazine) and 20 mmol/L of FeCl_3 . Absorbance values were read at 595 nm after 30 min, using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ equivalents/g of sample based on a standard curve of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. All determinations were performed at least in triplicate.

2.7.2. ABTS

The ABTS radical [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] scavenging capacity was carried out according to the method of Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, and Rice-Evans (1999). The amount of ABTS radical cation scavenged by antioxidants is measured by monitoring the decrease of absorbance of ABTS radical cation, and compared with the decrease of absorbance produced by the addition of known amount of vitamin C. The stock solution of ABTS radical consisted of 7 mmol/L ABTS in potassium persulphate 2.45 mmol/L, kept in the dark at room temperature for 16 h. An aliquot of stock solution was diluted with Milli-Q water in order to prepare the working solution of ABTS radical with absorbance at 734 nm of 0.70 ± 0.02 . A 20 μ L aliquot of sample was mixed with 980 μ L of ABTS reagent. The mixture was then left to stand in the dark at 30 °C for 10 min and absorbance values were read at 734 nm using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g of sample based on a standard curve of Vitamin C. All determinations were performed at least in triplicate.

2.7.3. Photochemiluminescence assay

This assay (PCL) involves the photochemical generation of superoxide (O_2^-) free radical combined with chemiluminescence detection of luminol, which acts as a photosensitizer as well as an oxygen radical detection reagent. This reaction takes place in the PHOTOCHEM® (Analytik Jena AG). The ACW and ACL kits provided by the manufacturer were used to measure hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity, respectively (Popov & Lewin, 1999). The ACW kit, 1.5 mL reagent 1 (water), 1 mL reagent 2 (buffer solution pH 10.5), 25 mL reagent 3 (luminol), and 10-30 mL standard solution or appropriately diluted antioxidant samples were mixed and measured. The ACL kit, 2.3 mL reagent 1 (methanol), 200 μ L reagent 2 buffer solution), 25 mL reagent 3 (luminol), and 10-30 mL standard solution or appropriately diluted antioxidant samples were mixed and measured. These are standardized conditions. All samples were appropriately dissolved and diluted in reagent 1 of the ACL and ACW kits before analysis in each measurement. Ascorbic acid and trolox were used as the calibration reagents for ACW and ACL, respectively, at measuring concentration ranges of 1-3 nmol. All samples were measured at least in duplicate. The percentage relative standard deviation was less than 10%.

The antioxidant capacity was determined by means of the lag phase (L) in seconds, $L = L_0 - L_1$ (where L_0 and L_1 are the respective parameters of the blank and sample), or by means of the

degree of PCL inhibition (I), $I = 1 - S/S_0$ (where S_0 is the integral under the blank curve and S is the integral under the sample curve), for the ACW or ACL values, respectively. The results were expressed in the nanomolar range and calculated to micromoles per 100 mL ascorbic acid or trolox equivalents ($\mu\text{mol TE}$ or $\mu\text{mol AAE}/100 \text{ mL}$).

2.8. Antimicrobial activity

2.8.1. Bacterial strains and growth conditions.

The antimicrobial activity of the green teas was tested over the following bacterial strains obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Listeria innocua* CECT 910, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Escherichia coli* CECT 515, *Shigella sonnei* CECT 4887, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110, *Yersinia enterocolitica* CECT 4315, *Brochothrix thermosphacta* CECT 847, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Bacillus cereus* CECT 148, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215 and *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* DSMZ 10140. The strains were stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) with 25% glycerol (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) until use. All the strains were grown in BHI broth (Oxoid) (supplemented with 3% NaCl for *V. parahaemolyticus*, 1% NaCl for *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens*) excepting *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *B. bifidum* and *B. animalis* were grown in 0.05% cysteine MRS broth. Organisms were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ excepting *Bacillus cereus*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens*, incubated at $30 \text{ }^\circ\text{C}$; *B. thermosphacta* at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and *P. phosphoreum* at $15 \text{ }^\circ\text{C}$. In addition, *L. acidophilus* was incubated under CO_2 flow and *B. bifidum* and *B. animalis* under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid).

2.8.2. Quantitative antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the six green teas was tested over twenty selected microorganisms. Spread plates of medium were inoculated with $100 \mu\text{L}$ of overnight grown bacterial suspensions (10^5 - 10^6 CFU/mL) overnight grown. Filter paper disks (0.5 cm diameter), soaked with $50 \mu\text{L}$ of each green tea infusion were put on the plate surface. The time and temperature of incubation was the same as previously described above. After incubation the inhibition area (mm) was measured using specific software for digital image analysis (MIP 4

ADV, ver. 1. Consulting de Imagen Digital, S.L. & Microm España). Results are expressed as the percentage of inhibition respecting to the total plate surface. A minimum of three replicates disks was used for each green tea extract.

2.8.3. Minimal inhibitory concentration determination

The minimal inhibitory concentration determination of the six green teas was performed over six selected microorganisms: *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium phosphoreum*. Six different dilutions of each aqueous green tea infusion were tested: 10, 20, 40, 60, 80 and 100% (v/v). Spread plates of medium were inoculated with 100 μL of bacterial suspensions (10^5 - 10^6 CFU/mL) and then, a 50 μL drop of each aqueous extract was placed on the plate. All the plates were incubated at the same time and temperature as described above. The minimal inhibitory concentration was defined as the lowest concentration which produced inhibition zone of growth.

2.9. Statistical analyses.

All analyses were performed at least in triplicate and a completely randomized design was used. Analysis of variance (ANOVA) was performed and mean comparisons were done by Duncan's multiple range tests. Furthermore, a multivariate analysis was performed on all data values obtained from the different analyses, with the chemical composition (phenolics, carbohydrates, minerals, amino acids) antioxidant activity (FRAP, ABTS, PCL assay) and antimicrobial activity as a whole set. Factorial analysis by principal components analysis (PCA) was done. Correlation among properties was also calculated. The level of significance setting was $P \leq 0.05$. All descriptive statistic and statistical tests were performed using the SPSS pack (SPSS 19.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The total phenolic content of water extract from green tea is shown in Table 1. All tested teas are rich in phenolic compounds, although some differences could be observed among the varieties, depending on the source. The highest total polyphenol content was detected in *Cinnamon Green Tea* with 9770 mg/L equivalents of gallic acid, while the lowest concentration corresponded to *China White Hair* with 4712 mg/L equivalents of gallic acid.

In the present work, six water extracts of green tea were subjected to identification and quantification. The most abundant bioactive constituents of green tea were catechins (flavan-3-ols) followed by flavonols, although in much lower quantities (Table 1). Consequently, the chromatographic determination of the polyphenolic profile shows 5 major peaks of catechin compounds: (-)-epigallocatechin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin gallate) and five flavonols: rutin, hyperoside, quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside and kaempferol-3-O-glucoside. These compounds can constitute 16-30% of the dry weight of fresh leaf tea (Graham, 1992).

Total catechins ranged from 5.36 g/L in *China White Hair* to 11.27 g/L in *Wu Lu Mountain*. Catechins are colourless and water soluble, and contribute to the bitterness and astringency of green tea infusions (Del Rio et al, 2004). The prevailing phenolic compound in all green teas was (-)-epigallocatechin gallate, registering 6.82 g/L in *Wu Lu Mountain* tea (Table 1). The lowest concentration corresponded to catechin, which barely reached 47.5 mg/L in the same variety of tea, indicating that the extract had not been degraded (Ito, Yamamoto, Kodama, Kato, Yoshimura, Matsunaga, & Nakazawa, 2003). These results are consistent with other reports dealing with several varieties of green tea (Graham 1992, Lin et al 2008), while in other types of tea, for example in black tea, epigallocatechin gallate and catechin were found in smaller amounts. Reto, Figueira, Filipe, and Almeida (2007) found that in 9 varieties of green tea the total minority compounds from catechin are CE and C, with EGCG and EGC, in similar quantities, being the most abundant. Some published data give higher values for EGCG (even 115 mg/g), in methanol extracts of fresh tea shoots (Yao et al, 2004).

The flavonol compounds (in much lower concentrations) ranged from 84.7 mg/L in *Lung Ching* tea to 237.6 mg/L in *Cinnamon Green tea*. The major flavonols were quercetin and kaempferol, together with their glycosylated forms, although in some cases, myricetin and its glycosides were also detected in green tea (Graham, 1992; Del Rio et al, 2004). In the 6 varieties of tea selected, no predominance of any one of the flavonols is clearly seen, although there are variations of the same compound between teas. Thus, the kaempferol-3-O-rutinoside varies from 10 to 67 mg/L for *Lung Ching* and *Cinnamon Green* teas, respectively (Table 1). Contrary to the total catechins, the flavonol content of *Wu Lu Mountain* tea was not significant ($p \leq 0.05$).

Aqueous extracts of tea make it possible to obtain infusions with high amounts of bioactive compounds and a minor degradation of the phenolic compounds (Perva-Uzunalić, Skerget, Knez, Weinreich, Otto, & Grüner, 2006; Komes et al, 2010). The aforementioned authors showed that catechins tend to degrade during prolonged extraction, and after

applying high extraction temperatures. The catechin and flavonol levels referred to in the present work were obtained with aqueous extracts at 80 °C/30 min (Table 1). The conditions of extraction used in this study were similar to that reported by Sharma, Gulati, and Ravindranath, (2005), who observed that catechins (especially EGCG, EGC and EC) showed marked differences when extracted at different temperatures and that the best extraction results were achieved at 90 °C for 80 min. The total phenolic content of various green tea aqueous extracts obtained by heating was as much as 20% of dry weight (Lin *et al* 2008). These authors confirmed that under these conditions, the extracts contained most of the tea polyphenolics with the exception of flavonol acylate glucosides. In a review on green tea, Peterson *et al* (2005) observed catechin values of only 13.6% of dry weight.

Varieties of *Japan Sencha Makinohara* and *Cinnamon Green teas* had very similar values for total carbohydrates in mg/mL (Table 2), whereas the other extracts registered significant differences ($p \leq 0.05$) between them. The carbohydrate content does not seem to be related to any specific components or to the origin of the tea. As no information was found dealing with these varieties, it has been difficult to make any comparisons.

There were higher values for the amount of reducing sugars present in the extracts than for the total carbohydrate content (Table 2). This could be due to the determination method used, since in the Somogyi-Nelson assay, all substances with reducing or oxidative properties might cause interference (Paleg, 1959). The results in the present study show that tea extracts with higher amounts of reducing sugars (*Cinnamon Green Tea* and *Wu Lu Mountain*) also had more polyphenols (Table 1 and 2). By their nature, polyphenols may affect the determination of reducing sugars by the interference technique mentioned above.

Table 3 shows the mineral content of the green teas studied. The highest mineral concentration found for all the samples was K, followed by Mg and Mn; other minerals occurred in much lower amounts, becoming just traces in the case of Cu and Fe. These results are consistent with other studies (Fernández *et al*, 2002; Gallaher, Gallaher, Marshall, & Marshall, 2006; Musa Özcan, Ünver, Uçar, & Arslan, 2008; Reto *et al*, 2007), where K is reported to be the major mineral in green tea infusions. However, Fernandez-Cáceres, Martín, and González (2001) found that the major minerals in both green and black tea are Ca, Mg and Al in tea, but with variations depending on the geographical location of the tea. Gallaher *et al*, (2006) and Reto *et al*, (2007) studied the mineral extraction percentage from dry teas of different herbs, including green tea, and found that K was particularly soluble, with excellent extraction rates while Fe had the worst extraction rate and was the least soluble mineral. This may explain the considerable difference found between K and Fe levels.

As can be seen from Table 3, mineral concentration was different depending on the variety of tea ($p \leq 0.05$). Musa *et al* (2008) stated that harvesting times, soil properties and climate could explain the differences in the mineral composition of herbal tea infusions. Fernández *et al* (2002) studied the mineral composition of different types of green teas, including Sencha, one of the varieties in the present study. Although no information has been found concerning the mineral contents of the specific green tea infusions used in the present work, Fernández *et al* (2002) obtained lower values for K, Mg, Mn and Zn in green tea infusions, but with similar Na and Ca (Table 3). The levels of K, Mg, Mn and Zn reported by Gallaher *et al* (2006) and Reto *et al* (2007) in green tea infusions (1.5% extract) were also lower although the Na content was higher. The Mg, Mn and Zn concentrations were similar to those reported by Musa Özcan *et al* (2008) in green tea infusions (1.5% extract), however K and Fe were higher in this study and they did not detect Ca. It appears that the aqueous extracts in this study should have a higher concentration of minerals, because, compared to other studies, a higher percentage of dry tea was used (the more dilute infusions of many studies were between 1.5 and 2%). It seems that in some cases the proportion of dry tea does not affect mineral concentration, which could be because large quantities of dry tea and low volumes of water do not permit a good release, although this effect was not found when comparing this study with the literature. Furthermore, the different preparations of tea extract could affect the mineral composition (Fernández *et al*, 2002), or according to Gallaher *et al* (2006), the relationship of pH to mineral solubility might explain the variability in extraction rates.

The most abundant amino acids in the teas studied included glutamic acid (Glu), aspartic acid (Asp), serine (Ser) and arginine (Arg), (Table 4). There were quantitative differences among the varieties of tea studied but no qualitative variations ($p \leq 0.05$). The predominance of some amino acids varies from one publication to another and could be attributed to differences between varieties and types of tea extracts (some proteins are more easily extracted than others in some cases or have different amounts of free amino acids). In this sense, Graham (1992) indicated that green tea leaves contain about 4% of free amino acids and 15% protein. Wang and Ruan (2009), who carried out the analysis of amino acids in green tea infusions (Longjing teas), found that theanine (Thea) was the predominant free amino acid followed by glutamic acid (Glu), proline (Pro), aspartic acid (Asp), serine (Ser), arginine (Arg) and histidine (His). The mentioned amino acids were among the majority in the present study (Table 4). No information has been found regarding the amino acid contents of the specific green tea infusions used in this study.

Some authors have reported that free amino acids can be good chemical descriptors to differentiate green, black and oolong tea infusions, and the composition of the other minor amino acids can be useful as well, for differentiating kinds of tea or for determining tea quality (Wang *et al*, 2010). These authors found that Asp, Glu and Ser levels were more abundant in green teas than in the other teas tested. The amino acid content was determined in green, oolong, black and *Pu-erh* tea water extracts and most of the green teas had theanine, serine and valine as majority components (Syu, Lin, Huang, & Lin, 2008), while theanine, glutamic acid and aspartic acid were the most abundant amino acids in all the teas studied (Alcázar *et al*, 2007).

It is important to note that some amino acids can interact with other compounds in tea such as polyphenols. The formation of covalent bonds has been described between SH groups of cysteine and EGCG (Ishii, Mori, Tanaka, Mizuno, Yamaji, & Kumazawa, 2008; Chen, Wang, Zhang, Ren, & Zeng, 2011). Other amino acids can cause weaker interactions with polyphenols, either by hydrogen bonds or electrostatic interactions. Pro has a strong affinity for the hydroxyl groups of catechins (Pocent-Legrand, Edelman, Putaux, Cartalade, Sarni-Manchado, & Vernhet, 2006), and these authors suggest that frequent consumption of tea with whole milk can alter the activity of the infusion alone. In addition, saliva proteins, also rich in proline, can establish interactions with the tea infusion and alter their biological properties. It has been reported that the interaction of poly(L-pro) with EGCG, ECG and C is immediate and its stability depends on the relationship between protein and polyphenol, while there are no interactions with EC and EGC (Poncet-Legrand *et al*, 2006). These interactions could change the potentially bioactive polyphenols contained in tea (Arts *et al*, 2002). Nevertheless, these studies are performed in model systems, but not in a real system like food where many other complex conditions may occur. Other authors observed that certain proteins (for example, bovine gelatine with a high degree of aggregation), interacts less with polyphenols than with gelatine with lower aggregation (for example from fish) that has more active groups available for interaction (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010).

Antioxidant activity of green tea, FRAP, ABTS and PCL assays are shown in Table 5. *Wu Lu Mountain* green tea has the highest antioxidant capacity (FRAP 188.48 mmol/L Fe²⁺, ABTS 15.98 mg/mL equiv. Vit C), while *China White Hair* green tea shows the lowest (FRAP 88.37 mmol/L Fe²⁺, ABTS 7.20 mg/mL equiv. Vit C and PCL 3.9 mg/mL equiv. Vit C). *Cinnamon Green Tea* showed the highest antioxidant activity determined by Photochem (19.0 mg/mL equiv. Vit C).

The degree of antioxidant capacity in green tea extracts is in accordance with the total polyphenol content determined by the Folin-Ciocalteu method, and confirmed by a high linear correlation obtained between the results ($r_{\text{FRAP}/\text{tpc}} = 0,983$, $r_{\text{ABTS}/\text{tpc}} = 0,926$, $r_{\text{PCL}/\text{tpc}} = 0,926$), which implies that the antioxidant potential of green tea is directly related to phenolic content. Toschi, Bordoni, Hrelia, Bendini, Lercker, and Biagi (2000) observed that the antioxidant activity of green tea in a lipid model system is higher in teas that contain larger quantities of EGCG and EGC. This is consistent with the present results, since the variety of tea with the most antioxidant activity; *Wu Lu Mountain* also possessed the most Epigallocatechin gallate and Epigallocatechin (Table 1). According to previous findings by Rice-Evans, Miller, and Paganga (1996) who studied the antioxidant activity of the polyphenolic constituents of green tea in relation to their relative compositions, the contribution to antioxidant effectiveness in green tea was in the following order: EGC \approx EGCG \gg ECG \approx EC $>$ C. The scavenging abilities of EGCG and ECG are stronger even if the steric hindrance of EGC, GC, EC and (+)-C is smaller than that of EGCG and GCG, indicating that the presence of a gallate group at the 3 position plays the most important role in their abilities to scavenge free radicals (Guo, Zhao, Shen, Hou, Hu, & Xin, 1999).

According to Pinelo, Manzocco, Nunez, and Nicoli, (2004), the increase in antioxidant capacity could be explained by the strong tendency of polyphenols to undergo polymerization reactions. When the degree of polymerization exceeds a critical value, increased molecular complexity and steric hindrance reduce the availability of hydroxyl groups in reactions with radicals, which causes a decrease in antiradical capacity. On the other hand, the interaction of polyphenols with proteins has been widely described and may result in decreased antioxidant potential. Arts *et al* (2002) indicated that the antioxidant activity of some components of green tea (and other teas) with casein and albumin is not additive, and a part of the total activity is masked due to interactions. The authors pointed out that the casein interaction (β , α and κ) showed a range of masking of antioxidant activity directly proportional to proline content.

The antimicrobial activity of the six green teas was tested on twenty microorganisms as described in the M&M section. In five cases the extracts were found to be antimicrobially active (Table 6). Some authors reported that aqueous extracts of green tea (varieties other than those studied) had antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Almajano, Carbó, Jiménez, & Gordon, 2008; Singh Arora, Jeet Kaur, & Kaur, 2009).

P. phosphoreum had the highest inhibition zone diameter in the presence of all tea extracts tested, and most of the time, *S. putrefaciens* was the second most sensitive strain in the presence of green tea. In contrast *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus* and *P. fluorescens*

were the least sensitive to the effects of *Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi* and *Cinnamon Green* teas. The results demonstrated that the infusions tested are more effective against some specific spoilage organisms of fish (López-Caballero *et al*, 2005). This fact is promising as tea extracts could help to increase the shelf life of fish. Microorganism sensitivity to polyphenols (Taguri, Tanaka, & Kouno, 2004) and tea extracts (Chou, Lin, & Chung, 1999) varies between species.

In general, *Japan Sencha Makinohara* was shown to be one of the most effective in terms of antimicrobial activity and *Wu Lu Mountain* the least. Apart from polyphenol antimicrobial activity (Arakawa, Maeda, Okubo, & Shimamura, 2004; Friedman, 2007), all of the other tea components also play a part. The chemical composition of the teas used in this study could help to explain this activity (Tables 1-5), differentiating not only between the different types of tea (green, black, etc.) but also between varieties of the same green tea. Among the six varieties studied, *Wu Lu Mountain* has a high concentration of flavanols, which translates into more antioxidant activity but not into greater antimicrobial activity (Tables 5-6). It may be that the differences in their chemical composition (different content of flavonols, carbohydrates and minerals in *Japan Sencha Makinohara* in comparison with *Wu Lu Mountain*), for example might influence their activity, since extracts are comparable because they are made in the same way. Moreover, as mentioned previously, protein-polyphenol interactions may modify the biological activity of the latter. In this regard, the antimicrobial effect of polyphenols (from green tea infusions) in the presence of whey proteins increased with the reduction of whey protein concentration (von Staszewski, Pilosof, & Jagus, 2011). These authors found that the effect of green tea polyphenols is concentration dependant and that the food matrix can decrease the antimicrobial performance of these compounds. In-depth studies are needed to clarify these issues.

On the other hand, it is important to note that green teas were inactive against the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains studied. These data results are interesting because some extracts rich in polyphenols have antimicrobial activity against a large number of strains, including those strains beneficial for the intestine. This fact has been reported by Almajano *et al*, (2008) because *Lactobacillus acidophilus* offers exceptional resistance to green tea infusions.

Table 7 shows the minimal inhibitory concentration. The data confirm that *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens* were more susceptible to the tea infusions because low tea concentrations could inhibit their growth. In contrast, higher concentrations of teas were necessary in some cases for the inhibition of *P. fluorescens*, *A. hydrophyla* and *V.*

parahaemolyticus (Table 7). The activity of phenolic compounds, corresponding to their chemical structure, appears to be associated with damage to the cytoplasmic membrane (Puupponen-Pimiä, Nohynek, Alakomi, & Oksman-Caldentey, 2005), among other factors, by reducing the pH gradient, thus acting as permeabilisers by inhibiting extracellular microbial enzymes, etc. In this respect, Arakawa et al. (2004) suggested that the bactericidal effect resulted from hydrogen peroxide levels produced by epigallocatechin gallate when reacting with the dissolved oxygen in aqueous solutions. No antimicrobial activity was detected in any commercial green tea extract against fish spoilage bacteria mentioned above (Corbo, Di Giulio, Conte, Speranza, Sinigaglia, & Del Nobile, 2009).

In order to compare the activity of the six varieties of green tea and to establish the differences between them, an analysis of principal components (PC) was carried out. Given the large number of variables and their overlap in the graphical representation of the new components, the variables were placed in three groups (flavonoids, amino acids and minerals), keeping all other variables constant.

Multivariate group analysis with flavonoids (including all variables except amino acids and minerals), showed two components explaining 38.4% and 30.9% of the variance, respectively. Total catechins, ECG and EGCG were grouped in the first component, while C, EC, EGC was weight distributed between the first and second components. Flavonols were clustered more heavily in the second dimension, except for hyperoside that was in the first. There are negatively correlated microorganisms, distributing their weight in both dimensions, except for *P. fluorescens* with most weight in PC 1. Measurements of antioxidant activity are grouped together and maintain a strong relationship with total catechins, but not flavonols.

The green teas under study were clearly differentiated by these variables distributed according to two dimensions. Tea 3 (*Cinnamon Green*) was associated with a higher content of flavonols, tea 5 (*China White Hair*) was the most active against *P. fluorescens*, tea 2 (*Japan Gyokuro Asahi*) was very active for the microorganisms near the graphical representation (e.g. *V. parahaemolyticus*) and tea 6 (*Wu Lu Mountain*) was characterized by a higher content of EGCG and total catechins.

Multivariate group analysis including all variables except the individual flavonoids and minerals showed that the first two components explain 77.2% and 9.5% respectively of the variance. Most amino acids are explained in the first component, producing a strong positive correlation with the total content of catechins and negative microorganisms. The flavonols have greater weight in the second component, which also shows a correlation with certain

microorganisms such as *S. putrefaciens*. The antioxidant activities were positively correlated in both components, with high weight in PC1. Again, the teas are fully differentiated. Tea 3 (*Cinnamon Green Tea*) and 6 (*Wu Lu Mountain*) have higher levels of amino acids and polyphenols, both catechins and flavonols and higher antioxidant activity. This suggests that either antioxidant activity is not diminished by the presence of amino acids, or that there might not be any interaction between both compounds.

PC of the variables tested, except for individual flavonoids and amino acids showed that the first two components explain 39.8% and 30.2% of the variance, respectively. Catechin content and antioxidant activity are strongly and positively correlated in PC 1 but negatively correlated with minerals. Minerals in general are correlated most positively for the PC2, along with most of the organisms, indicating that minerals can promote in some way the inhibition of microorganisms, eg. *S. putrefaciens* in the presence of Ca and Na. Teas are also completely different in the plot, with Cinnamon Green tea (tea 3) and Wu Lu Mountain (tea 6), registering the lowest mineral content.

4. CONCLUSIONS

In summary, the comparison ratios of the six selected kinds of green tea revealed that varieties differed in terms of chemical composition and properties, and the bioactive properties of extracts were not related to each other. Therefore the biological properties of the teas can be defined as the combination of all these individual components working together in unison. The teas with higher antioxidant activity, *Cinnamon Green* tea and *Wu Lu Mountain*, are characterized by higher total catechin, flavonol and amino acid content and lower mineral and medium carbohydrate content. However, with regard to antimicrobial activity, there was no marked difference between any of the varieties. The lowest antioxidant activity corresponded to the *China White Hair* variety, which was also characterized by the lowest total catechin and amino acid content, medium flavonol and low mineral and carbohydrate content. Nevertheless, *China White Hair* had a higher inhibition capacity against some microorganisms than other varieties of tea with higher levels of polyphenols. *Japan Makinohara Sencha* exhibited the greatest antimicrobial activity, whereas little differentiation of antimicrobial activity was observed for the other varieties. The fact that some spoilage organisms were sensitive to green tea was a promising development in terms of food preservation, and future research on how to confer stability to food by the incorporation of such tea extracts might prove beneficial.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by Ministerio de Ciencia e Innovación under project AGL2008-00231/ALI. Programs JAE-CSIC predoctoral and Ángeles Alvariño, Xunta de Galicia (European Social Fund), are fully acknowledged.

ICTAN-CSIC has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the requirements of the ISO standard 9001:2000.

References

- Alcázar, A., Ballesteros, O., Jurado, J. M., Pablos, F., Martín, M. J., Vilches, J. L., & Navalón, A. (2007). Differentiation of green, white, black, Oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(15), 5960-5965.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, *108*(1), 55-63.
- Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S., & Shimamura, T. (2004). Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(3), 277-281.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H. P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*(5), 1184-1187.
- Benzie, I. F. F., Chung, W. Y., & Strain, J. J. (1999). "Antioxidant" (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J. Nutr. Biochem.*, *10*, 146-150.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76.
- Bolling, B. W., Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. B. (2009). Tea and health: Preventive and therapeutic usefulness in the elderly? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *12*(1), 42-48.
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea - A review. *Journal of the American College of Nutrition*, *25*(2), 79-99.
- Corbo, M. R., Di Giulio, S., Conte, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2009). Thymol and modified atmosphere packaging to control microbiological spoilage in packed fresh cod hamburgers. *International Journal of Food Science and Technology*, *44*(8), 1553-1560.

- Costa, L. M., Gouveia, S. T., & Nobrega, J. A. (2002). Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. *Anal. Sci.*, *18*(3), 313-318.
- Chen, H., Zhang, M., & Xie, B. (2005). Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chemistry*, *90*(1-2), 17-21.
- Chen, R., Wang, J. B., Zhang, X. Q., Ren, J., Zeng, C. M. (2011). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (ECGC) induced intermolecular cross-linking of membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *507*(2), 343-349.
- Chiu, P. E., & Lai, L. S. (2010). Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum coatings containing green tea extracts in fruti-based salads, romaine hearts and pork slices. *International Journal of Food Microbiology*, *139*(1-2), 23-30.
- Chou, C. C., Lin, L. L., & Chung, K. T. (1999). Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*, *48*(2), 125-130.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E. J., Brighenti, F., & Crozier, A. (2004). HPLC-MSⁿ Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(10), 2807-2815.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, *28*, 350-356.
- Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *12*(7), 404-421.
- Fernández, P. L., Pablos, F., Martín, M. J., & González, A. G. (2002). Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, *76*(4), 483-489.
- Fernandez-Caceres, P. M. J., Martin, M.P., & Gonzalez, A.G. (2001). Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4775-4779.
- Finger, A., Engelhardt, U. H., & Wray, W. (1991). Flavonol triglycosides containing galactose in tea. *Phytochemistry*, *30*(6), 2057-2060.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*(1), 116-134.

- Gallaher, R. N., Gallaher, K., Marshall, A. J., & Marshall, A. C. (2006). Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(Supplement 1), S53-S57.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350.
- Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J., & Xin, W. (1999). ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1427(1), 13-23.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (1995). Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis L.*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11), 2375-2377.
- Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., & Kumazawa, S. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(10), 1384-1394.
- Isiguki, K., Takakuwa, T., & Takeo, T. (1991). Anti-diabetics mellitus effect of water-soluble tea polysaccharide. In *Proceedings of International Symposium on Tea Science*. Shizuka, Japan: The Organizing Committee of ISTS. 240-241.
- Ito R., Yamamoto, A., Kodama, S., Kato, K., Yoshimura Y., Matsunaga, A., & Nakazawa H. (2003). A study of the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chemistry*, 83(4), 563-568.
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganić, K. K., & Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43(1), 167-176.
- Lin, L. Z., Chen, P., & Harnly, J. M. (2008). New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8130-8140.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- Musa Özcan, M., Ünver, A., Uçar, T., & Arslan, D. (2008). Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chemistry*, 106(3), 1120-1127.

- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, *153*, 375-380.
- Paleg, L. G. (1959). Citric acid interference in the estimation of reducing sugars with alkaline copper reagents. *Analytical Chemistry*, *31*, 1902-1904.
- Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, *96*(4), 597-605.
- Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwar, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A. L., Beecher, G., & Aladesanmi, J. (2005). Major flavonoids in dry tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*(6) 487-501.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(5), 1177-1180.
- Poncet-Legrand, C., Edelman, A., Putaux, J. L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, *20*(5), 687-697.
- Popov, I., & Lewin, G. (1999). Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods in Enzymology*, *300*(Oxidants and Antioxidants, Part B), 437-456.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H. L., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *67*(1), 8-18.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.
- Reto, M., Figueira, M. E., Filipe, H. M., & Almeida, C. M. M. (2007). Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition*, *62*(4), 139-144.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933-956.

- Sharma, V., Gulati, A., & Ravindranath, S. D. (2005). Extractability of tea catechins as a function of manufacture procedure and temperature of infusion. *Food Chemistry*, 93(1), 141-148.
- Singh Arora, D., Jeet Kaur, G., & Kaur, H. (2009). Antibacterial activity of tea and coffee: Their extracts and preparations. *International Journal of Food Properties*, 12(2), 286-294.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Syu, K. Y., Lin, C. L., Huang, H. C., & Lin, J. K. (2008). Determination of theanine, GABA, and other amino acids in green, oolong, black, and Pu-erh teas with dabsylation and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7637-7643.
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 1965-1969.
- Toschi, T. G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G., & Biagi, P. L. (2000). The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3973-3978.
- Vinson, J. A., & Dabbagh, Y. A. (1998). Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, 18(6), 1067-1075.
- von Staszweski, M., Pílosof, A. M. R., & Jagus, R. J. (2011). Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 125(1), 186-192.
- Wang, D., Zhou, X., Li, L., Hou, Y., Sun, J., & Wang, J. (2008). A rapid quantitative method for polysaccharides in green tea and oolong tea. *European Food Research and Technology*, 226(4), 691-696.
- Wang, K., & Ruan, J. (2009). Analysis of chemical components in green tea in relation with perceived quality, a case study with Longjing teas. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2476-2484.
- Wang, L., Xu, R., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Tu, Y., & Zeng, X. (2010). Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123(4), 1259-1266.

- Weisburger, J. H., & Chung, F. L. (2002). Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(8), 1145-1154.
- Yao, L., Liu, X., Jiang, Y., Caffin, N., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., & Xu, Y. (2006). Compositional analysis of teas from Australian supermarkets. *Food Chemistry*, *94*(1), 115-122.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., & Xu, Y. (2004). HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, *84*(2), 253-263.

Tables

- Table 1. Content of the catechins, flavonols and total phenolics in aqueous extracts of green tea.
- Table 2. Content of Reducing Sugar and Total Carbohydrates in aqueous extracts of green tea.
- Table 3. The mineral content in aqueous extracts of green tea.
- Table 4. The amino acids content in aqueous extracts of green tea.
- Table 5. Antioxidant activity in aqueous extracts of green tea evaluated by using ABTS, FRAP and Photochemiluminescence assay.
- Table 6. Antimicrobial activity in aqueous extracts of green tea on different microorganism.
- Table 7. Minimum inhibitory concentrations expressed in volume of aqueous extract of green tea/100 mL of dissolution.

Table 1. Content of the catechins, flavonols and total phenolics in aqueous extracts of green tea.

	<i>Japan Sencha Makinohara</i>	<i>Japan Gyokuro Asahi</i>	<i>Cinnamon Green Tea</i>	<i>Lung Ching</i>	<i>China White Hair</i>	<i>Wu Lu Mountain</i>
Total polyphenols¹	6402.7 ± 63.5 ^b	7139.7 ± 318.0 ^c	9770.0 ± 112.6 ^d	6695.0 ± 248.2 ^{bc}	4711.7 ± 286.4 ^a	9339.3 ± 169.8 ^d
(-)-Epigallocatechin	1829.0 ± 21.6 ^b	2036.4 ± 28.0 ^c	1235.7 ± 19.7 ^a	1718.7 ± 93.5 ^b	1160.5 ± 28.6 ^a	2758.0 ± 78.8 ^d
(+)-Catechin	53.0 ± 1.4 ^a	89.2 ± 2.9 ^c	77.6 ± 2.0 ^b	51.2 ± 0.4 ^a	105.7 ± 1.2 ^d	47.5 ± 1.4 ^a
(-)-Epicatechin	829.0 ± 30.6 ^{cd}	1031.0 ± 0.6 ^e	784.3 ± 7.6 ^{bc}	648.6 ± 19.3 ^a	723.3 ± 26.6 ^b	857.9 ± 14.0 ^d
(-)-Epicatechin-3-gallate	440.2 ± 9.9 ^a	749.1 ± 12.5 ^d	997.3 ± 10.6 ^f	543.8 ± 1.3 ^b	642.5 ± 4.7 ^c	786.1 ± 1.0 ^e
(-)-Epigallocatechin gallate	3541.6 ± 42.2 ^b	4017.4 ± 156.2 ^c	5515.9 ± 38.3 ^e	4491.9 ± 164.5 ^d	2729.2 ± 132.6 ^a	6817.7 ± 86.2 ^f
Total Catechins (flavan-3-ol)	6761.9 ± 105.7 ^b	7986.0 ± 200.2 ^d	8610.8 ± 78.2 ^e	7454.2 ± 279.0 ^c	5361.4 ± 193.7 ^a	11268.1 ± 181.4 ^f
Rutin	66.5 ± 1.5 ^d	54.8 ± 3.0 ^c	55.3 ± 0.4 ^c	23.2 ± 1.0 ^a	54.0 ± 0.5 ^c	49.1 ± 0.3 ^b
Hyperoside	15.2 ± 0.5 ^a	29.8 ± 0.5 ^c	31.4 ± 1.1 ^c	23.3 ± 0.0 ^b	21.7 ± 0.4 ^b	39.8 ± 0.5 ^d
Quercetin-3-O-glucoside	33.2 ± 0.4 ^b	43.0 ± 1.9 ^{cd}	45.6 ± 1.6 ^d	18.7 ± 0.5 ^a	40.1 ± 0.5 ^c	31.5 ± 0.2 ^b
Kaempferol-3-O-rutinoside	49.2 ± 1.0 ^d	32.7 ± 1.0 ^c	67.4 ± 2.5 ^e	10.4 ± 0.2 ^a	29.4 ± 0.6 ^{bc}	26.7 ± 0.8 ^b
Kaempferol-3-O-glucoside	35.2 ± 1.0 ^c	21.0 ± 1.0 ^b	36.7 ± 1.6 ^c	9.2 ± 0.5 ^a	20.7 ± 0.1 ^b	19.9 ± 0.4 ^b
Total Flavonols	199.3 ± 4.4 ^d	181.3 ± 7.4 ^c	236.6 ± 7.2 ^e	84.7 ± 2.2 ^a	165.9 ± 2.0 ^b	167.1 ± 2.2 ^b

¹Total phenolic is expressed as equivalents of gallic acid (mg/L).

Content of polyphenols are expressed as mg/L.

Different superscript letters, in each row, express significant ($p < 0.05$) differences among results. Values are mean ± standard deviation ($n = 3$).

Table 2. Content of Reducing Sugar and Total Carbohydrates in aqueous extracts of green tea.

	Japan Sencha Makinohara	Japan Gyokuro Asahi	Cinnamon Green Tea	Lung Ching	China White Hair	Wu Lu Mountain
Total Carbohydrates	4.13 ± 0.10 ^d	1.75 ± 0.07 ^a	4.36 ± 0.03 ^b	5.32 ± 0.16 ^e	2.60 ± 0.64 ^b	3.22 ± 0.13 ^c
Reducing Sugars	7.50 ± 0.24 ^c	7.64 ± 0.23 ^c	10.06 ± 0.22 ^d	6.21 ± 0.23 ^b	4.33 ± 0.23 ^a	11.41 ± 0.83 ^e

Content of reducing sugar and total carbohydrates are expressed as equivalents of glucose mg/mL.

Different superscript letters, in each row, express significant ($p < 0.05$) differences among results. Values are mean ± standard deviation ($n = 3$).

Table 3. The mineral content in aqueous extracts of green tea.

	Japan Sencha Makinohara	Japan Gyokuro Asahi	Cinnamon Green Tea	Lung Ching	China White Hair	Wu Lu Mountain
Ca	0.86 ± 0.00 ^f	0.53 ± 0.00 ^a	0.65 ± 0.00 ^c	0.84 ± 0.00 ^e	0.57 ± 0.00 ^b	0.70 ± 0.00 ^d
Mg	7.29 ± 0.01 ^b	8.30 ± 0.01 ^d	7.62 ± 0.02 ^c	8.94 ± 0.01 ^f	8.74 ± 0.02 ^e	6.34 ± 0.03 ^a
Na	0.22 ± 0.00 ^d	0.20 ± 0.00 ^c	0.24 ± 0.00 ^e	0.29 ± 0.00 ^f	0.18 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.00 ^a
K	108.50 ± 0.50 ^c	113.17 ± 0.95 ^d	90.33 ± 0.38 ^a	100.92 ± 0.38 ^b	100.92 ± 0.76 ^b	89.17 ± 0.63 ^a
Zn	0.12 ± 0.00 ^b	0.14 ± 0.00 ^f	0.10 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.00 ^c	0.13 ± 0.00 ^d	0.13 ± 0.00 ^e
Mn	2.73 ± 0.02 ^d	1.71 ± 0.00 ^a	2.06 ± 0.01 ^b	3.57 ± 0.01 ^f	2.74 ± 0.02 ^d	2.18 ± 0.02 ^c
Fe	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Cu	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Totals	119.72	124.05	101	114.68	113.28	98.63

The mineral content is expressed as mg/100 mL.

Different superscript letters, in each row, express significant ($p < 0.05$) differences among results. Values are mean ± standard deviation ($n = 3$).

Table 4. The amino acids content in aqueous extracts of green tea.

	Japan Sencha Makinohara	Japan Gyokuro Asahi	Cinnamon Green Tea	Lung Ching	China White Hair	Wu Lu Mountain
Asp	1331.00	1674.40	2354.39	1836.78	1132.71	2330.55
Thr	187.19	238.24	367.95	271.59	167.74	352.69
Ser + theanine	259.51	418.26	539.46	420.36	287.39	581.09
Glu	7281.43	7727.27	8517.19	6041.16	6083.38	10656.83
Gly	214.49	279.26	310.29	264.25	163.93	432.76
Ala	127.27	178.18	239.55	197.78	118.18	272.51
Cys	39.56	63.00	45.77	46.04	29.67	61.76
Val	227.13	281.16	476.41	353.79	205.61	372.12
Met	85.26	65.65	46.42	74.61	24.36	102.40
Ile	99.05	146.91	215.70	194.13	77.63	195.47
Leu	99.05	162.65	230.28	228.24	93.69	272.63
Tyr	62.86	108.71	136.90	134.08	70.26	152.77
Phe	171.93	231.27	462.53	297.34	171.93	301.23
His	44.33	71.37	106.89	93.10	53.83	146.03
Lys	146.19	257.29	399.59	318.69	173.04	427.10
Arg	266.63	376.27	402.60	306.59	618.59	1301.38
Pro	102.91	171.08	280.15	216.90	117.24	235.68
Total amino acids¹	10.75	12.45	15.13	11.30	9.59	18.19

Content of aminoacids are expressed as µg/mL.

¹Total Protein is expressed as mg/mL.

Table 5. Antioxidant activity in aqueous extracts of green tea evaluated by using ABTS, FRAP and Photochemiluminescence assay.

	<i>Japan Sencha Makinohara</i>	<i>Japan Gyokuro Asahi</i>	<i>Cinnamon Green Tea</i>	<i>Lung Ching</i>	<i>China White Hair</i>	<i>Wu Lu Mountain</i>
FRAP¹	122.86 ± 1.43 ^b	141.73 ± 0.57 ^c	177.33 ± 0.66 ^d	124.30 ± 1.02 ^b	88.37 ± 2.89 ^a	188.48 ± 4.09 ^e
ABTS²	12.54 ± 0.44 ^c	10.51 ± 0.51 ^b	14.97 ± 0.39 ^d	10.77 ± 0.13 ^b	7.20 ± 0.13 ^a	15.98 ± 0.39 ^e
Photochem³	9.62 ± 0.05 ^d	7.68 ± 0.04 ^c	19.04 ± 0.09 ^f	5.19 ± 0.01 ^b	3.93 ± 0.02 ^a	14.86 ± 0.07 ^e

¹ FRAP, values are expressed as equivalents of Fe²⁺ (mmol/L).

^{2,3} ABTS and photochem, values are expressed as equivalents of vitamin C (mg/mL).

Different superscript letters, in each row, express significant (p < 0.05) differences among results. Values are mean ± standard deviation (n = 3).

Table 6. Antimicrobial activity in aqueous extracts of green tea on different microorganism.

	Antimicrobial activity (inhibition zone diameter mm)					
	Japan Sencha Makinohara	Japan Gyokuro Asahi	Cinnamon Green Tea	Lung Ching	China White Hair	Wu Lu Mountain
<i>V. parahaemolyticus</i>	10.67 ± 0.58 ^{a/BC}	11.00 ± 0.00 ^{a/C}	9.33 ± 0.58 ^{a/A}	9.67 ± 0.58 ^{a/AB}	10.67 ± 0.58 ^{ab/BC}	10.00 ± 0.00 ^{b/ABC}
<i>P. fluorescens</i>	11.67 ± 0.58 ^{a/AB}	11.33 ± 0.58 ^{a/AB}	10.33 ± 0.58 ^{a/b/A}	11.67 ± 0.58 ^{b/AB}	12.00 ± 0.00 ^{c/B}	10.33 ± 0.58 ^{b/A}
<i>A. hydrophila</i>	12.33 ± 1.15 ^{a/C}	10.67 ± 0.58 ^{a/B}	10.33 ± 0.58 ^{a/b/B}	10.00 ± 0.00 ^{a/B}	10.00 ± 0.00 ^{a/B}	7.67 ± 0.58 ^{a/A}
<i>S. putrefaciens</i>	14.33 ± 0.58 ^{b/C}	11.33 ± 0.58 ^{a/AB}	11.67 ± 0.58 ^{b/C/B}	12.00 ± 0.00 ^{b/B}	11.00 ± 0.00 ^{b/AB}	10.33 ± 0.58 ^{b/A}
<i>P. phosphoreum</i>	14.83 ± 0.29 ^{c/C}	13.83 ± 0.29 ^{b/B/C}	13.00 ± 0.00 ^{c/AB}	12.33 ± 1.15 ^{b/AB}	12.33 ± 0.58 ^{c/AB}	11.33 ± 0.58 ^{b/A}

Different letters a, b... in the same column indicate significant differences among the different microorganisms for the same tea. Different letters A, B... in the same row indicate significant differences among the different tea for the same microorganisms. Values are mean ± standard deviation (n = 3).

Table 7. Minimum inhibitory concentrations expressed in volume of aqueous extract of green tea/100 mL of dissolution.

	Minimal inhibitory concentration determination (% v/v)						
	Japan Sencha	Makinohara	Japan Gyokuro Asahi	Cinnamon Green Tea	Lung Ching	China White Hair	Wu Lu Mountain
<i>V. parahaemolyticus</i>	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 60	> 40
<i>P. fluorescens</i>	> 60	> 80	> 80	> 80	> 40	> 60	> 60
<i>A. hydrophila</i>	> 40	> 60	> 60	> 40	> 40	> 60	> 60
<i>S. putrefaciens</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 20	> 20	> 20
<i>P. phosphoreum</i>	> 20	> 20	> 20	> 20	> 10	> 20	> 20

ARTÍCULO 4

Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E y Montero, P. (2012)

Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract

Food Hydrocolloids

RELEASE OF ACTIVE COMPOUNDS FROM AGAR AND AGAR-GELATIN FILMS WITH GREEN TEA EXTRACT

Giménez, B. *, López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M.E, and Montero, P.

Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) CSIC**, C/ José Antonio Novais,
10, 28040 Madrid, Spain

* Corresponding author: Giménez, B. (bgimenez@ictan.csic.es). Tel.: +34 91 5492300; fax: +34
91 5493627.

** This centre has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the
requirements of the ISO standard 9001:2000.

ABSTRACT

Active biodegradable films based on agar and agar-fish gelatin were developed by the incorporation of green tea aqueous extract to the film forming solution. The effect of the partial replacement of agar by fish skin gelatin as well as the addition of the green tea extract on the physical properties of the resultant films was evaluated. Special attention was given to the release of antioxidant and antimicrobial compounds from the agar film matrices with and without gelatin. Agar-gelatin films were less resistant and more deformable than agar films. The inclusion of green tea extract decreased tensile strength and elongation at break in both agar and agar-gelatin films. Water vapour permeability and water resistance was not affected either by the replacement of agar by gelatin or the addition of green tea extract, but the water solubility noticeably increased in the films containing green tea extract. The presence of gelatin in the agar-green tea matrix film hindered the release of total phenolic compounds, catechins and flavonols in water. As a consequence, the antioxidant power released by the films was lower in the case of films containing gelatin. However, the antimicrobial activity of the films was not affected by the presence of gelatin.

Keywords

Agar, fish gelatin, green tea, films, antioxidant, antimicrobial.

1. INTRODUCTION

Nowadays there is an increasing interest to find biodegradable packaging materials for environmental concerns over the nonbiodegradable petrochemical-based plastics (Tharanathan, 2003). These biopolymers come from recycling material or renewable sources, and mainly include naturally occurring polysaccharides and proteins from plant and animal origin, as well as those synthesized chemically from naturally derived monomers such as lactic acid (Bordes, Pollet & Avérous, 2009).

Regarding polysaccharides, their wide variety of structures gives films with a wide range of properties. Agar is a fibrous polysaccharide extracted from marine algae such as *Gelidium* sp. and *Gracilaria* sp., consisting in a mixture of agarose and agarpectin, which is slightly branched and sulfated (Rhim, Lee & Hong, 2011). This thermoplastic, biodegradable and biocompatible polysaccharide has shown high mechanical strength with moderate water resistance as packaging material (Freile-Peigrín, Madera-Santana, Robledo, Veleza, Quintana & Azamar, 2007; Phan, Debeaufort, Luu & Voilley, 2005; Phan et al., 2008; Wu, Geng, Chang, Yu & Ma, 2009); and has been used in blends with other biopolymers such as starch, soy or milk protein to improve the mechanical and water barrier properties (Wu et al., 2009; Tian, Xu, Yang & Guo, 2011; Letendre, D'Aprano, Lacroix, Salmieri, Sr-Gelais, 2002). Gelatin has been known to form clear, flexible, strong and oxygen-impermeable films (Zhao, Torley & Halley, 2008). In comparison with agar, gelatins, and especially fish gelatins, usually yield weaker but more deformable films. Composite films have also been prepared from fish gelatin and different polysaccharides such as pectin or chitosan, seeking to improve the physical properties of these edible films (Liu, Liu, Fishman & Hicks, 2007). However, to our knowledge, no much work has been done on agar/gelatin blends (Hong, Lim & Song, 2009; Jang, Lim & Song, 2010).

A number of recent studies have dealt with extending the functional properties of biodegradable films by adding different compounds with antioxidant or antimicrobial activities in order to yield a biodegradable active packaging material. Due to safety concerns associated to synthetic active compounds, extensive research has been performed to seek natural active compounds as alternative to synthetic ones (Kim, Ko, Lee, Park, & Hanna, 2006; Ku & Song, 2007; Oussalah, Caillet, Salmiéri, Saucier, & Lacroix, 2004; Seydim & Sarikus, 2006; Zivanovic, Chi, & Draughon, 2005; Giménez, Gómez-Guillén, López-Caballero, Gómez-Estaca & Montero, 2012). Green tea (*Camellia sinensis* L.) is a source of polyphenolic compounds having strong

antioxidant and antimicrobial activity (Chan, Lim, & Chew, 2007; Almajano, Carbó, Jiménez, & Gordon, 2008). Catechins are the major polyphenols in tea leaves. Besides flavanols, various flavonols and flavones are also present in tea leaves (Chan et al., 2007; Yilmaz, 2006). Green tea polyphenols have been reported to act as antioxidants by donation of hydrogen atoms, acceptors of free radicals, interrupters of chain oxidation reactions or by chelating metals (Gramza & Korczak, 2004), and they have shown inhibitory effects *in vitro* against food spoilage and pathogenic microorganisms (Hamilton-Miller, 1995; Perumalla & Hettiarachchy, 2011). Furthermore, green tea extract has been already incorporated in food products to extend its shelf life (Martín-Diana, Rico & Barry-Ryan, 2008; Wanasundara & Shahidi, 1998; Gramza-Michalowska & Regula, 2007), and more recently it has been used as active compound in packaging films (Chiu & Lai, 2010; Siripatrawan & Noipha, 2012; López-de-Dicastillo, Nerín, Alfaro, Catalá, Gavara & Hernández-Muñoz, 2011). However, the successful use of green tea extract as source of antioxidant and antimicrobial compounds in packaging films greatly depends on the ability of these compounds to migrate from the film matrix to the food. The release of active compounds from polymeric matrices is influenced mainly by the properties of both the polymer and the active compound as well as the characteristics of the food product (López-de Dicastillo et al., 2011).

The objective of this study was to evaluate the release of antioxidant and antimicrobial compounds from agar and agar-gelatin biodegradable films containing green tea extract as active compound, as well as the effect of the incorporation of both gelatin and green tea extract on the physical properties of agar films.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Agar was supplied by Hispanagar (Goldagar, Burgos, Spain). Glycerol was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Fish skin gelatin, mainly obtained from warm water species (Bloom 265/285), was acquired from Rousselot SAS (Courbevoie, France). The standard polyphenol compounds were purchased from Extrasynthese (Genay, Cedex, France): (-)-epigallocatechin (CAS: 970-74-1), (+)-catequin (CAS:154-23-4), (-)-epicatequin (CAS: 490-46-0), (-)-epicatechin-3-gallate (CAS: 1257-08-5), (-)-epigallocatechin gallate (CAS: 989-51-5), rutin (CAS: 153-18-4), hyperoside (CAS: 482-36-0), quercetin-3-*O*-glucoside (CAS: 482-35-9), kaempferol-3-*O*-rutinoside (CAS: 17650-84-9), kaempferol-3-*O*-glucoside (CAS: 480-10-4). Acetonitrile (HPLC grade) and formic acid were supplied by VWR International (Barcelona, Spain). The reagents

used for determination of total phenolic compounds (Folin-Ciocalteu, gallic acid) and antioxidant activity (2,4,6-tripyridyl-s-triazine, FeCl_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]), potassium persulphate, vitamin C) were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2. Green tea extract

Chinese green tea known as *Wu Lu Mountain* (*Camellia sinensis* L.) was purchased from a local specialized tea store (Madrid, Spain). The dry green tea was ground into powder using a blender (Oster, Madrid, Spain). The powder (35 g) was mixed with miliQ water (350 ml) and heated at 80 °C for 30 min with continuous stirring. The slurry was centrifuged at 12000 g for 10 min at 5 °C. The decanted supernatant was filtered twice through Whatman nº 1. The filtered extract was stored at -20 °C until preparation of the films.

2.3. Preparation of films

Agar film forming solution (control, C) was prepared by dissolving agar (1.5 g/100 ml) in distilled water. Agar films containing green tea extract (CT) were obtained by dissolving agar (1.5 g/100 ml) in a 50/50 v/v mixture of distilled water and green tea extract. Agar was replaced (33%) by fish skin gelatin to obtain agar-gelatin and agar-gelatin-tea films (CG and CGT, respectively). Glycerol was used as plasticizer (66% w/w of agar powder). The mixtures were stirred to obtain a good blend, and the films made by casting 40 ml on 144 cm²-square plates, drying afterwards at 40 °C in a forced-air oven for 16-18h to yield a uniform thickness in all cases [200 µm ($p \leq 0.05$)]. Films were conditioned in desiccators for 2 days at 22 °C at 58% relative humidity.

2.4. Characterization of the films

2.4.1. Mechanical properties

Tensile strength (TS) and elongation at break (EB) of the films were determined using a TA.XT. plus Texture Analyser (SMS, Surrey, UK), as described by Núñez-Flores Giménez, Fernández-Martín, López-Caballero, Montero and Gómez-Guillén (2012).

2.4.2. Water solubility

Pieces of films were weighed (~300 mg) and placed in beakers with 40 ml of distilled water during 16 h at 22 °C. At 15 min, 90 min and 16 h, the solution was filtered through Whatman no.1 filter paper to recover the remaining undissolved film, which was desiccated at 105 °C for 24 h. Film solubility was calculated at each time by the equation $FS (\%) = ((W_o - W_f) / W_o) \cdot 100$, where W_o was the initial weight of the film expressed as dry matter and W_f was the weight of the undissolved desiccated film residue. All tests were carried out in triplicate.

2.4.3. Water resistance

Films were fixed onto the opening of calibrated cells (area 15.90 cm²) and the cells were placed in desiccators with distilled water. Distilled water (5 ml) was poured over the film surface. The film deformation (cm), the time when the water filtration started (h) and the broken time (h) were monitored during 15 days. All tests were carried out at least in triplicate.

2.4.4. Water vapour permeability

Water vapour permeability (WVP) was determined following the gravimetric method described by Núñez-Flores et al. (2012). All tests were carried out at least in triplicate. Results were expressed as $g \cdot mm \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2} \cdot Pa^{-1}$.

2.5. Release of phenolic compounds and antioxidant activity in water

Aliquots of the filtrates obtained from the determination of the film water solubility at 15 min, 90 min and 16 h were used as samples to analyze the release of both phenolic compounds and the antioxidant capacity from the film matrix.

2.5.1. Determination of total phenolic compounds

The total phenolic compounds released from the film matrix at 15 min, 90 min and 16 h was determined spectrophotometrically in triplicate using gallic acid as a standard according to a modified method of (Slinkard & Singleton, 1977) with the Folin-Ciocalteu's reagent. An aliquot of 20 µL of sample was mixed with 1.58 ml of distilled water and oxidized with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent sample. The reaction was neutralized with 300 µL of sodium carbonate solution and incubated for 2 h at room temperature. The absorbance of the

resulting blue colour was measured at 765 nm (UV-1601, model CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japan). Total phenolic content was expressed as mg gallic acid (GA) equivalent/g of film.

2.5.2. Quantification by HPLC-MS

Reverse phase high performance liquid chromatography was performed to analyse phenolic compounds released from the film matrix at 15 min, 90 min and 16 h. The separation module consisted of an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a C18 size column (250 x 4.6 mm, 5 μ m, C18 Tracer Excel ODS-A column, Teknokroma) and a diode array detector (DAD). The samples were eluted with a gradient system consisting of solvent A (deionized water) and solvent B (acetonitrile) both containing 1% formic acid, used as the mobile phase, with a flow rate of 1 ml/min. The temperature of the column was maintained at 25 °C and the injection volume was 20 μ L. The gradient system started at 90% solvent A and decreased to 74% A within 40 min, followed by a decreased to 35% solvent A in 10 min. The final conditions were held for an additional 5 min. The peaks of the phenolic compounds were monitored by atmospheric pressure electrospray ionization (ESI) source, operated in negative ion mode, with the electrospray capillary voltage set to 3000 V, a nebulizing gas flow rate 12 L/h, and a drying temperature of 350 °C. Mass spectrometry data were acquired in the scan mode (mass range m/z 200-700) and in the sim mode (m/z 289, 305, 441, 441, 447, 457, 609). The quantification was carried out using solutions of each standard at various concentrations. Individual compounds were quantified using a calibration curve of the corresponding standard compound. All analyses were performed in triplicate.

2.5.3. Antioxidant activity

The antioxidant activity released from the matrices containing tea extract after 15 min, 90 min and 16 h in water was monitored by both FRAP and ABTS assays. The method used for the FRAP and ABTS assays was previously described by Gómez-Estaca, Giménez, Montero and Gómez-Guillén (2009). The results were expressed as μ mol equivalents of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per g of film for FRAP and mg of Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) per g of film for ABTS, based on standard curves previously prepared for both compounds.

2.5.4. Antimicrobial properties

The antimicrobial activity of the films composed of agar, gelatin, tea and their respective blends was determined by the diffusion method in agar as previously described (Gómez-

Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén & Montero, 2010). Discs of 1.5 cm diameter, made of film with different formulations, were placed on the surface of agar plates previously inoculated with each of the selected microorganisms. The activity was tested against 26 microbial strains selected because of its importance in health (such as probiotics or pathogens) or for being responsible for food spoilage. Strains were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Aspergillus niger* CECT 2088, *Bacillus cereus* CECT 148, *Bacillus coagulans* CECT 561, *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* DSMZ 10140, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 10140, *Brochothrix thermosphacta* CECT 847, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Clostridium perfringens* CECT 486, *Debaryomyces hansenii* CECT 11364, *Enterococcus faecium* DSM 20477, *Escherichia coli* CECT 515, *Lactobacillus acidophilus* CETC 903, *Lactobacillus helveticus* DSM 20075, *Listeria innocua* CECT 910, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Penicillium expansum* DSMZ 62841, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Shigella sonnei* CECT 4887, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T and *Yersinia enterocolitica* CECT 4315. After incubation, the inhibition zone -considered the antimicrobial activity- was measured with Adobe Acrobat software ver. 7. Results were expressed as zone of growth inhibition respecting to the total plate surface. Each determination was performed in duplicate.

2.6. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the SPSS computer program (SPSS Statistical Software Inc., Chicago, IL, USA). One-way analysis of variance was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$. Pearson correlation among variables was performed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of the films

3.1.1. Mechanical properties of the films

Tensile strength (TS) and elongation at break (EB) of the control films (C) obtained in this study were 18.48 MPa and 62.35%, respectively (Table 1). The mechanical properties reported

in the literature for agar-based films are variable, mainly attributed to the different amounts of both polymer and plasticizers used in the film formulation. Usually, the higher the polymer content in the film forming solution the higher the resistance of the films; whereas the plasticizer content is directly related to the film deformation. Ku, Hong & Song (2008) obtained edible films from agar-rich red algae (*Gelidium corneum*) powder (1.5%) with poor mechanical properties (TS 2.32 MPa; EB 28.96%), probably due to the fact that they used nonpurified polymer. Phan et al. (2005) and Phan, Debeaufort, Voilley and Luu (2009) reported TS and EB values of 42.11 MPa and 3.27%, respectively, for 3% agar-based films plasticized with 15% glycerol. Furthermore, the TS and EB values obtained by Rhim et al. (2011) for 2.66% agar films containing 50% glycerol as plasticizer were 29.7 MPa and 45.3%, respectively.

Agar has been used in blends with other biopolymers such as potato starch or soy protein to improve the mechanical properties of the films (Tian et al., 2011; Wu et al., 2009). Agar may act as a reinforcing agent and forms a compact and homogeneous three-dimensional network gel prior to setting of the film (Tian et al., 2011; Phan et al., 2005; Wu et al., 2009). When 33% of agar was replaced by fish skin gelatin in the film formulation to obtain CG films, the TS slightly decreased and the EB increased ($p \leq 0.05$). The mechanical properties of blend films are highly associated with the nature of film-forming materials, their interactions as well as the processing methods (Tian et al., 2011). In comparison with agar, gelatins, and especially fish gelatins, usually yield weaker but more deformable films. Giménez et al. (2012) reported TS and EB as 5.57 MPa and 338%, respectively, for fish skin gelatin films prepared with the same gelatin used in this study.

The inclusion of green tea extract in C and CG films (CT and CGT) decreased both the tensile strength and the elongation at break ($p \leq 0.05$). Similar results have been reported for agar-based films containing other polyphenolic extracts. Lim et al. (2010) described that the TS of agar-based films containing nano-clays decreased with increasing the concentration of a grape seed extract in the film matrix up to 1.2%, probably due to the loss of intermolecular interactions among agar molecules. In the same study, EB tended to decrease with the highest concentrations of grape extract (1% and 1.2%). In contrast, other studies have reported an improvement in the mechanical properties of different polymeric matrices such as agar-gelatin, chitosan or soy protein incorporated with green tea or grape seed extracts, although at lower concentrations than those used in this study in which the green tea extract makes up the 50% of the film forming solution. This effect may be due to the interactions established between polyphenolic compounds and the polymeric matrix (Siripatrawan & Harte, 2010; Hong et al., 2009; Sivarooban, Hettiarachchy & Johnson, 2008).

3.1.2. Water vapour permeability

WVP values obtained for the films studied in this work are shown in Table 1. The values obtained for C films were in the same order of magnitude as those of films based on other polymers such as corn starch, hydroxypropylmethylcellulose or mammalian and fish gelatins (García, Martino & Zartizky, 2000; Gennadios, Weller & Gooding, 1994; Sobral & Habitante, 2001; Giménez, Gómez-Estaca, Alemán, Gómez-Guillén & Montero, 2009). The replacement of 33% of agar by fish skin gelatin in the film formulation (CG films), did not induce any significant change on the water vapour permeability when compared to the control ($p>0.05$). However, the inclusion of green tea extract in both C and CG films (CT and CGT) slightly decreased the WVP, although this decrease was not significant ($p>0.05$). In contrast with this, the WVP of edible films from agar-rich red algae (*Gelidium corneum*) powder decreased with increasing concentrations of both green tea extract and catechins in the film formulation, attributed to the formation of a compact and less permeable network (Ku et al., 2008; Hong et al., 2009).

3.1.3. Water solubility

The water solubility is a measure of water soluble matter of a film sample, which is used as an indicator for the resistance of the film sample to water. Although C films became rubbery when dipped in water, they maintained their integrity. The solubility of the C films after 16 h in water was $24.1\pm 1.4\%$ (Figure 1). These films were less water resistant than the agar films formulated by Rhim (2011) and Rhim et al. (2011), where values of 17.9 and 14.7%, respectively, were reported for water solubility. This difference may be due in part to differences in the amount of glycerol used as plasticizer in the film formulations. A higher amount of glycerol has been reported to increase the solubility of protein films because of the solubilization of glycerol itself (Cuq, Gontard, Cuq & Guilbert, 1997) and the decrease of the polymer interactions in the film matrix (Mahmoud & Savello, 1993). When compared with the water solubility of films based on other biopolymers, agar films show significantly lower water solubility than films prepared with methylcellulose or fish gelatins, especially from cold-water species which are extremely high water-soluble (García, Pinotti, Martino & Zaritzky, 2004; Pérez-Mateos, Montero & Gómez-Guillén, 2009; Carvalho et al., 2008).

The replacement of 33% of agar by fish skin gelatin in the film formulation (CG films), did not induce any significant change on the water resistant when compared to the control ($p>0.05$). However, the incorporation of the green tea extract both in C and CG films (CT and

CGT) gave approximately a 2-fold increase in water solubility, probably due to the hydrophilic nature of the tea extract.

The solubilization of the films was studied at 15 min, 90 min and 16 h (Figure 1). In all the samples, the water solubility reached the maximum value after 15 min in water, and noticeable increases were not further observed in the solubility from 15 min onwards ($p>0.05$).

3.1.4. Water resistance

In spite of the differences found in water solubility between films with and without green tea extract, all the samples showed a similar water resistance. Films were monitored during 15 days. The water filtration started after 14 h of exposure in all the films and persisted during all the monitored time. None of the films were deformed or broken during the monitored time. When compared with the water resistance of films based on other biopolymers, agar films showed a water resistance significantly higher than films prepared with muscle squid protein extracted at both pH 3 and pH 10, which were broken after 5 min and 48 h of exposure, respectively; but lower than squid protein films obtained from concentrated muscle protein extracted at pH 10, which did not show water filtration after 7 days of exposure (Blanco & Montero, 2011).

3.2. Release of phenolic compounds and antioxidant activity in water

3.2.1. Release of total phenolic compounds, catechins and flavonols

The release of phenolic compounds from CT and CGT matrices was determined after 15 min, 90 min and 16 h in water at 22 °C (Figure 2), which is considered as an aqueous food simulant by European law. The release of active compounds from polymeric matrices is influenced mainly by the properties of both the polymer and the active compound as well as the characteristics of the food product (López-de Dicastillo et al., 2012). The release of phenolic compounds in water from both CT and CGT film matrices occurred mainly during the first 15 min, showing both films similar values after this time (~ 50 mg gallic acid equivalents/g film; $p>0.05$). In the case of CT films, a 1.5-fold increase was observed in the release of polyphenols from 15 to 90 min, and only a slight but significant increase from 90 min afterwards ($p\leq 0.05$). However, in the case of CGT films any noticeable increase was detected in the amount of phenolic compounds released from the matrix in the same interval (15 min to

90 min; $p > 0.05$), and only a 1.2-fold increase was observed from 90 min to 16 h ($p \leq 0.05$), reaching values of ~ 60 mg gallic acid equivalents/g film after this time.

The release of the major catechins and the most abundant glycosylated flavonols found in the green tea extract (López de Lacey, Pérez-Santín, López-Caballero & Montero, 2011) from CT and CGT matrices was also determined after 15 min, 90 min and 16 h in water (Table 2). The most abundant polyphenols found in the green tea extract, epigallocatechin gallate and epigallocatechin (López de Lacey et al., 2011), were also released in greater amounts from the matrices, showing values that were two orders of magnitude higher than the rest of catechins and flavonols both in CT and CGT films. As described above for total phenolic compounds, catechins and flavonols were released from both CT and CGT films mainly during the first 15 min in water. After 16 h in water, all the polyphenols studied were released in higher quantities by CT films ($p \leq 0.05$), with the exception of epicatechin and epicatechin-3-gallate. Therefore, the replacement of 33% of agar by fish skin gelatin in the film formulation seemed to hinder the release of the polyphenols from the film matrix. Furthermore, gelatin solubilization has been reported from films containing gelatin when these films are placed in water (Giménez et al., 2012), which involves the possible release of protein-polyphenol complexes or the formation of complexes between polyphenols and protein once released from the matrix. It is well known the ability of polyphenols to interact with proteins. The formation of these protein-polyphenol complexes occurred through multiple weak interactions (mainly hydrophobic) and is dependent on pH, temperature, nature and concentration of the protein and the polyphenol, etc. (Luck et al., 1994; Papadopoulou, Green, & Frazier, 2005; von Staszewski, Pilosof, & Jagus, 2011).

Regarding catechins, there was a significant increase in the release of epigallocatechin, epicatechin-3-gallate and epigallocatechin gallate from CT films with time ($p \leq 0.05$), although 69, 46 and 68% of each compound was released during the first 15 min. In contrast, increasing concentrations of epicatechin were not detected from 15 min onwards ($p > 0.05$), and only slight rises were observed in the catechin concentration in water from 90 min to 16 h ($p \leq 0.05$). The release of catechins from the CGT films occurred in a lesser extent and was dependent on the compound. Whereas significant increases were not observed in the amount of catechin or epicatechin released in water from 15 min onwards ($p > 0.05$), a slight but significant increase ($p \leq 0.05$) occurred in the case of epigallocatechin and epigallocatechin gallate (from 15 to 90 min) as well as epicatechin-3-gallate (from 15 min to 16 h).

In the case of CT films, approximately 50% of the flavonols quantified in water after 16 h were released during the first 15 min. Furthermore, a significant increase in the release with

increasing time was observed in all the flavonols determined ($p \leq 0.05$). Thus, there were rises between 30 and 45% depending on the compound from 15 min to 90 min, whereas increases from 40 to 50% were observed in time interval 90 min-16 h. Regarding CGT films, none of the flavonols analyzed was significantly released in water from 15 min to 16 h ($p > 0.05$), probably due to the polyphenol-protein interactions in the film matrix.

3.2.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity released from the CT and CGT films was monitored by both FRAP and ABTS assays after 15 min, 90 min and 16 h in water. In the case of CT films, increasing values of FRAP (Figure 3a) and ABTS (Figure 3b) were observed with time ($p \leq 0.05$), which indicates the increasing release of antioxidant compounds from the film matrix. However, approximately 60% of the antioxidant power measured by FRAP and ABTS after 16 h in water was released during the first 15 min. When compared to CT films, the reducing power released by CGT films was significantly lower from 15 min onwards ($p \leq 0.05$), whereas the radical scavenging activity was lower during all the monitored time ($p \leq 0.05$). Furthermore, significant increases in the antioxidant activity released by CGT films were only observed in the time interval 90 min - 16 h. Therefore, the replacement of agar by fish skin gelatin in the film formulation hindered the release of antioxidant activity from the matrix film, as a consequence of the lower release of polyphenolic compounds as it was described in Figure 2 and Table 2, probably due to protein-polyphenol interactions. Furthermore, the possible formation of polyphenol-protein complexes in water once released from the matrix film may be detrimental to the antioxidant activity. The interaction of flavonoids with proteins negatively affects the antioxidant efficacy of these compounds. The degree of masking of the antioxidant activity depends on the polyphenol composition and on the type of protein (Arts et al., 2002; von Staszewski, et al., 2011). However, these polyphenol-protein complexes may retain part of the antioxidant activity, if some hydroxyl groups remain free to allow the molecule to act as an antioxidant (Almajano, Delgado & Gordon, 2007).

Polyphenolic compounds in green tea have been reported to exhibit strong antioxidant properties in numerous studies. They can act as antioxidants by donation of a hydrogen atom, as an acceptor of free radicals, interrupting chain oxidation reactions or by chelating metals (Gramza & Korczak, 2004). The release of phenolic compounds from both films (Figure 2) showed a positive correlation with the antioxidant activity measured by FRAP ($r = 0.939$ and $r = 0.951$ for CT and CGT, respectively; $p \leq 0.01$) and ABTS ($r = 0.955$ and $r = 0.923$ for CT and CGT,

respectively; $p \leq 0.01$). Moreover, epigallocatechin gallate and epigallocatechin have been reported as the catechins that contribute the most to the antioxidant effectiveness in green tea (Toschi, Bordoni, Hrelia, Bendini, Lercker & Biagi, 2000; Komes, Horžić, Belščak, Ganić, & Vulić, 2010), due to the presence of a gallate group at 3' position of C ring (epigallocatechin gallate) and a hydroxyl group at the 5' position of B ring (both compounds) (Guo, Zhao, Shen, Hou, Hu & Win, 1999). The release of these compounds in water from CT films showed a highly significant correlation with FRAP ($r = 0.985$ and $r = 0.979$, respectively; $p \leq 0.01$), and to a lesser extent with ABTS ($r = 0.871$ and $r = 0.872$, respectively; $p \leq 0.05$). However, in the case of CGT the release of epigallocatechin and epigallocatechin gallate showed no significant correlation with antioxidant activity ($p > 0.05$).

3.2.3. Antimicrobial properties

Films containing green tea (CT, CGT) showed antimicrobial activity against certain microorganisms (Table 3). The antimicrobial activity of green tea *Lu Wu Mountain*, the same variety used in our experiment, was previously reported (López de Lacey et al. 2011). These authors found that the aqueous extract of this green tea inhibited mainly *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and *Aeromonas hydrophila*. The results of our work revealed that the antimicrobial activity is maintained when the green tea extract is incorporated into a film, except for *A. hydrophila*. However, films of agar and / or gelatin incorporated with tea slightly inhibited the growth of *P. aeruginosa* too (Table 3). Agar and / or gelatin films did not present antimicrobial activity.

Agar films allow diffusion of green tea to exert their antimicrobial activity. Moreover, the presence of gelatin in the films does not modify the activity of tea extract in most cases ($p > 0.05$) (Table 3). Polyphenol protein interaction has been referred in the literature. Thus, von Staszewski et al. (2011) observed that the antimicrobial effect of the polyphenol from green tea infusions in the presence of whey proteins increased with the reduction of whey protein concentration. In our experiment, this phenomenon was not observed since the microbial inhibition achieved in the CT and CGT films was similar, unlike what was observed in the release of phenolic compounds and antioxidant properties (Table 2, Fig. 2 and 3)

V. parahaemolyticus and *P. phosphoreum* showed the highest sensitivity, with inhibition zone of 166 and 177 mm, respectively (which represents a c.a. 7% inhibition of total surface of the plate). The antimicrobial properties of tea have been described in literature. In the

overview by Friedman (2007) mentioned several microorganisms sensitive to tea flavonoids and teas, among which Gram-positive and Gram-negative bacteria as *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli*, etc. Different strains of the same microorganisms have been found to exhibit different susceptibilities to inactivation by tea flavonoids (Hamilton-Miller, 1995). This fact would help to explain the lack of antimicrobial activity of *Wu Lu Mountain* respecting to some microbial species studied in our work. Our results showed that just Gram-negatives bacteria were sensitive to green tea, including some specific spoilage organisms of fish (López-Caballero et al, 2005). To our best knowledge, the sensitivity of *S. putrefaciens* and *P. phophoreum* to the flavonoids from green tea has been firstly described in aqueous tea extract (López de Lacey et al., 2011) and in films of agar and / or gelatin incorporated with aqueous extract of tea in the present work. This fact is promising in terms of food preservation, and further studies in depth on how to confer stability to food by the application of such films incorporated tea extracts might be of great interest.

Regarding with the applications, a concentrated green tea extract (*Camellia sinensis*) inhibited sporulation and growth of *C. perfringens* in ground meat and turkey products during chilling, suggesting that the use of polyphenols could contribute in reduction of temperatures used in thermal processing of foods (Juneja, Bari, Inatsu, Kawamoto & Friedman, 2007). On the other hand, the agar and/or gelatin films containing green tea were inactive against the studied *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains ($p>0.05$), microorganisms potentially beneficial for the intestine (Table 3). Accordingly, (M. P. Almajano, Carbó, Jiménez, & Gordon, 2008) reported *Lactobacillus acidophilus* to offer exceptional resistance to green tea infusions.

It is well known that flavonoids, specifically flavan-3-ol and their derivatives or catechins including epigallocatechin-3-gallate (EGCG) are responsible for the antimicrobial activity of green tea (Friedman, 2007, Graham 1992). In addition, other minor components such as minerals, amino acids, etc., also influence its biological properties (Graham, 1992; López de Lacey et al., 2012). These latter authors found that the biological properties of six varieties of green tea can be defined as the combination of all these individual components working together in unison, since the teas differed in terms of chemical composition and properties, and the bioactive properties of extracts were not related to each other. Cushine and Lamb (2011) referred that the mechanism of action of flavonoids can be summarized in cytoplasmic membrane damage, inhibition of nucleic acid synthesis, inhibition of energy metabolism and recently inhibition of the cell wall synthesis. This same work described that flavonoids, among which the epicatechin-gallate is found, causes bacteria aggregation and therefore a decrease in colony forming unit may be no longer equal to decreases in viability. In our study we have

determined inhibition zones produced in certain microorganisms regarding the total plate seed surface and the inhibition zones have been determined despite this phenomenon, in case that it occurred.

4. CONCLUSIONS

Agar seems a good matrix to obtain active biodegradable packaging films since allows the release of antioxidant and antimicrobial compounds when a green tea extract is incorporated as active compound. However, the incorporation of green tea extract to the agar matrix film, both in presence and absence of gelatin, negatively affected the mechanical properties of the resulting films. Furthermore, the replacement of agar by gelatin in the matrix film gave more deformable films, but hindered the release of both phenolic compounds and antioxidant activity from the films when the green tea extract was incorporated. However, the antimicrobial activity of the films with green tea extract was not affected by the presence of gelatin.

Acknowledgements

This study was carried out under the CYTED Agrobioenvase project (Action 309AC0382) and was sponsored by the National project (MICNN) AGL2008-00231/ALI and Xunta de Galicia (Program Ángeles Alvariño).

References

- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H. P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(5), 1184-1187.
- Almajano, M. P., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (2007). Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 102, 1375-1382.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55-63.
- Blanco, N., & Montero, P. (2011). Desarrollo de películas de músculo de calamar. III Jornadas Internacionais sobre avanços na tecnologia de filmes e coberturas funcionais em alimentos. Campinas, Brasil.

- Bordes, P., Pollet, E., & Avérous, L. (2009). Nano-biocomposites: biodegradable polyester/nanoclay systems. *Progress in Polymer Science*, 34, 125-155.
- Carvalho, R. A. Sobral, P. J. A., Thomazine, M., Habitante, A. M. Q. B., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1117-1123.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y. & Chew, Y. L. (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, 102, 1214-1222.
- Chiu, P. -E., & Lai, L. -S. (2010). Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 23-30.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. -L., & Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 622–626.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A., J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99-107.
- Freile-Pelegrín, Y., Madera-Santana, T., Robledo, D., Veleza, L., Quintana, P., & Azamar, J. A. (2007). Degradation of agar films in a humid tropical climate: thermal, mechanical, morphological and structural changes. *Polymer Degradation and Stability*, 92, 244-252.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), 116-134.
- García, M. A., Martino, M. N., & Zartizky, N. E. (2000). Microstructural characterization of plasticized starch-based films. *Starch/Stärke*, 52(4), 118-124.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 339-345.
- Gennadios, A., Weller, C. L., & Gooding, C. H. (1994). Measurements errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2009). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23, 3, 585-592.

- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., & Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27, 475-486.
- Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero M. E, Gómez-Guillén M. C, & Montero P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27, 889-896.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78-85.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350.
- Gramza, A., & Korczak, J. (2004). Tea extracts influence on catalytical properties of Fe²⁺ in lipids. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13, 143-146.
- Gramza-Michalowska, A., & Regula, J. (2007). Use of tea extracts (*Camellia sinensis*) in jelly candies as polyphenols sources in human diet. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16, 43-46.
- Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J., & Xin, W. (1999). ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1427(1), 13-23.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (1995). Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 2375-2377.
- Hong, Y. -H., Lim, G. -O., & Song, K. B. (2009). Physical properties of Gelidium corneum-gelatin blends films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. *Journal of Food Science*, 74(1), C6-C10.
- Jang, S. -A., Lim, G. -O., & Song, K. B. (2010). Use of nano-clay (Cloisite Na⁺) improves tensile strength and vapour permeability in agar rich red algae (*Gelidium corneum*) gelatin composite films. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1883-1888.
- Juneja, V. K., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., & Friedman, M. (2007). Control of *Clostridium perfringens* spores by green tea leaf extracts during cooling of cooked ground beef, chicken, and pork. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1429-1433.

- Kim, K. M., Ko, J. A., Lee, J. S., Park, H. J., & Hanna, M. A. (2006). Effect of modified atmosphere packaging on the shelf-life of coated, whole and sliced mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, 39(4), 364-371.
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganić, K. K., & Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43(1), 167-176.
- Ku, K. -J., Hong, Y. -H., & Song, K. B. (2008). Mechanical properties of a *Gelidium corneum* edible film containing catechin and its application in sausages. *Journal of Food Science*, 73(3), C217-C211.
- Ku, K., & Song, K. B. (2007). Physical properties of nisin-incorporated gelatin and corn zein films and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 520-523.
- Letendre, M., D'Aprano, G., Lacroix, M., Salmieri, S., & Sr-Gelais, D. (2002). Physicochemical properties and bacterial resistance of biodegradable milk protein films containing agar and pectin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6017-6022.
- Lim, G. -O., Jang, S. -A., & Song, K. B. (2010). Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grapefruit seed extract and thymol. *Journal of Food Engineering*, 98, 415-420.
- Liu, L., Liu, C., Fishman, M. L., & Hicks, K. B. (2007). Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2349-2355.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311.
- López-de-Dicastillo, C., Nerín, C., Alfaro, A., Catalá, R., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7832-7840.
- López de Lacey, A. M., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero P. 2011. Biological activity of green tea (*Camellia sinensis* L.) based on its chemical composition. *LWT- Food Science and Technology* (submitted).

- Mahmoud, R., & Savello, P. A. (1993). Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. *Journal of Dairy Science*, 76, 29–35.
- Martín-Diana, A. B., Rico, D., & Barry-Ryan, C. (2008). Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 593-603.
- Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2012). Role of liginosulphonate in properties of fish gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 27, 60-71.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5598-5605.
- Papadopoulou, A., Green, R. J., & Frazier, R. A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 158-163.
- Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23, 53-61.
- Perumalla, A. V. S., & Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts – potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44, 827-839.
- Phan, T. D., Debeaufort, F., Luu, D., & Voilley, A. (2005). Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 973-981.
- Phan, T. D., Debeaufort, F., Luu, D., & Voilley, A. (2007). Moisture barrier, wetting and mechanical properties of shellac/agar or shellac/cassava starch bilayer bio-membrane for food applications. *Journal of Membrane Science*, 325, 277-283.
- Phan, T. D., Debeaufort, F., Voilley, A., & Luu, D. (2009). Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava starch and arabionoxylan blends. *Journal of Food Engineering*, 90, 548-558.

- Rhim, J. -W. (2011). Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 86, 691-699.
- Rhim, J. -W., Lee, S. -B., & Hong, S. -I. (2011). Preparation and characterization of agar/clay nanocomposite films: the effect of clay type. *Journal of Food Science*, 76(3), N40-N48.
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.
- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.
- Sivarooan, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41, 781-785.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27, 102-118.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Sobral, P. J. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2001). Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 377-382.
- Stapleton, P. D., Shah, S., Ehlert, K., Hara, Y., & Taylor, P. W. (2007). The β -lactam-resistance modifier (-)epicatechin gallate alter the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 153, 2093-103.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14(3), 71-78.
- Tian, H., Xu, G., Yang, B., & Guo, G. (2011). Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering*, 107, 21-26.
- Toschi, T. G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G., & Biagi, P. L. (2000). The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3973-3978.

- von Staszewski, M., Pilosof, A. M. R., & Jagus, R. J. (2011). Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 125(1), 186-192.
- Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63, 335-342.
- Wu, Y., Geng, F., Chang, P. R., Yu, J., & Ma, X. (2009). Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers*, 76, 299-304.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 64-71.
- Zhao, R., Torley, P., & Halley, P. J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch- and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 43, 3058-3071.
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), M45-M51.

Legends to Figures

- Figure 1.** Water solubility of the films with different formulations as a function of time. C (control film), CG (agar-gelatin film), CT (agar-tea film) and CGT (agar-gelatin-tea film). Different letters in the same sample (x, y) indicate significant differences with time. Different letters in the same time (a, b) indicate significant differences among samples.
- Figure 2.** Total phenolic compounds released from CT (agar-tea) and CGT (agar-gelatin-tea) films at different times. Different letters in the same sample (a, b, c) indicate significant differences with time. Different letters in the same time (x, y) indicate significant differences between samples.
- Figure 3.** Antioxidant activity released from film matrices as a function of time (3a) FRAP assay and (3b) ABTS assay. CT (agar-tea film), CGT (agar-gelatin-tea film). Different letters in the same sample (a, b, c) indicate significant differences with time. Different letters in the same time (x, y) indicate significant differences between samples.

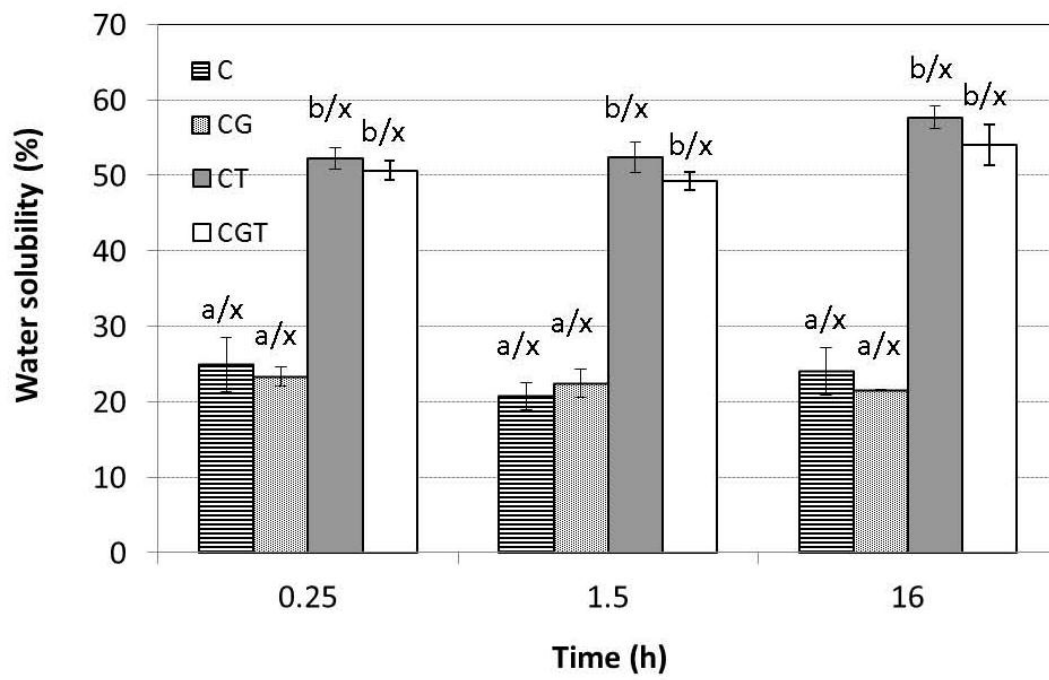


Figure 1.

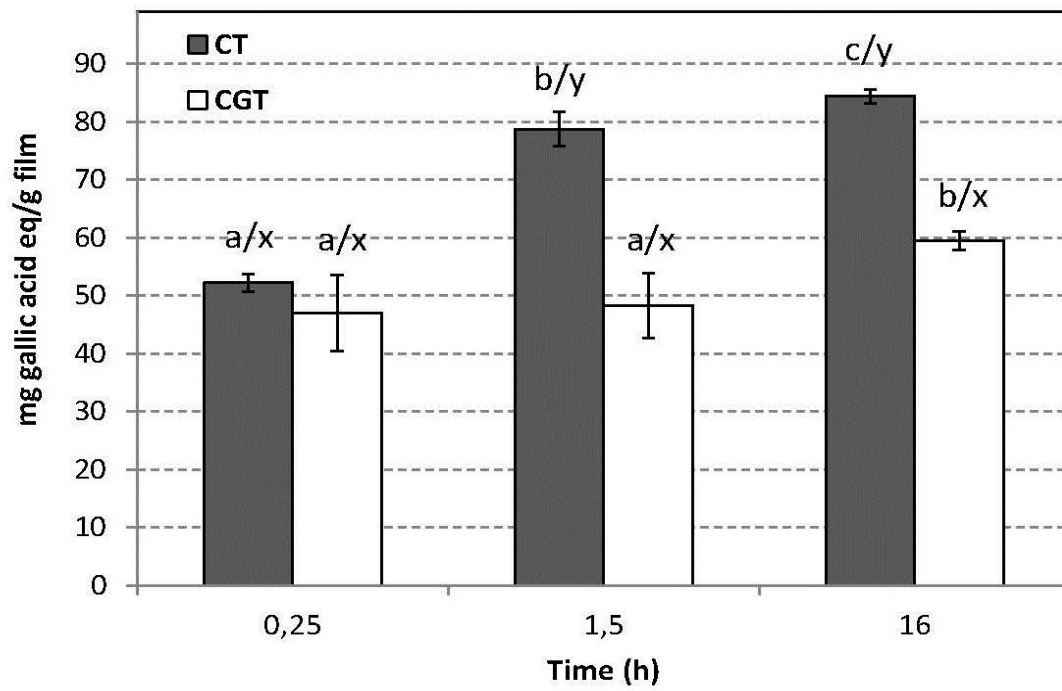


Figure 2.

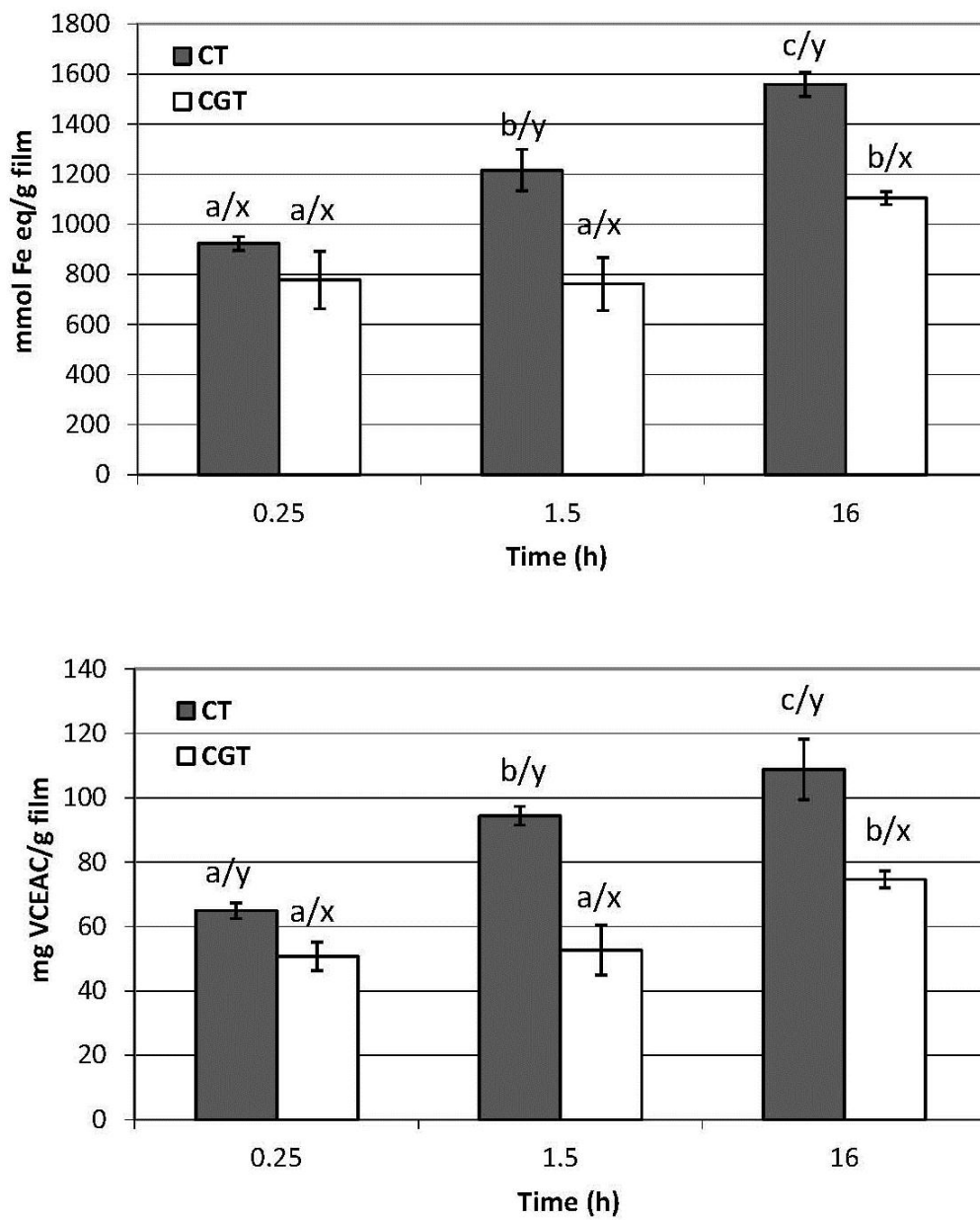


Figure 3.

Table 1. Mechanical properties and water vapour permeability of the films. Different letters in the same column (a, b, c, d) indicate significant differences between samples.

Films	TS (MPa)	EB (%)	WPV ($\times 10^{-8}$) (g mm/h Pa cm ²)
C	18.48 \pm 1.28 ^c	62.35 \pm 2.49 ^b	7.35 \pm 0.78 ^a
CG	15.03 \pm 1.50 ^b	77.60 \pm 5.76 ^c	6.94 \pm 0.74 ^a
CT	7.88 \pm 1.02 ^a	51.69 \pm 3.92 ^a	6.48 \pm 0.17 ^a
CGT	6.88 \pm 1.46 ^a	59.05 \pm 3.20 ^b	5.87 \pm 0.17 ^a

TS: Tensile strength; EB: Elongation at break; *E*: Young's modulus; WPV: Water vapour permeability

Table 2. Catechins and flavonols released in water from the film matrices at different times ($\mu\text{g/ml}$). Different letters in the same row (a, b, c, d, e) indicate significant differences among samples.

	CT					CGT				
	Time (h)	0.25	1.5	16	16	0.25	1.5	16	16	
(-)-Epigallocatechin		902 \pm 17 ^b	1077 \pm 16 ^c	1303 \pm 6 ^d	755 \pm 29 ^a	837 \pm 30 ^b	859 \pm 24 ^b			
(+)-Catechin		3.64 \pm 0.44 ^a	4.26 \pm 0.34 ^a	5.21 \pm 0.30 ^b	3.57 \pm 0.38 ^a	4.10 \pm 0.20 ^a	4.15 \pm 0.62 ^a			
(-)-Epicatechin		19.36 \pm 1.0 ^a	18.43 \pm 0.16 ^a	19.98 \pm 0.28 ^a	26.86 \pm 1.66 ^b	25.40 \pm 1.59 ^b	25.47 \pm 0.37 ^b			
(-)-Epicatechin-3-gallate		14.78 \pm 2.07 ^a	22.45 \pm 3.45 ^b	31.90 \pm 0.50 ^c	36.75 \pm 1.06 ^d	40.50 \pm 2.12 ^d	46.00 \pm 1.41 ^e			
(-)-Epigallocatechin gallate		2153 \pm 46 ^b	2576 \pm 31 ^c	3137 \pm 26 ^d	1837 \pm 50 ^a	2029 \pm 44 ^b	2065 \pm 43 ^b			
Rutin		16.27 \pm 2.14 ^a	21.61 \pm 2.30 ^b	30.39 \pm 1.85 ^c	22.11 \pm 2.20 ^b	23.98 \pm 1.36 ^b	24.33 \pm 3.53 ^b			
Hyperoside		8.54 \pm 1.06 ^a	11.94 \pm 1.36 ^b	17.23 \pm 0.66 ^c	9.08 \pm 0.91 ^a	10.53 \pm 0.68 ^{ab}	10.66 \pm 2.04 ^{ab}			
Quercetin-3-O-glucoside		4.29 \pm 0.52 ^a	6.18 \pm 0.77 ^b	9.34 \pm 0.48 ^c	4.85 \pm 0.53 ^{ab}	5.76 \pm 0.49 ^{ab}	5.89 \pm 1.36 ^{ab}			
Kaempferol-3-O-rutinoside		5.29 \pm 0.64 ^a	7.03 \pm 0.69 ^b	9.97 \pm 0.51 ^c	7.08 \pm 0.64 ^b	7.75 \pm 0.32 ^b	7.80 \pm 1.10 ^b			
Kaempferol-3-O-glucoside		2.53 \pm 0.33 ^a	3.63 \pm 0.42 ^b	5.51 \pm 0.32 ^c	2.78 \pm 0.29 ^{ab}	3.38 \pm 0.29 ^{ab}	3.42 \pm 0.76 ^{ab}			

Table 3. Antimicrobial activity (mm) of the films over different microorganisms.

Microorganisms	Diameter (plate)	Diameter (film)	
		CT	CGT
<i>Aeromonas hydrophila</i>	727±5	130±3 ^a	126±3 ^a
<i>Aspergillus niger</i>	942±25	156±7 ^a	143±14 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	695±6	120±1 ^a	112±7 ^a
<i>Bacillus coagulans</i>	744±3	125±1 ^a	119±1 ^b
<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	577±24	99±10 ^a	99±9 ^a
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	720±0	128±7 ^a	125±3 ^a
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	701±2	126±3 ^a	122±11 ^a
<i>Citrobacter freundii</i>	715±3	126±5 ^a	127±3 ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	729±0	129±0 ^a	121±4 ^a
<i>Debaryomyces hansenii</i>	707±2	117±0 ^a	112±0 ^b
<i>Enterococcus faecium</i>	706±6	145±13 ^a	125±4 ^a
<i>Escherichia coli</i>	686±0	118±1 ^a	117±3 ^a
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	669±1	109±7 ^a	120±2 ^a
<i>Lactobacillus helveticus</i>	654±8	110±1 ^a	111±6 ^a
<i>Listeria innocua</i>	702±3	123±0 ^a	116±0 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	706±8	123±0 ^a	118±1 ^a
<i>Penicillium expansum</i>	690±2	106±0 ^a	119±2 ^b
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	710±0	163±1 ^a	168±1 ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	730±1	148±10 ^a	129±1 ^b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	713±1	186±2 ^a	175±21 ^a
<i>Salmonella cholerasuis</i>	713±0	131±10 ^a	120±15 ^a
<i>Shewanella putrefaciens</i>	730±0	137±13 ^a	137±4 ^a
<i>Shigella sonnei</i>	724±0	132±8 ^a	123±0 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	718±0	133±8 ^a	125±2 ^a
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	705±1	178±4 ^a	171±2 ^a
<i>Yersinia enterocolitica</i>	667±1	106±6 ^a	116±6 ^a

CT: Agar-tea; CGT: Agar-gelatin-tea

ARTÍCULO 5

López de Lacey, A.M., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. y Montero, P. (2012)

Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films

Innovative Food Science and Emerging Technologies

FUNCTIONALITY OF LACTIC ACID BACTERIA INCORPORATED TO EDIBLE COATINGS AND FILMS

López de Lacey, A.M., López-Caballero, M.E*, Gómez-Guillén, M.C., Montero, P.

Institute of Food Science, Technology and Nutrition, (ICTAN), CSIC. (formerly Institute of Refrigeration), C/ José Antonio Nováis, 10, 28040. Madrid, Spain.

*Corresponding author: elvira.lopez@ictan.csic.es

Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

ABSTRACT

This work deals with the design and formulation of gelatin edible coatings and films of incorporated with probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. A gelatin coating incorporated with *B. bifidum* was applied to fish to assess its effect during chilled storage. *B. bifidum* remained viable during the storage and H₂S-producers microorganisms were reduced in 2 log cycles. In a further experiment, fish coated with gelatin films incorporated with bifidobacteria was treated with a high pressure (200 MPa/10 min/20 ° C). At the end of the storage, a reduction of total viable counts (<2 log cycles) were obtained. Moreover, the combined treatments drastically reduced the content of volatile bases and lowered the pH by more than 1 unit. Furthermore, the application of gelatin edible packaging incorporated with bacteria can be promising for fish preservation, especially when combined with other technologies such as a high-pressure.

Key words: edible packaging, bacteria, fish, shelf-life, high pressure.

1. INTRODUCTION

In recent years, the demand and consumption of minimally processed food and additive-free commodities which present few changes at sensory level has increased. This fact leads to the development of new technologies and systems for preservation that control the quality and guarantee food safety. This tendency has also led to research on developing new biodegradable packaging materials from natural polymers in order to achieve a partial alternative to plastic packaging. The films can be obtained from several sources (polysaccharide, lipid, protein) (Tharanathan, 2003) which are in many cases waste products from fishing, agriculture or cattle farming. These films act as oxygen and water barriers, thereby slowing oxidation reactions and retaining moisture, thus enhancing quality and extending storage life (Gennadios, Hanna, & Kurth, 1997).

In the formulations of edible packaging the addition of certain compounds to impart antimicrobial properties and/or antioxidants is often considered (Gennadios et al., 1997). The compounds to be incorporated are of a different nature, and may be limited to maintain quality and food safety (active packaging), or may even lead to a potential beneficial effect on consumer health (bioactive packaging). The compounds added more frequently are, among others, polyphenols from plants (Burt, 2004), chitosan (Lopez-Caballero, Gomez-Guillen, Perez-Mateos, & Montero, 2005), acids (Beverly, Janes, Prinyawiwatkula, & No, 2008), antioxidant and antimicrobial peptides (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, & Montero, 2011), etc. Recently the incorporation of lactic acid bacteria or probiotics to films and coatings have been described: alginate-gellan incorporated with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 for coating of fresh fruits (Tapia et al., 2007) and *Lactobacillus sakei* incorporated in sodium-caseinate films to control *Listeria monocytogenes* in culture medium and in fresh beef (Gialamas, Zinoviadou, Biliaderis, & Koutsoumanis, 2010).

Probiotics are live microorganisms which upon ingestion in certain numbers exert a beneficial effect on health (FAO/WHO, 2002) and an estimated daily intake of around 10^6 - 10^9 CFU/day is recommended to ensure a therapeutic effect. Excellent reviews (Do Espírito Santo, Perego, Converti, & Oliveira, 2011; Prado, Parada, Pandey, & Soccol, 2008; Soccol et al., 2010) describe the characteristics and latest progress related to this group of bacteria, among which are species of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, including *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*, species used in our work. While dairy products are undoubtedly the main source of intake of probiotics, lactose intolerance and cholesterol

content are the main concern related to these products (Prado, et al., 2008). Among the latest trends (Do Espírito Santo, et al., 2011; Soccol, et al., 2010) vegetable and juice beverages are good candidates as probiotics vehicles, although in this case bacteria could need protection from the acid condition in the fruit juice. In this connection, edible coatings and films, as above mentioned, are presented as another real possibility of carrier matrices for probiotics.

In general, edible films are applied to various foods, including fish, to confer stability during storage and to increase shelf-life (Gómez-Estaca, López de Lacey, Gómez-Guillén, López-Caballero, & Montero, 2009; Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010; Lopez-Caballero, et al., 2005). Moreover, the application of edible films in combination with high pressure processing has already been shown to be a very promising technology for fish preservation of cold-smoked sardine (covered by active plant extract-gelatin composite films, [Gómez-Estaca, Montero, Giménez, & Gómez-Guillén, 2007]) and salmon (covered by active lignin-gelatin composite films, [Ojagh, Núñez-Flores, López-Caballero, Montero, & Gómez-Guillén, 2011]). In this sense, we do not know about any references on the incorporation of lactic acid bacteria in coatings/films based on gelatin (or other polymers) for fish preservation, alone or in combination with high pressure treatments. The aim of this work was to design and formulate the edible packaging (coatings and films) incorporated with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* and evaluation of the survival of these species in the coatings/films. Subsequently, edible packaging incorporated with bacteria was applied in fish to determine their effect on the growth of natural microbiota and shelf-life during chilled storage. Isostatic high pressure was also applied to study the effect of combined treatments.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Formulation of the films

The film forming coating solutions were prepared using gelatin from bovine-hide (Sancho de Borja S. L., Zaragoza, Spain). Gelatin film forming solution was prepared by dissolving 8 g of gelatin per 100 ml of distilled water. Glucose (2%) and Cysteine (0.05%) were also added. Sorbitol (Panreac) (0.15 g/g gelatin) and glycerol (Panreac) (0.15 g/g gelatin) were used as plasticizers. Gelatin was dissolved in distilled water. The mixtures were warmed and stirred at 45 °C for 15 min to obtain a good blend. Two species, *Lactobacillus acidophilus* CECT 903 and *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215 were selected to formulate the bioactive packaging. The

strains were stored at -80 °C in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) with 25 % glycerol (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) until their use. For regeneration, a little portion of the frozen culture were transferred to MRS (de Man, Rogosa and Shape, Oxoid, Basingstoke, UK) for *L. acidophilus*, and MRS+0.05% Cysteine for *B. bifidum*, and then incubated at 37 °C under CO₂ flow and at 37 °C under anaerobic conditions (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid), respectively. Then, cells from each culture were centrifugated (6000 rpm/15 min/5 °C), harvested and washed with Ringer's solution. *L. acidophilus* and *B. bifidum* were added to their respective film forming coating solutions to attain a final concentration of 10⁹ cfu/ml. The respective films were obtained by casting an amount of 40 ml in square plastic dishes (144 cm²) and drying at 45 °C in a forced-air oven for 15h to yield a uniform thickness [200 µm (p≤0.05)] in all cases. Uniformity was verified by measuring the thickness in 9 points randomly. The films were stored in desiccators for 2 d at 22 °C over a saturated solution of NaBr (58% relative humidity) until analyses (c.a. 12-24 h.). Thus four samples were then obtained in total: film forming solution+*L. acidophilus* (SLa); film forming solution+*B. bifidum* (SBb); film+*L. acidophilus* (FLa); and film+*B. bifidum* (FBb).

2.2. Survival of lactic acid bacteria strains

To determine the viability of lactic acid bacteria incorporated into the film forming solutions or films, counts on specific culture media were periodically performed. For film forming solution, a total amount of 1 mL was collected and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 9 ml of buffered 0.1 % peptone water (Oxoid) in a vertical laminar-flow cabinet (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, Spain). After 1 min in a Stomacher blender (model Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate dilutions were prepared. For the films, 1 g was collected and placed into a sterile bottle with 99 ml of buffered 0.1 % peptone water previously heated (~37 °C). Then, peptone water containing the film was stirred in an orbital at the same temperature for 1 h to dissolve the film partially and allow microorganisms to release into the peptone water. Later appropriate dilutions were prepared. Counts for *L. acidophilus* and *B. bifidum* were performed in MRS agar and MRS agar +0.05% cysteine, respectively, both in film-forming solutions and in films. Culture conditions for these two microorganisms were the same as previously described. Analyses were performed in triplicate.

2.3. Fish storage trial

Hake (*Merluccius merluccius*) purchased at a local market were cut in portions of (c.a. 100 g each). Gelatin film forming solution (coating) added or not with *B. bifidum* was prepared as described above. The portions were dipped into the solutions (with or without bacteria) for 5 min., then removed and vacuum-packed in bags (Cryovac BB-1, Grace, Barcelona, Spain) by using a Multivac 155 packaging machine (A-NG, 85021, GS, Germany). Two batches were then obtained: hake dipped into solution (HS) and hake dipped into solution+*B. bifidum* (HSB). Hake without any treatment was used for control purposes (H). Batches were stored at 2 ± 1 °C.

2.4. Fish storage trial treated with high pressure

In this trial, hake portions of 100 g were covered individually with a gelatin film added with *B. bifidum* (films with bacteria were prepared as described above). Hake wrapped with films were vacuum-packed and treated in pilot high-pressure unit (ACB 665, GEC Alsthom, Nantes, France); the temperature of the immersion medium (distilled water) being regulated by a thermocouple connected to a programmed temperature control equipment (model IA/2230AC, INMASA, Barcelona, Spain). High pressure treatment was carried out at 200MPa/10 min/20 °C. Pressure was increased by 2.5MPa/s and after high pressure treatment was completed, the time for pressure dropping back to atmospheric was around 3 s. Three lots were obtained: control hake (H), hake film+*B. bifidum* (HF) and hake film+*B. bifidum*-pressurized (HFP). Batches were stored at 2 ± 1 °C.

2.5. Microbiological assays

The microbiological analyses were as follows: a total amount of 10 g of muscle, from at least 2 different packages, was collected and placed in a sterile plastic bag with 90 ml of buffered 0.1 % peptone water in a vertical laminar-flow cabinet. After 1 min in a Stomacher blender, appropriate dilutions were prepared for the following microorganism determinations: (i) total bacterial counts (TBC) on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 3 days; (ii) H₂S-producers organisms, as black colonies, on pour plates of Iron Agar incubated at 15 °C for 3 days; (iii) luminescent bacteria on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 5 days; (iv) lactic acid bacteria on double-layered plates of MRS agar incubated at 30 °C for 72 h; (v) bifidobacteria counts on MRS+0.05% Cys incubated at 37 °C under anaerobic

conditions. All microbiological counts were expressed as the log of the colony-forming units per gram (log cfu/g) of sample. All analyses were performed in triplicate.

2.6. pH

Approximately 5-10 grams of muscle were homogenized with a double quantity (g/ml) of distilled water. After five minutes at ambient temperature, pH was determined with a pHm93 pH-meter and a combined pH electrode (Radiometer, Copenhagen, Denmark). The experiments were repeated at least in triplicate.

2.7. Total volatile basic nitrogen (TVB-N)

Total volatile basic nitrogen (TVB-N) determinations were carried out in triplicate over the storage period, using the method of Antonacopoulos and Vyncke (1989). 10 g +/- 0.1 g of the ground sample were weighed in a suitable container and homogenized with 100 ml 6 % perchloric acid solution for two minutes. After filtering, the extract was alkalinized with a 20 % sodium hydroxide solution and submitted to steam distillation. The volatile base components were absorbed by an acid receiver and determined by titration.

2.8. Statistical analyses

Statistical tests were performed using the SPSS® computer program, version 15.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Survival of lactic acid bacteria strains

The counts for *L. acidophilus* and *B. bifidum*, both in film forming solution (coating) and film, are shown in Figure 1. From an initial concentration of 10^9 cfu/ml, both *L. acidophilus* and *B. bifidum* remained fairly constant for 6 days (Figs. 1a-b). Both species remained viable and were able to grow in culture media, although some declines in the counts ($p \leq 0.05$) could be expected due to the adaptation to the new substrate and to the temperature used to preserve the solutions and films (2 ± 1 °C). Previously, different specific culture media for the recovery

of bifidobacteria in plaque were tested (MRS-raffinose [Tabasco, Paarup, Janer, Peláez, & Requena, 2007] and MRS-NPNL [Roy, 2001]), and all of them resulted in very similar counts (data not shown). In this connection, (Tapia, et al., 2007) reported that *B. lactis* Bb-12 (at a concentration of 10^9 cfu/g) was incorporated in coatings of alginate or gellan with glycerol and then applied to apple and papaya cylinders. After application, the counts of *B. lactis* decreased about 2 log units (which were attributed to dilution phenomena), while the population of bifidobacteria remained viable and constant for 10 days at 2 °C.

The formulation of our edible packaging (coating and films) contained sorbitol in their composition. Sorbitol and related polyols act as protective agents of microorganisms in situations of a_w decreased as freeze-drying of *L. platarum* and *L. rhamnosus* (Carvalho et al., 2004). The mechanism by which they exert this protective effect could be related to the interaction between sugars and phospholipid membranes, helping to maintain its fluidity (Santivarangkna, Kulozik, Kienberger, & Foerst, 2009). However, Gialamas et al. (2010) incorporated *Lactobacillus sakei* (10^6 cfu/cm², directly before casting or spray) in sodium caseinate edible films stored at 4 and 15 °C; when the films did not contain sorbitol in their formulation, there was an increase in the viability of bacteria of the film kept at 4 °C, possibly because of decreased metabolism experienced by the organisms at low temperatures.

3.2. Fish storage trial

Initial counts were 4.3 hake log cfu/g. These counts were similar to those reported for this same species (Lopez-Caballero, 1998). Changes in total viable counts were barely detected to day 6. From there, the control batch underwent a slight but significant increase ($p \leq 0.05$), registering close to 7 log cfu/g at the end of the storage. Hake with coating (HS), after some fluctuation, reached figures close to control batch (Fig. 2a). Counts of hake with coating incorporated with bacteria (HSB) remained practically constant during storage and attained 1 log unit lower ($p \leq 0.05$) than control at day 10 (Fig. 2a). However, the most relevant was the significant inhibition achieved by the coating (with or without bacteria) in H₂S-producing microorganisms (Fig. 2b), presumably considered as *Shewanella putrefaciens*, specific organisms involved in fish spoilage (López-Caballero, Martínez-Alvarez, Gómez-Guillén, & Montero, 2007).

The lactic acid bacteria counts were in a similar range for all batches, about 4 log cfu/g at the end of the period studied (Fig. 2c) for H and HS batches ($p \leq 0.05$). It is worth noting the survival of bifidobacteria during storage, which decreased only 1 log cfu/g compared to the

initial concentration (Fig. 2d). The differences between the counts in MRS agar and MRS-Cysteine (Fig. 2c, d) could be explained by the difficulty of *B. bifidum* to grow in the culture media without the addition of Cys. Luminescent colonies were not detected in this assay.

Lactic acid bacteria improves health when consumed, but they also play a protective effect against pathogens microorganisms in the product during storage through competition with pathogens for nutrients, producing metabolites as organic acids and bacteriocines, etc. (Rydlo, Miltz, & Mor, 2006; García, Martín, Sanz, & Hernández, 1995). In this sense, the use of lactic acid bacteria against pathogenic organisms has been referred to previously in the literature. Thus, in shrimps contaminated with *L. monocytogenes*, the addition of *Lactobacillus plantarum* LKE5 inhibited even 3 log units the growth of listeria (Huss, Jeppesen, Johansen, & Gram, 1995), this effect being higher if the experimental conditions were close to the limit of growth of the pathogen (in terms of pH, etc.). In another trial, apple wedges were dipped with *Lactobacillus rhamnosus* GG (108 cfu/ml) and although *Salmonella* was not affected when co-inoculated with *L. rhamnosus* GG, *L. monocytogenes* was reduced in the presence of the lactobacilli 1-log unit (Alegre, Viñas, Usall, Anguera, & Abadias, 2011). In addition, apple wedges quality were not affected by the incorporation of *L. rhamnosus* GG, while the probiotic population maintained around 107 cfu/g during the 28 days of storage at 5 and 10 °C.

The incorporation of bacteria in covers and packages, as coating/films, offers new possibilities and could be advantageous, and to our best knowledge, there are only two references in the literature (Gialamas, et al., 2010; Tapia, et al., 2007), in addition to the present work. The advantage of incorporating bacteria to the covers (coating/film) may be related to the spread and concentration of bacteria on the product surface. Kristo, Koutsoumanis, and Biliaderis (2008) described the effect of microbial metabolites, such as nisin, against pathogens as *L. monocytogenes*, is greater when nisin takes part of a coating of sodium-casinate than if nisin is applied directly to the culture medium. This fact could be due to the decrease in the rate of diffusion from the cover/packaging to the product, in which a high concentration of active compound in the product surface was maintained (Gialamas, et al., 2010). These authors pointed out that the use of *L. sakei* incorporated into sodium-caseinate films constitutes an effective way to control *L. monocytogenes* (up to 4 log cycles) and for improving food safety, both in culture media and in beef slices at constant (4 °C) and fluctuating temperature (5-15 °C).

3.3. Fish storage trial treated with high pressure

This experiment was designed with the idea of applying a low-level high pressure treatment (200 MPa) to avoid the modification of the sensory characteristics of fish. This treatment could also remove some of the Gram-negative flora, while Gram-positive flora (both endogenous and that incorporated to the film), would be affected to a lesser extent because of their higher resistance to HP (Cheftel, 1992; López-Caballero, Pérez-Mateos, Montero, & Borderías, 2000). This assay was performed with films, rather than with coatings, because of the higher potential resistance acquired by the bacteria after handling and the stress suffered during the preparation of the films. In this regard, Gialamas et al. (2010) reported that when bacteria are incorporated into a film they are also exposed to drying, which could explain the increased viability compared to films whose bacteria are incorporated once obtained by spray.

The initial count of total viable bacteria is ≈ 4.6 log cfu/g. The high pressure treatment (200 MPa/20^o C/10 min) reduced 1 log unit ($p \leq 0.05$) the total bacteria and the H₂S-producers remained below the detection limit after the treatment (Fig. 3a, b). The sensitivity of *S. putrefaciens* to the high pressure has been referred previously (López-Caballero, et al., 2000). Both counts of lactic acid bacteria and bifidobacteria are unaffected by HP treatment applied (Fig. 3d, e). This is of great importance because the high pressure treatment can allow the elimination of Gram-negative psychrophilic bacilli causing the deterioration of fish in benefit of lactic flora, whose metabolism is generally slower and involve less production of volatile metabolites responsible for off-odours. Luminescent colony counts, presumptive *P. phosphoreum* (López-Caballero, Álvarez Torres, Sánchez-Fernández, & Moral, 2002) initially remained below the detection limit (Fig. 3). While the pressure resistance of this organism has been described (Paarup, Sanchez, Peláez, & Moral, 2002), high pressure treatments (300 Mpa/10 min at 5 and 40 °C) applied in salmon covered by an lignin-gelatin film significantly reduced the counts of presumptive *P. phosphoreum* (Ojagh, et al., 2011).

During storage, excepting for luminescent colonies and bifidobacteria counts, the control lot (H) evolved similarly to the hake film+B. bifidum (HF). On the contrary, the exponential rate of growth was lower in the pressurized-film lot, especially for the H₂S-producers (Fig. 3b). On day 9, hake-film treated by high pressure (HFP) registered total bacterial counts around 7 log cfu/g, while the other batches raised around 9 log cfu/g ($p \leq 0.05$). For this HFP batch, the H₂S-producers microorganisms reached figures similar to those of total flora. Moreover, the application of films containing lactic acid bacteria (pressurized or not) inhibited the growth of *P. phosphoreum*, active spoiler also involved in the spoilage of fish (Fig. 3c), since this bacteria

was just detected in control batch. Lactic acid bacteria counts did not differ between batches until day 9 ($p \leq 0.05$), and bifidobacteria remained viable in both batches covered with film (HF and HFP) during the storage time (Fig. 3e).

Initially the pH of the fish ranged close to 7. During the storage there was a slight decrease in pH values, especially in HFP batch ($p \leq 0.05$), probably due to the presence of lactic acid bacteria in the film which passed to the muscle (Fig. 4a). The control lot reached levels close to 8 to 9 days.

At the beginning of the trial, hake registered values close to 10 mg N-TVB/100 g muscle of total volatile basic nitrogen. These figures remained below 20 mg N-TVB/100 g muscle at 9 days of storage in the hake-film pressurized (HFP), while the control lot (H) and hake-film non-pressurized lot (HF) reached values higher ($p \leq 0.05$) than 60 mg-NBVT/100 g (Fig. 4b). These levels were according to the microbial counts (total bacteria counts and H_2S -producers microorganisms) registered for these batches, although pH recorded in the HF and HFP lots did not reflect the volatile basis levels achieved, respectively, for each of them. The combined treatment, edible film+ bacteria and high pressure presented certain synergism in the inhibition of volatile bases, as hake pressurized under the same conditions as those applied in the current assay obtained values > 35 -40 mg N-TVB/100 g muscle at 8-12 days of storage. Moreover, the application of the film did not confer strange odors to fish. Perhaps the presence of bifidobacteria could interfere in any way with the production of volatile basic compounds (e.g. competition for nutrients, etc.), by microorganisms such as *S. putrefaciens*, reducing its production to some extent, while the high pressure treatment inactivates or causes damage to these species involved in the fish spoilage.

In view of these results, we conclude that gelatin edible coatings and films could act as a matrix to incorporate lactic acid bacteria, since *L. acidophilus* and *B. bifidum* in major extend, remained viable even for 13 days. The application of these edible coatings and films was promising for fish preservation, especially in combination with high pressure treatment. Far from competing with other matrix as dairy products, vegetable beverages, etc., the incorporation of lactic acid bacteria to edible packages could be a way for these bacteria to be ingested together with fish. The combination of treatment allows reducing the level of high pressure applied so as not to adversely affect lactic acid bacteria incorporating to the edible coating and film, while maintaining the sensory characteristics of the raw product. Further studies are needed to study the possible competition between microbial species as well as to establish rate of diffusion from bacteria to muscle.

Acknowledgements

This research was financed by the Ministerio de Educación y Ciencia, under projects I3-200670I141, AGL2008-00231/ALI, AGL2011-27607, CYTED 309ACO382. Program JAE-CSIC predoctoral is fully acknowledged. The author thanks Joan Therese de Lacey for the English language revision of the article.

ICTAN-CSIC has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the requirements of the ISO standard 9001:2000.

References

- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., & Abadias, M. (2011). Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology*, *28*(1), 59-66.
- Antonacopoulos, N., & Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *189*(4), 309-316.
- Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkula, W., & No, H. K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, *25*(3), 534-537.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, *20*(1), 248-254.
- Cheftel, J.C. (1992). Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, and P. Masson (Eds.), *High Pressure and Biotechnology* (pp. 195–209). Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge.
- Do Espírito Santo, A. P., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M. N. (2011). Influence of food matrices on probiotic viability - A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science and Technology*, *22*(7), 377-385.

- FAO/WHO. 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, pp 11.
- García, T., Martín, R., Sanz, B., & Hernández, P-E. (1995). Revisión: Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 35(1), 1-18.
- Gennadios, A., Hanna, M. A., & Kurth, L. B. (1997). Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 30(4), 337-350. doi: 10.1006/fstl.1996.0202
- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402-2408. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.020
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2009). Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 46-52. doi: 10.1080/10498850802581252
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., & Gómez-Guillén, M. C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105(2), 511-520.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007
- Huss, H. H., Jeppesen, V. F., Johansen, C., & Gram, L. (1995). Biopreservation of Fish Products—A Review of Recent Approaches and Results. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 5-26. doi: 10.1300/J030v04n02_02
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373-386.

- López Caballero, M.E. 1998. Flora alterante de merluza (*Merluccius merluccius*, L.) refrigerada sometida a la acción de concentraciones variables de CO₂ y O₂. Identificación y actividad bioquímica de bacterias implicadas en el deterioro. *Doctoral Thesis*.
- López-Caballero, M. E., Álvarez Torres, M. D., Sánchez-Fernández, J. A., & Moral, A. (2002). Photobacterium phosphoreum isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in model system under controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 215(5), 390-395.
- Lopez-Caballero, M. E., Gomez-Guillen, M. C., Perez-Mateos, M., & Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.06.006
- López-Caballero, M. E., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M. D. C., & Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9), 1029-1038.
- López-Caballero, M. E., Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Borderías, A. J. (2000). Oyster preservation by high-pressure treatment. *Journal of Food Protection*, 63(2), 196-201.
- Ojagh, S. M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*, 125(2), 595-606.
- Paarup, T., Sanchez, J. A., Peláez, C., & Moral, A. (2002). Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 1-12.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Socol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.
- Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69(3), 167-182.
- Rydlo, T., Miltz, J., & Mor, A. (2006). Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *Journal of Food Science*, 71(9), R125-R135.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Kienberger, H., & Foerst, P. (2009). Changes in membrane fatty acids of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying with sorbitol. *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), 516-521.

- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, 17(9), 1107-1114.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A., & Martin-Belloso, O. (2007). Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. *Journal of Food Science*, 72(4), E190-E196. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00318.x
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78. doi: 10.1016/s0924-2244(02)00280-7

Figures

- Figure 1. Survival of *L. acidophilus* and *B. bifidum* counts (Log cfu/g) into film forming solutions (coating) and films stored at 2 ± 1 °C. a) (SLa): Films forming solution+*L. acidophilus*, (SBb): film forming solution+*B. bifidum*; b) (FLa): film+*L. acidophilus*, (FBb): film+*B. bifidum*.
- Figure 2. Microbial counts of hake coated with edible film forming solution during storage at 2 ± 1 °C. (H): control hake; (HS): hake dipped into solution; (HSB): hake dipped into solution+*B. bifidum*
- Figure 3. Microbial counts of hake covered with edible films under high pressure treatment during storage at 2 ± 1 °C. (H): control hake; (HF): hake film+*B. bifidum*; (HFP): hake film+*B. bifidum*-pressurized
- Figure 4. a) pH and b) total volatile bases of hake covered with edible films under high pressure treatment during storage at 2 ± 1 °C. (H): control hake; (HF): hake film+*B. bifidum*; (HFP): hake film+*B. bifidum*-pressurized.

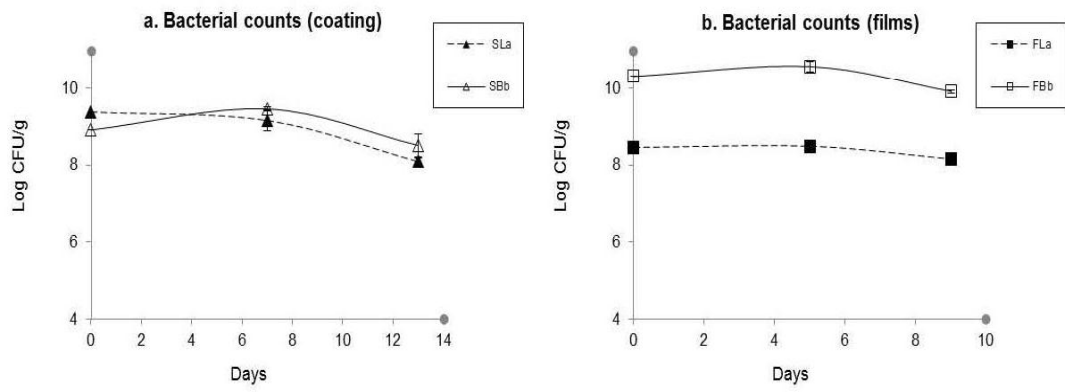


Figure 1.

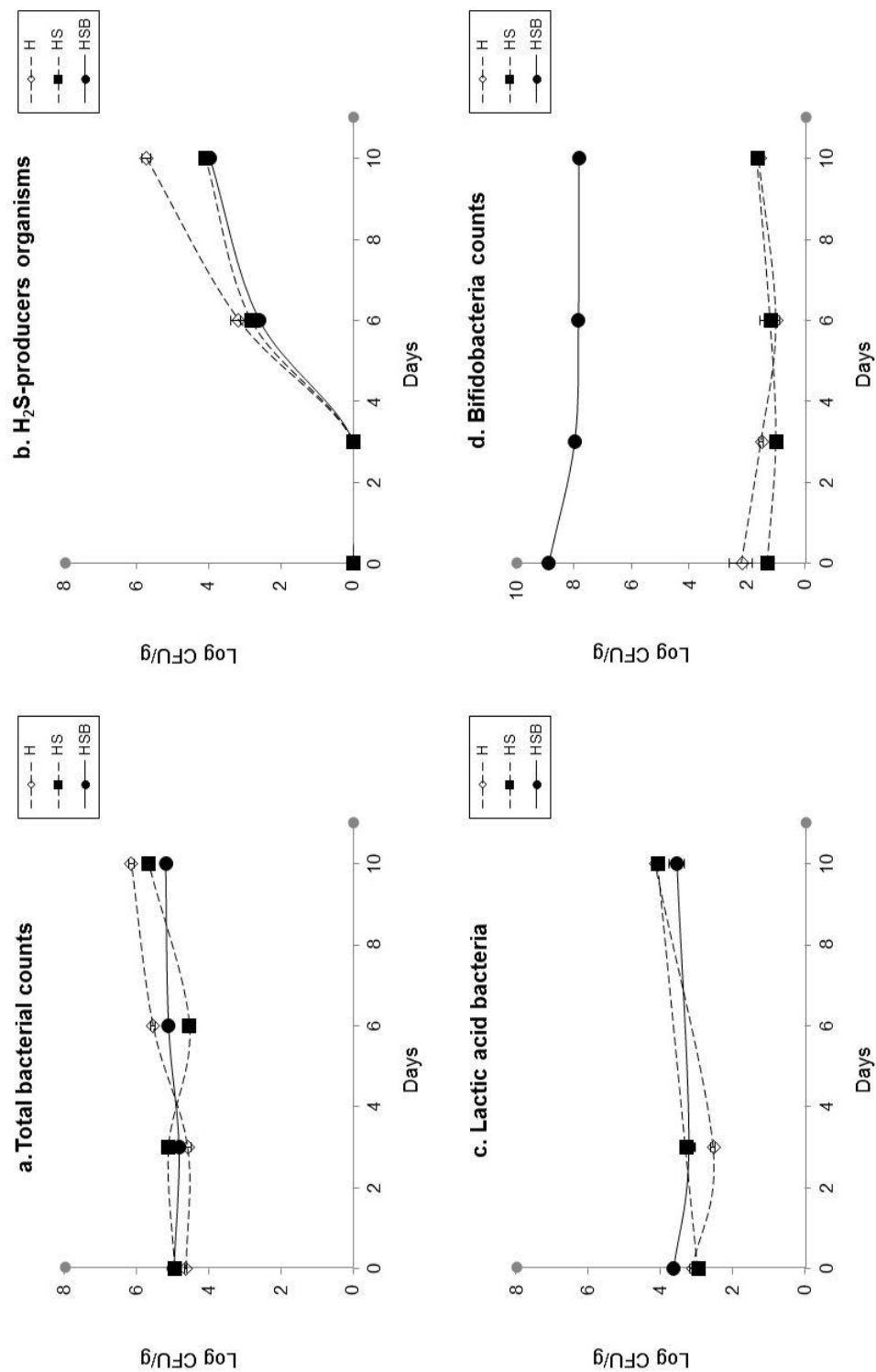


Figure 2.

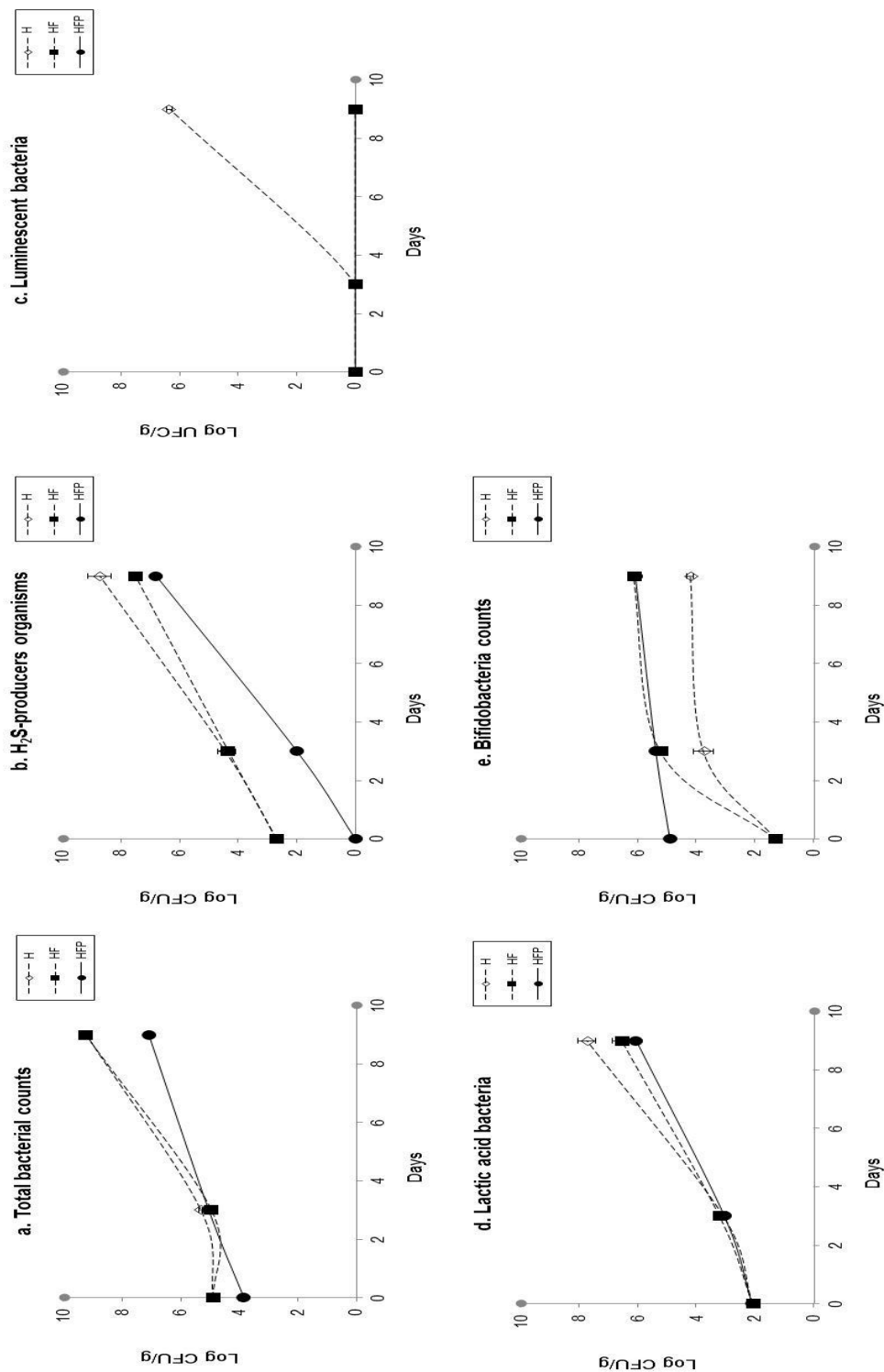


Figure 3.

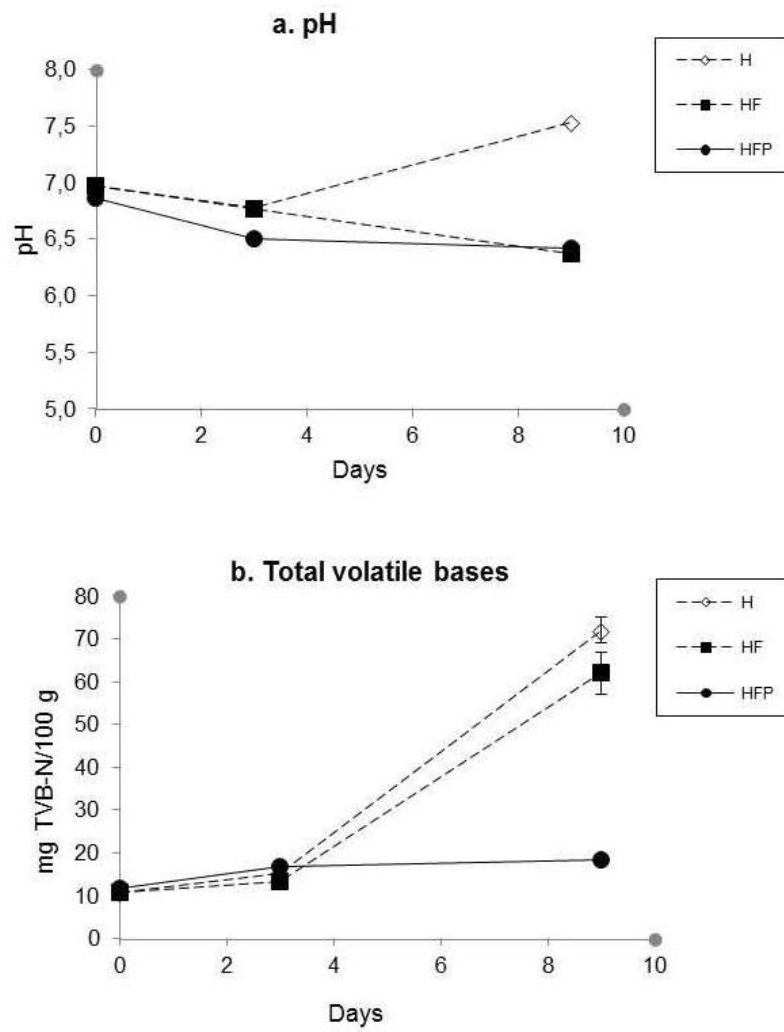


Figure 4.

ARTÍCULO 6

López de Lacey, A.M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M.E. y Montero, P. (2012)

Survival and metabolic activity of probiotic in green tea

LWT - Food Science and Technology

SURVIVAL AND METABOLIC ACTIVITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN GREEN TEA

A. M. López de Lacey, E. Pérez Santín, M. E. López-Caballero*, and P. Montero

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC. (formerly Instituto del Frío), C/ José Antonio Nováis, 10, 28040. Madrid, Spain.

*Corresponding author: E-mail address: elvira.lopez@ictan.csic.es

Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the enzymatic activity and survival of three probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* LAFTI@L26, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI@L10 and *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* LAFTI@B94) during incubation in six different varieties of green tea extracts. The polyphenol content, antioxidant properties, ACE-inhibition and antimicrobial activities of two standards (epigallocatechin-3-gallate and rutin) were also investigated, and in the *Wu Lu Mountain* green tea variety before and after incubation with *B. animalis* B94.

The tea extracts in general permitted the survival of the selected probiotic strains, with *B. animalis* B94 maintaining the highest levels of viable cells, around 6 log CFU/mL, at the end of incubation. The selected probiotic bacteria exhibited β -glucosidase, β -galactosidase and α -ramnosidase activity. The antioxidant properties and ACE-inhibition of standard solutions of epigallocatechin-3-gallate and rutin increased after incubation with *B. animalis* B94, caused by polyphenol content reduction and the formation of other more highly biologically active metabolites. However, during the incubation of green tea with probiotic bacteria, changes in the concentration of the most abundant green tea polyphenols did not enhance the biological capacity. Thus, the antimicrobial activity and ACE-inhibition of *Wu Lu Mountain* green tea, incubated with or without *B. animalis* B94, registered similar behaviour throughout incubation.

Key words: green tea, polyphenols, probiotic bacteria, biological activity.

1. INTRODUCTION

Green tea, one of the most consumed beverages, is produced with unfermented leaves and buds from the plant *Camellia sinensis* L. (Costa, Gouveia, & Nobrega, 2002). These components are rich in flavan-3-ols (epicatechin, catechin and galloylated derivatives), which are responsible for the majority of the beneficial properties of green tea. Other major polyphenols present in green tea are the flavonols, mainly derivatives of quercetin and kaempferol (principally glycosylated). Green tea also contains other compounds like tea pigments, amino acids, vitamins, carbohydrates, minerals and purine alkaloids (Graham, 1992). The beneficial effects of green tea have been attributed to all these compounds, but principally to polyphenol phenolic compounds because of their high antioxidant properties (Bolling, Chen, & Blumberg, 2009; Isiguki, Takakuwa, & Takeo, 1991; Weisburger & Chung, 2002).

Probiotic bacteria, with a wide variety of positive health effects, are principally members of the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* family. Probiotics have been extensively studied and explored commercially in many different products, including dairy products like cheese, yoghurt and ice cream, and non-dairy products such as soy, fruit, vegetables, legumes and cereals (Champagne, 2009; Socol et al., 2010). Probiotic microorganisms contribute to intestinal balance, play a role in maintaining health and can even improve the quality of some products formulated with them (Arora, Jood, & Khetarpaul, 2010; Socol et al., 2010).

The fermentation of foods with probiotic microorganisms could improve or add additional beneficial properties to the product. This is because some probiotic bacteria possess certain enzymatic activities (such as deglycosylation, ring-fission, dehydroxylation, demethylation or decarboxylation, etc.) (Aura, 2008), that are capable in some cases, of transforming polyphenols into compounds which are even more bioavailable or bioactive than the original polyphenol. (Donkor & Shah, 2008; Tsangalis, Ashton, McGill, & Shah, 2002; Uskova, Kravchenko, Avrenjeva, & Tutelyan, 2010). However, despite the beneficial properties contained in the composition of green tea, green tea has rarely been used as a food matrix for probiotics. Nevertheless, Kombucha is a microbial fermented tea made from tea extract supplemented with sugar, yeast and acetic-acid bacteria, the latter being responsible for the fermentation (Mo, Zhu, & Chen, 2008). Furthermore, no published reports have been found that deal with the effect of the commercial bacteria selected for this study (*Lactobacillus acidophilus* LAFTI®L10, *Bifidobacterium lactis* LAFTI®B94 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI®L26) on green tea polyphenols. The aim of this work was to study the survival of these

three different probiotic bacteria in different varieties of green tea infusions, determine their enzymatic activity and if they were able to transform polyphenols in the infusions while maintaining the initial properties of the teas tested. The survival of these probiotic bacteria in the two different polyphenol solutions selected, and the transformation of polyphenols by the bacteria was also studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Standard polyphenol compounds: (-)-epigallocatechin gallate (CAS: 989-51-5) and rutin (CAS: 153-18-4) were purchased from Extrasynthese (Genay, Cedex, France).

Reagents for enzyme activity assay: *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, *p*-nitrophenyl- α -D-ramnopyranoside, *p*-nitrophenol were provided by Sigma-Aldrich (Stenheim, Germany).

HPLC-MS: HPLC grade methanol, acetonitrile and formic acid (VWR international, Inc., Barcelona, Spain). HPLC grade water was prepared from distilled water using a Milli-Q system (Millipore Laboratory Bedford, MA).

Antioxidant activity; FRAP: (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine), FeCl₃ and FeSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). ABTS: [2,2'-azino-*bis*-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], potassium persulphate, Vitamin C (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA).

Reagents for ACE-inhibition: HHL (Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine), ACE (CAS: 9015-82-1), potassiumphosphate buffer, containing 300 mM NaCl, pH 8.3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

Lyophilized strains of *Lactobacillus paracasei* LAFTI@L26, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI@L10 and *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* LAFTI@B94 were purchased from DSM (DSM Food Specialties Ltd., Sydney, Australia) and kept at -20 °C.

For experiments, one portion of each lyophilized strain was dissolved in broth medium. Then one aliquot of this solution was streaked on agar plates which were incubated at 37 °C for 24 h. *B. animalis* B94 were incubated under anaerobic conditions. Then, one colony of each strain was transferred into broth medium and grown at 37 °C for 24 h. *Lactobacillus paracasei*

LAFTI@L26 and *Lactobacillus acidophilus* LAFTI@L10 were incubated in MRS, but the MRS culture medium for *B. animalis* B94 was supplemented with 0.05% cysteine.

2.3. Enzyme activity assay of probiotic strains

Activity assays were carried out using the method of Ávila et al. (2009), but with some modifications. Probiotic bacteria were grown as explained above and then the cells were harvested by centrifugation (6,000 g, 10 min, 5 °C) and washed twice with 50 mM sodium phosphate buffer, pH = 7. The harvested cells were suspended in the same buffer to an OD₆₂₀ ~ 0.6.

β -Glucosidase, β -galactosidase and α -ramnosidase activity was measured in triplicate with *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside and *p*-nitrophenyl- α -D-ramnopyranoside respectively as substrate. This was done first by mixing 450 μ L of 5 mM substrate prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, with 50 μ L of the cell's suspension and incubated at 37 °C for 110 min. Then the reactions were stopped on ice by adding 500 μ L of Na₂CO₃ 0.2 M. and the amount of *p*-nitrophenol released was measured at 410 nm spectrophotometrically. One unit of enzyme activity was defined as the amount of β -glucosidase or β -galactosidase or α -ramnosidase that 1 nanomole of *p*-nitrophenol released from the substrate per millilitre per minute under the assay conditions (Otieno, Ashton, & Shah, 2005).

2.4. Infusion preparation

Six kinds of green teas were tested in this study: *Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi*, *Cinnamon Green Tea*, *Lung Ching*, *China White Hair* and *Wu Lu Mountain*. All these green teas were purchased from a specialized local shop (La Antigua Plantación, Madrid, Spain).

The preparation of green tea extract was carried out according to the method described by López de Lacey, López-Caballero, and Montero (2011). Briefly, 35 g of each leaves was pulverized in a blender (Osterizer) and mixed with 350 mL of water (milli-Q) at 80 °C for 30 minutes, with constant shaking and was then centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at 5 °C. The supernatant was filtered two times through Whatmann N°1 filter papers. The infusion filtered was stored at – 20 °C before the analysis.

2.5. Survival of bacterial strains in green tea extracts

First the strains (*L. paracasei* L26, *L. acidophilus* L10 and *B. animalis* B94) were grown as previously explained. The cells were then harvested by centrifugation (6,000 g, 10 min, 5 °C), washed twice with 0.9% NaCl solution and suspended in the same solution 0.9% NaCl to an OD₆₂₀ ~ 0.6. One aliquot of 50 µL of harvested cells adjusted to OD₆₂₀ ~ 0.6 was mixed with 950 µL of green tea extract to study the survival rate of bacteria in green tea extracts. 50 µL of 0.9% NaCl solution was used as control. The bacterial strains were incubated at 37 °C for 72 h as mentioned above. The final concentration of bacteria was approximately 10⁶ CFU/mL.

The viable cells were determined at 0, 24, 48 and 72 h of incubation in the green tea extracts by analysing 100 µL of each culture with the microdot method (Strahsburger, Baeza, Monasterio, & Lagos, 2005) on MRS agar for the *Lactobacillus* strain and 0.05% cysteine MRS agar for *B. animalis* B94. All the counts were performed at least in triplicate.

2.6 Survival of *B. animalis* B94 in two separately prepared polyphenol standard solutions: epigallocatechin 3-gallate and rutin

Determining the survival of *B. animalis* B94 in two standard polyphenol solutions was performed, first by mixing 1 mL of harvested cells adjusted to OD₆₂₀ ~ 0.6 in 19 mL of 0.9% NaCl solution. The standards were firstly dissolved in HPLC grade methanol before being added to the NaCl solution. The same concentration of standards was used in all the samples in order to compare the effect on probiotic survival of each compound. The final concentration of the bacteria was approximately 10⁶ CFU/mL and the final concentration of each standard in this solution was 25 µg/mL. *B. animalis* B94 growth was not affected by the methanol. The incubation conditions and the counting of *B. animalis* B94 was carried out as explained above.

2.7. Biotransformation of green tea polyphenols and standard solutions by *B. animalis* B94

The study of polyphenol biotransformations by *B. animalis* B94 was performed in the *Wu Lu Mountain* green tea variety and in two separately prepared polyphenol standard solutions, epigallocatechin-3-gallate and rutin. Both green tea polyphenol and standard solution samples incubated with the bacteria, were prepared exactly as described in the preceding section. In the case of green tea extract, 1 mL of harvested cells adjusted to OD₆₂₀ ~ 0.6 were mixed with 19 mL of *Wu Lu Mountain* infusion. One aliquot of the solution was taken for the different analyses (counts, HPLC-MS, antioxidant activity and antimicrobial activity) at 0, 24, 48 and 72 h

of incubation at 37 °C. The viable cells were measured using the microdot method explained above. After counting, each aliquot was centrifuged for 10 min. at 6,000 g, 5 °C and the supernatant was kept for the rest of the analyses. All the analyses were performed at least in triplicate, except for the HPLC-MS analysis which was carried out in duplicate.

2.8. Quantification of polyphenols by HPLC-MS

Reverse phase high performance liquid chromatography was performed to analyse phenolic compounds present in the aqueous green tea extract. The separation module consisted of an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany), equipped with a C18 size column (250 x 4.6 mm, 5 µm, C18 Tracer Excel ODS-A column, Teknokroma) and a diode array detector (DAD). The samples were eluted with a gradient system consisting of solvent A (deionized water) and solvent B (acetonitrile) both containing 1% formic acid, used as the mobile phase, with a flow rate of 1 mL/min.

The temperature of the column was maintained at 25 °C and the injection volume was 20 µL. The gradient system started at 90% solvent A and decreased to 74% A within 40 min, followed by a decreased to 35% solvent A in 10 min. The final conditions were held for an additional 5 min. The peaks of the phenolic compounds were monitored by atmospheric pressure electrospray ionization source (ESI), operated in negative ion mode, with the electrospray capillary voltage set to 3000 V, a nebulizing gas flow rate 12 L/h, and a drying temperature of 350 °C. Mass spectrometry data were acquired in the scan mode (mass range m/z 200-700) and in the sim mode (m/z 289, 305, 441, 441, 447, 457, 609).

The quantification was carried out using the external standard method. Solutions of each standard at various concentration levels of 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L. were injected into column and the elution was performed in the same manner with the samples. Individual compound was quantified using a calibration curve of the corresponding standard compound.

2.9. Antioxidant activity before and after biotransformation

2.9.1. FRAP

The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay was carried out according to the method described by (Benzie & Strain, 1996) with some modification (Alemán et al., 2011). This assay measures the change in absorbance at 595 nm owing to the formation of a blue colored FeII-tripyridyltriazine compound from the colourless oxidized FeIII form by the action

of electron donating antioxidants (Benzie, Chung, & Strain, 1999). An amount of 60 μL of sample was incubated (37 $^{\circ}\text{C}$) with 60 μL of Milli-Q water and 900 μL of FRAP reagent, containing 10 mM of TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) and 20 mM of FeCl_3 . Absorbance values were read at 595 nm after 30 min, using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ equivalents/g of sample based on a standard curve of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. All determinations were performed at least in triplicate.

2.9.2 ABTS

The ABTS radical [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] scavenging capacity was carried out according to the method of Re et al., (1999). The amount of ABTS radical cation scavenged by antioxidants is measured by monitoring the decrease of absorbance of ABTS radical cation, and compared with the decrease of absorbance produced by the addition of known amount of vitamin C. The stock solution of ABTS radical consisted of 7 mM ABTS in potassium persulphate 2.45 mM, kept in the dark at room temperature for 16 h. An aliquot of stock solution was diluted with Milli-Q water in order to prepare the working solution of ABTS radical with absorbance at 734 nm of 0.70 ± 0.02 . An aliquot of 20 μL of sample was mixed with 980 μL of ABTS reagent. The mixture was then left to stand in the dark at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min and absorbance values were read at 734 nm using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g of sample based on a standard curve of vitamin C. All determinations were performed at least in triplicate.

2.10. ACE-inhibition

The reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to determine the ACE inhibition capacity of the green tea polyphenols and green tea extract. The method was according to Wu, Aluko, and Muir (2002) with some modifications (Alemán et al., 2011). The total reaction volume was 230 mL, made up of 50 mL of 5 mM HHL (Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine), 160 mL of 0.025 U/ml of ACE and 20 mL of sample (all prepared with 100 mM potassiumphosphate buffer, containing 300 mM NaCl, pH 8.3). The mix was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 120 min in a water bath with continuous agitation at 160 shaking/min (OSL 200, Grant Instruments Ltd., Cambridge, England) and the reaction was quenched by addition of 100 mL 0.1 M HCl. The released hippuric acid (HA) was quantified by RP-HPLC (model SPE-MA10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japan) on a C18 column (Tracel excel, 120 ODSA 5 mm,

Teknokroma, Barcelona, Spain). The injection volume was 50 mL and the flow rate 0.8 mL/min using an acetonitrile gradient from 20% to 60% in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) for 26 min. The HA and HHL were monitored at 228 nm and eluted at 8.30 and 15.70 min, respectively. All determinations were carried out at least in triplicate.

2.11. Quantitative antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the *Wu Lu Mountain* green tea before and after incubation with *B animalis* ssp *LAFTI@B94* was tested over the following bacterial strains obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT): *Aeromonas hydrophila* CECT 839T, *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T, *Pseudomonas fluorescens* CECT 4898, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511T. The strains were stored at -80 °C in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) with 25% glycerol (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) until use. In order to perform the tests, all the strains were previously grown in BHI broth (Oxoid) (supplemented with 3% NaCl for *V. parahaemolyticus*, 1% NaCl for *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens*). *Vibrio parahaemolyticus* was incubated at 37 °C; *A. hydrophila*, *P. fluorescens* and *S. putrefaciens* were incubated at 30 °C and *P. phosphoreum* at 15 °C.

The antimicrobial activity of the green teas was tested over five selected microorganisms. Spread plates of BHI agar (supplemented as needed) were inoculated with 100 µL of bacterial suspensions microorganism (10^5 - 10^6 CFU/mL). Filter paper disks (0.5 cm diameter), soaked with 50 µL of each green tea solutions, and were put on the plate surface. The time and temperature of incubation was the same as previously described above. After incubation, the diameter of growth inhibition (in mm) was considered as a measurement of the antimicrobial activity. A minimum of three replicates disks was used.

2.12. Statistical analyses

Statistical tests were performed using the SPSS® computer program, version 19.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Probiotic bacteria activity

The enzyme activities (β -Glucosidase, β -galactosidase and α -ramnosidase) of the three probiotic strains were tested after 110 min of incubation at 37 °C (Table 1). The importance of analysing these activities is because the deglycosylation catalysed by these enzymes is considered the first step in glycosylated flavonol metabolism (Aura, 2008; Braune & Blaut, 2011; Serra et al., 2012). All the strains presented the three activities, but with α -rhamnosidase registering the lowest activity levels in all the probiotic organisms tested. Rutinosides are only metabolized by intestinal microflora (Scalbert & Williamson, 2000) since no human α -rhamnosidases exist. The production of α -rhamnosidases by some strains of *Bacteroides* and *Lactobacillus* has also been described by other authors (Avila et al., 2009; Beekwilder et al., 2009; Bokkenheuser, Shackleton, & Winter, 1987). However, to our knowledge no α -rhamnosidase activity has been found in any literature with regard to the *Bifidobacterium* species. *L. paracasei* L26 and *B. animalis* B94 showed more β -galactosidase activity than β -glucosidase, but it was *L. acidophilus* L10 that exhibited the highest values for the majority of the enzymes, except for α -rhamnosidase which was the lowest value. In this respect, Donkor et al. (2008) and Otieno, Ashton, and Shah (2006) found that *L. acidophilus* L10 presented the highest β -glucosidase activity compared to *B. animalis* B94 and *L. paracasei* L26 between 24-36 h of incubation and *Bifidobacterium* spp. and *L. paracasei* L26 at 24 h of fermentation in soy milk.

In our work, *L. acidophilus* had the higher levels at 110 minutes of incubation for both activities, producing the highest β -glucosidase activity compared with the other probiotics tested over a very short period. These results might have been affected by the cell stage (stationary or exponential phase), the carbon source of the growth medium or the concentration of substrate during analysis. Raimondi et al. (2009) observed that the production of the aglycone form, daidzein, from the glycosylated form, daidzin, by the action of β -glucosidase, present in several strains of *Bifidobacterium*, occurred mostly during the exponential growth phase. Different values for *Bifidobacterium* β -glucosidase activity were detected by Tsangalis et al. (2002) depending on the carbon source of the growth medium.

L. paracasei L26 and *B. animalis* B94 behaved in a similar way and no significant differences were observed except for β -galactosidase which was higher in *L. paracasei* L26.

According to Donkor et al. (2008) and Otieno et al. (2005) the differences between the β -glucosidase activities of various bacteria could be due to strain specificity.

3.2. Survival of bacteria strains in green tea

Three commercial probiotic strains were selected to determine which would be able to survive in the different teas. We started by deciding that six teas could be used as a potential power source since β -Glucosidase, β -galactosidase and α -ramnosidase were active in the three selected strains.

The total viable counts (expressed as log CFU/mL) of three commercial probiotic strains in six green teas extracts incubated for 72 h at 37 °C are shown in table 2. These bacteria cannot survive for more than 1 day in 0.9% NaCl solution (control) with the exception of *L. paracasei* L26 which can survive for 2 days, even though the *L. paracasei* L26 count is nearly halved at 48 h of incubation. These results were as expected, taking into account the fact that the strains survived at 37 °C without any source of energy. Similar results were obtained by Santini et al. (2010), who studied the survival of eleven strains belonging to the *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Bifidobacterium sp.* during nutrient starvation at 37 °C in phosphate buffered saline (PBS) for 0, 6, 12 and 24 h.

All the infusions, except for cinnamon green tea, permitted a higher cell survival rate during incubation than the control. None of the three commercial probiotics were able to survive in the cinnamon green tea. This fact could be attributed to some cinnamon components that caused the death of the cells. Antimicrobial activities of cinnamon water infusions and oils against several species including *Lactobacillus sp.* have been reported (Ceylan & Fung, 2004). In general, bacteria viability was very similar in all the infusions though some values fell on the third and fourth days. *L. acidophilus* L10 seemed to need higher requirements to survive than the other bacteria grown in GTEs because the number of cells fell at 24 h (< 20%) and died at 48 h of incubation independent of the tea used. However, *L. acidophilus* L10 was more susceptible to *Lung Ching* tea extract, which had a lower flavonoid content than the other teas (López de Lacey et al., 2011). *Japan Sencha Makinohara*, *Gyokuro Asahi* and *Wu Lu Mountain* teas permitted a greater survival of probiotics, mainly *L. paracasei* L26 and *B. animalis* B94, followed by *China White Hair* and *Lung Ching* teas. *L. acidophilus* L10 probably needs to take its energy from other sources present in GTEs, and bacteria with glucosidase activity could utilize the sugar moiety of glycosylated flavonoids (Schneider, Schwiertz, Collins, & Blaut, 1999). *L. acidophilus* L10, which was the strain with the highest

levels of β -glucosidase and β -galactosidase, might be more active over a shorter period of time than the others and might consume the sugars from the glycosylated flavonoids quicker than the other species. In addition, *L. acidophilus* L10 had very low levels of α -rhamnosidase compared to the other two probiotics. Moreover, the flavonoids linked to rhamnose are metabolized by *L. acidophilus* L10 in minor quantities than the other strains. The selected green tea infusions have among their main flavonoids, rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside which contain rhamnose in their structures (López de Lacey A. M., 2011).

L. paracasei 26 maintained a level of counts above 5.7 log CFU/mL ($\geq 95\%$) after about 72 h of incubation in almost all infusions except *Lung Ching* and *China White Hair* ($< 20\%$). In contrast, *B. animalis* B94 maintained a level of counts above 6.14 log CFU/mL after approximately 72 h of incubation in all GTEs except in *Japan Sencha Makinohara* where counts fell partially (3 units). From the foregoing it can be concluded that in general *B. animalis* B94 maintained higher levels of viable cells at the end of incubation (72 h) than *L. paracasei* L26 in GTEs. Diminishing nutrients could explain some of the reductions in the number of viable cells (Table 2).

No information has been published on probiotic survival in GTEs. This is because most studies are focused on probiotic growth in yoghurt, fermented milks or soy (recently appearing on the market) as they are the most important fermented products containing probiotic bacteria (Champagne, 2009). Recent research carried out by Shah, Ding, Fallourd, and Leyer (2010), studied the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using antioxidants such as green tea extracts (the type of tea was not specified). These authors showed that the probiotic bacteria improved when green tea extract was incorporated in the model juice and concluded that green tea extract creates a more favourable anaerobic environment for probiotic bacteria due to its oxygen-scavenging and antioxidants properties.

In general, some green tea extracts can serve as good media for probiotic strains without the addition of extra sugars because the viable counts at 37 °C are maintained for at least 72 h of incubation in some cases. After that time the number of cells diminishes gradually, therefore the viability of probiotics cannot be confirmed after that period. However, the survival of probiotics in these GTEs could be improved by adding sugars from other sources. Many ingredients could be added to the teas to permit optimum survival or growth of the probiotic strains, for example, the fermented green tea *Kombucha* is supplemented with sugar.

3.3. Survival of *Bifidobacterium animalis B. animalis* B94 in standard polyphenol solutions

As polyphenolic compounds do not all have the same effect on the survival rate of microorganisms, some polyphenols were selected (as standard) to evaluate the survival of a probiotic (*B. animalis* B94) in the presence of each of them, as a unique source of energy. The selection of the two polyphenols was based on the phenolic compound composition of the green teas, choosing the major catechin and flavonols (López de Lacey et al., 2011).

The viable counts of *B. animalis* B94 in two different solutions, prepared with two types of standard polyphenols, are shown in table 3. A decrease of viable counts was observed at 24 h of incubation in all the solutions, and after 24 h, the counts were below the control values (88.73%) in all samples. A 50% viable cell reduction was observed in the epigallocatechin-3-gallate solution after 24 h of incubation. It is important to note that the rutin solution prolonged the survival time of *B. animalis* B94 up to at least 48h of incubation, thus surviving more time in the presence of rutin than in epigallocatechin-3-gallate. The enzymes β -Glucosidase, β -galactosidase and α -rhamnosidase are capable of breaking down the *O*-glucosidic, galactosidic and rhamnosidic linkages, respectively, which are present in glycosylated flavonoids. *B. animalis* B94 can produce these enzymes during incubation in order to obtain the sugars linked to the flavonols, thus permitting the bacteria to survive longer. It is also important to note that though the probiotic strain survived longer, it was with fewer cells. The reason why the sugar obtained from the rutin did not permit the survival of more cells could be due to there not being sufficient standard rutin. The concentration of polyphenols was very small for the bacteria populations and a larger concentration of phenolic compounds might have prolonged the survival of more cells. Short periods of incubation (less than 24 h) might facilitate the observation of major differences between the control and sample.

3.4. Biotransformation of standard polyphenols by the presence of *B. animalis* B94

Figure 1 shows the concentration of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and rutin during incubation with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C.

Significant differences between samples were observed after 24 h of incubation in the EGCG. In the case of rutin, the significant differences also detected after 48 h of incubation were attributed to less α -rhamnosidase activity, which would mean that this strain would need more time to act. Serra et al. (2012) observed the same in microflora from rats, since the metabolism of flavonoids was produced between 24 and 48 h of incubation.

A slight drop in EGCG solution concentration was observed when no bacteria were present. This decrease in concentration could be due to polyphenol instability during the incubation because of the pH of the solutions (pH ~ 6). Stability studies have demonstrated that green tea catechins can undergo many changes such as oxidation and epimerization in solutions with pH > 6 (Ananingsih, Sharma, & Zhou, 2011; Neilson et al., 2007; Roginsky & Alegria, 2005). Although the oxidation of EGCG can be reduced under low O₂ partial pressure (condition of experiments), epimerization can still occur (Sang et al., 2005). This reduction in the polyphenol EGCG was small compared with the decrease in the presence of probiotic bacteria. EGCG suffered a practically total loss of concentration after 24 h incubation with the strain.

On the other hand, rutin levels incubated without bacteria were maintained constant throughout the period studied; therefore rutin offered more stability than EGCG in the absence of bacteria. The decrease in rutin levels was less pronounced than the reduction of EGCG concentration after incubation with bacteria. This could indicate either a minor affinity by *B. animalis* B94 to these phenols, or that rutin suffers less transformation than EGCG.

3.5. Biotransformation of the majority of polyphenols present in green tea extract (*Wu Lu Mountain*) by the presence of *B. animalis* B94

Figure 2 shows the concentration of each polyphenol during incubation in green tea extract with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C. It is important to note that the concentration of the ten tested polyphenols was variable. The majority of the polyphenols were EGCG and EGC followed by ECG and EC. Catechins and the other flavonols registered values of between 50-25 µg/mL. Thus, it is important to take into account that the concentration of EGCG and rutin in the *Wu Lu Mountain* infusion was nearly 300-fold and 2-fold higher, respectively, than the concentration used in the standard solutions.

The flavonoid concentration levels decreased in all the samples, with and without bacteria, but the glycosylated flavonoid concentration in tea was higher when incubated without *B. animalis* B94 ($p < 0.05$) On the other hand, the differences between the flavan-3-ols concentrations of treated and untreated tea were less pronounced. For example, there were differences between the epicatechin-3-gallate concentration of tea incubated alone and with bacteria (fig. 2.4) ($p < 0.05$), although the epigallocatechin concentrations of tea, with or without bacteria, were statistically equal during the whole incubation (fig. 2.1.) This fact could be due either to the high concentrations of catechin extracts in green tea (low bacteria

quantitates for transformation of high catechin quantitates) or be associated with the instability of green tea solutions at 37 °C. The polyphenols incubated without bacteria were more unstable in green tea solutions than in pure solutions (pH > 6) in spite of tea infusions having an inferior pH (~5.7). Suzuki et al. (2003) observed that the epimerization rates of authentic tea catechins in distilled water are much lower than those in tea infusion or in pH 6.0 buffer solutions. They indicated that the metal ions in tea infusions could affect the rate of epimerization of catechins, although other compounds present in this green tea variety, such as carbohydrates, amino acids or minerals might also have an influence on the instability of green tea polyphenols.

Flavan-3-ols can be transformed by bacteria and degraded at the same time at different rates. The rate of catechin degradation in green tea solutions at 37 °C could be faster than the rate of catechin transformation by bacteria. If so, this could explain the slight differences between tea extracts with and without *B. animalis* B94 at certain points in the incubation process, like for example in catechins, epicatechins and epigallocatechin-3-gallate (Fig. 2.2, 2.3, and 2.5).

The catechins of one green tea extract (*Wu Lu Mountain*) incubated with this probiotic bacteria were less transformed than in the standard solutions, suggesting that the biotransformation of catechins by *B. animalis* B94 is affected by the matrix in which the bacteria grows. The glycosylated flavonoids were biotransformed by *B. animalis* B94 in spite of their low concentration compared with that of catechins. In this case, it seems that the degradation rate might be inferior to the transformation rate by the bacteria at 37 °C.

The flavonol quercetin 3-*O*-galactoside was the most affected in green tea extract by the presence of the bacteria, followed by rutin. Kaempferol 3-*O*-rutinoside was the least biotransformed by *B. animalis* B94 compared with other flavonols. The results obtained for quercetin 3-*O*-galactoside might be due to enzyme activity because β -galactosidase was more active in *B. animalis* B94 than β -glucosidase and α -rhamnosidase. *Wu Lu* tea extract contains catechins (33.3%) and flavonols (approx. 0.49%), but also an important amino acid (53.78%) and carbohydrate (9.51%) content, together with an appreciable total mineral content (2.92%), (López de Lacey et al., 2011). As it seems that there are other tea compounds that are consumed by bacteria before they transform polyphenols, it would be interesting to study the effect of the amount of bacteria in relation to tea in future studies.

3.6. Antioxidant properties before and after biotransformations

3.6.1. EGCG and rutin solutions

The antioxidant capacity of EGCG and rutin during incubation with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C are described in figure 3 in terms of radical scavenging capacity (ABTS) and iron reducing power (FRAP). A solution with the probiotic commercial organism was prepared and incubated under equal conditions in order to determine the possible antioxidant activities contributed by the bacteria, as bacteria could exhibit antioxidant properties as reported by Kullisaar et al. (2002). In any case, the presence of bacteria without polyphenolic compounds showed no antioxidant activity (by ABTS or by FRAP) and no bacterial metabolites that would complement this activity (Fig. 3).

The antioxidant activity by ABTS (fig. 3.1 and 3.3) of the two untreated polyphenols remained quite stable during the whole incubation period (72 h). However, EGCG without bacteria showed greater activity than rutin incubated alone. The presence of bacteria produced a noticeable increment in EGCG antioxidant properties, doubling even the initial value. This rise in antioxidant activity would seem to indicate that EGCG was transformed by the bacteria, because there was a direct relationship between the disappearance of EGCG during incubation with the bacteria (fig 1.1) and the increase in antioxidant activity (fig 3.1). The antioxidant activity produced by ABTS, as shown by rutin, is significantly lower than that of EGCG, and no differences were observed when the polyphenol was incubated with the bacteria. Although there were differences at 24 h of incubation, the variations were no greater. In the case of rutin, antioxidant activity did not seem to be more closely related to changes in polyphenol content suffered during the whole incubation period (with and without bacteria) and small variations in the activity of radical scavengers. Theoretically, bacterial activity can transform glycosylated flavonoid forms into their respective aglycones which normally possess more antioxidant activity. In fact, the quercetin aglycone exhibits more antioxidant activity (ABTS) than rutin (Cai et al., 2006). Thus, the aglycone might have been formed previously by the bacteria and then transformed into other metabolites such as phenylacetic or hydroxyphenylacetic acids with different antioxidant activities (Aura, et al., 2002; Serra et al., 2012).

The disappearance of rutin might be due to its deglycosylation by two enzymes: β -glucosidases and α -rhamnosidases (Uskova et al., 2010). The decrease in glycosylated forms

could occur to a lesser extent in the early hours of incubation than towards the end, close to 72 hours, so this does not apply to the majority of surviving bacteria.

Figures 3.2 and 3.4 show the FRAP analysis of EGCG and rutin respectively during incubation with and without *B. animalis* B94 for 72 h at 37 °C. The antioxidant values of EGCG incubated without bacteria suffered a slow and progressive decline (fig 3.3).

Increments in the FRAP analysis of EGCG were minor compared with those in the ABTS analysis mainly in the first 24-48 h, which coincides with the largest number of surviving bacteria (fig 3.1 and fig 3.2). It could occur that bacteria transform the EGCG into compounds which show greater antioxidant power when analysed by ABTS, although further studies are needed to clarify this fact.

The presence of probiotic bacteria also produced an increase in the iron reducing activity of rutin. Although this increase was not very pronounced compared to EGCG, it was enough to show that the bacteria are transformed into other metabolites from aglycone forms which probably have greater reducing power. In fact, some metabolites like 2-(3,4-dihydroxyphenyl) acetic acid produced by the colonic degradation of flavonoids can exhibit higher values in the FRAP assay than quercetin, but smaller values than quercetin in the ABTS assay (Dueñas et al., 2011). In this case, the possibility of sugars being released into the environment and remaining there must be considered, which might alter the reducing activity of iron, or be consumed by the surviving bacteria. Uskova et al. (2010) observed that *Lactobacillus casei* 114001 increased the effectiveness of rutin biological activity (antioxidant capacity in plasma) when probiotics and flavonoids were administered to rats.

3.6.2. Green tea extracts

Figure 3.5 shows the ABTS analysis of green tea extracts during incubation with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C. The antioxidant capacity values of green tea incubated with and without bacteria were significantly different after 24 h of incubation ($p < 0.05$). The antioxidant activity (ABTS) decreased throughout the whole period of incubation in both cases, but the presence of bacteria diminished antioxidant activity to a greater extent than in the control sample. The presence of other compounds such as metals, proteins, carbohydrates, etc. and even those compounds transformed by bacterial activity, did not favour the individual radical chelating activity potential of polyphenols contained in the tea extract. This may be due to multiple mechanisms that interfere with the presence of polyphenol in a free manner. In this regard, one of the main causes, or at least the most widely

reported is the interaction with proteins and / or amino acids, and metal ions (Argyri, Proestos, Komaitis, & Kapsokefalou, 2005; Arts et al., 2002).

Figure 3.6 shows the FRAP analysis of tea infusions during incubation with and without *B. animalis* B94 for 72 h at 37 °C in green tea extract. Significant differences between teas with and without *B. animalis* B94 were observed after 24 h of incubation. The antioxidant activity (FRAP) of untreated tea extract did not change throughout the whole period of incubation, whereas the presence of bacteria decreased the antioxidant activity of this extract. Other bacteria-induced transformations could also negatively affect the antioxidant activity of GTE. No information has been found on the effect of probiotic bacteria on polyphenol antioxidant capacity in extracts made of tea GTE. However, a recent study of the effect of enzymes from bacteria on the antioxidant activity of polyphenols demonstrated that green tea treated with tannase (an enzyme from *Paecilomyces variotti*) showed a greatly increased antioxidant capacity *in vitro*. (Macedo, Battestin, Ribeiro, & Macedo, 2011). This enzyme may be able to hydrolyse the substrate contained in green teas, and the products of hydrolysis may significantly increase the antioxidant properties of green teas

Just as with the ability to chelate radicals, the lower iron reducing power of tea extracts may be due to the masking of potential constituent polyphenols by interactions with other components (eg protein interaction, etc.) or even by bacteria consuming one of them.

3.7. Antihypertensive activity after and before biotransformations

3.7.1. EGCG and rutin

Figures 4.1 and 4.2 show the ACE inhibition analysis of EGCG and rutin, respectively, during incubation with and without *B. animalis* B94 for 72 h at 37 °C. A solution with the probiotic commercial organism was prepared and incubated in equal conditions in order to determine possible ACE inhibition contributed by the bacteria. No ACE inhibition was displayed in this sample.

Marked differences between the polyphenols alone or in the presence of *B. animalis* B94 were observed, mainly after 24 h of incubation. The ACE inhibition values of EGCG alone diminished throughout the whole period of incubation and the decrease was noticeable at 72 h (fig. 4.1). In contrast, ACE inhibition percentages for EGCG were always higher in the solutions with the bacteria than in the control sample after 24 h of incubation. Furthermore, ACE inhibition of treated EGCG increased during incubation, the highest value being observed

at 48 h. The EGCG could have suffered transformations and formed different compound/s with different ACE inhibition capacities since this capacity changed during the whole period of incubation. Thus, overall EGCG composition must vary during incubation and these variations affect the results of ACE inhibition but not the results of antioxidant capacities.

The rutin solution did not show any antihypertensive activity. However, when incubated with bacteria, the rutin solution presented antihypertensive activity at 24 h of incubation which then remained throughout the period. In contrast, an ACE inhibition of EGCG was observed, that was slightly reduced after 48 h. This could be related to the modification or secondary transformation of polyphenols in compounds with less antihypertensive activity.

3.7.2. Green tea extract

Figure 4.3 shows the ACE inhibition analysis of green tea extract during incubation with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C. The control sample and the sample with *B. animalis* B94 showed significant differences after 24 h of incubation ($p < 0.05$), but the ACE inhibition percentages in GTE with and without bacteria did not change during incubation. However, GTE without bacteria seemed to lose more ACE inhibition capacity during the process than the GTE incubated with bacteria, whose ACE properties remained constant. Thus, this slight loss of inhibition created the differences between the two samples at each point of incubation. The transformations performed by the bacteria did not seem to improve the inhibition capacity of the tea infusion.

3.8. Antimicrobial activity of green tea polyphenols

The antimicrobial activity of tea extract incubated with or without *B. animalis* B94 was tested against *V. parahaemolyticus*, *S. putrefaciens* and *P. phosphoreum* (Table 4), since previous work had demonstrated antimicrobial activity against these species (López de Lacey et al., 2011). The presence of *B. animalis* B94 produced some changes in antimicrobial activity, evidenced by the fact that the inhibition zone exhibited by GTE against *S. putrefaciens* increased after 72 h of incubation with the bacteria ($p < 0.05$).

In contrast, when comparing the diverse treatments, few significant differences were detected in antimicrobial activity (with and without bacteria) against the same bacteria with the exception of *V. parahaemolyticus* and *S. putrefaciens* (as previously mentioned). It seems that no big changes can be detected with this technique and perhaps a more accurate technique would reveal more differences between GTE and GTE + *B. animalis* B94. In this

connection, a study by Su, Henriksson, Nilsson, and Mitchell (2008) observed a synergistic effect between *L. acidophilus* L10, *B. animalis* B94 and *L.casei* L26 and a green tea extract ("TEAVIGO™") relative to the inhibition of *in vitro* growth of *S. aureus* and *S. pyogenes*. These different results could be due to many factors: the inhibition zone varies with the tea, the way the extract is prepared (extraction conditions affect the final concentration), the technique used to determine the antimicrobial activity and the strain (concentration of inoculum, type...).

P. phosphoreum had the highest inhibition area (0.5 cm diameter) followed by *S. putrefaciens*. Our results demonstrated that the tested infusions are effective against some specific food spoilage organisms (López-Caballero et al., 2005). Taguri, Tanaka, and Kouno (2004) found that *S.aureus* and the genus *Vibrio* were more susceptible to polyphenols than the genus *Salmonella* and *E. coli*.

4. CONCLUSIONS

To summarise, green tea from different varieties could be a potential food matrix for probiotic bacteria since the three strains tested survived in the extracts. *B. animalis* B94 survived better in the green teas than in the EGCG and rutin solutions, caused principally by minor quantities of nutrients in these solutions. The transformations produced by the bacteria in the standard solutions gave rise to an increment in antioxidant properties and ACE-inhibition, whereas in green tea extracts, only a small reduction or no change at all was observed in the biological activities tested. Further studies of the metabolites formed by the bacteria from EGCG and rutin would be necessary in order to determine the cause of this increment in biological activities.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by Ministerio de Ciencia e Innovación under project AGL2008-00231/ALI. Programs JAE-CSIC predoctoral and Ángeles Alvariño, Xunta de Galicia (European Social Fund), are fully acknowledged. The authors wish to thank Mr. Chiverton for revising the English version.

This centre has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the requirements of the ISO standard 9001:2000.

References

- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, *44*(4), 1044-1051.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., & Zhou, W. (2011). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2011.03.004
- Argyri, K., Proestos, C., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2005). Phenolic compounds in red wine digested in vitro in the presence of iron and other dietary factors. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *56*(3), 213-222.
- Arora, S., Jood, S., & Khetarpaul, N. (2010). Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient composition of barley based food mixtures. *Food Chemistry*, *119*(2), 779-784.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G. M., Voss, H. P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(5), 1184-1187.
- Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, *7*(3), 407-429.
- Aura, A. M., O'Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimiä, R., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., & Poutanen, K. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(6), 1725-1730.
- Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & Pascual-Teresa, S. D. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International*, *42*(10), 1453-1461.
- Avila, M., Jaquet, M., Moine, D., Requena, T., Pelaez, C., Arigoni, F., & Jankovic, I. (2009). Physiological and biochemical characterization of the two alpha-L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245. *Microbiology-Sgm*, *155*, 2739-2749.

- Beekwilder, J., Marcozzi, D., Vecchi, S., de Vos, R., Janssen, P., Francke, C., van Hylckama Vlieg, J., & Hall, R. D. (2009). Characterization of Rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *75*(11), 3447-3454.
- Benzie, I. F. F., Chung, W. Y., & Strain, J. J. (1999). Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J. Nutr. Biochem.*, *10*, 146-150.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76.
- Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H. L., & Winter, J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochemical Journal*, *248*(3), 953-956.
- Bolling, B. W., Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. B. (2009). Tea and health: Preventive and therapeutic usefulness in the elderly? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *12*(1), 42-48.
- Braune, A., & Blaut, M. (2011). Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environmental Microbiology*, *13*(2), 482-494.
- Cai, Y. Z., Mei, S., Jie, X., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, *78*(25), 2872-2888.
- Ceylan, E., & Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, *12*(1), 1-55.
- Costa, L. M., Gouveia, S. T., & Nobrega, J. A. (2002). Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. *Anal. Sci.*, *18*, 313-318.
- Champagne, C. P. (2009). Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods. In D. Charalampopoulos & R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, (pp. 761-804): Springer New York.
- Donkor, O. N., & Shah, N. P. (2008). Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Science*, *73*(1), M15-M20.
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology*, *232*(1), 103-111.

- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350.
- Isiguki, K., Takakuwa, T., & Takeo, T. (1991). Anti-diabetes mellitus effect of water soluble tea polysaccharide. In *Proceedings of international symposium on tea science* (pp. 240-242). Tea Science Society of Japan: Shizuoka, Japan
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., & Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 72(3), 215-224.
- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero P. (2011). Biological activity of green tea (*Camellia sinensis* L) based on its chemical composition. *LWT- Food Science and Technology*. Submitted.
- Macedo, J. A., Battestin, V., Ribeiro, M. L., & Macedo, G. A. (2011). Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126, 491-497.
- Mo, H., Zhu, Y., & Chen, Z. (2008). Microbial fermented tea - a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 124-130.
- Neilson, A. P., Hopf, A. S., Cooper, B. R., Pereira, M. A., Bomser, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8941-8949.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2005). Stability of β -glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage. *Journal of Food Science*, 70(4), M236-M241.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2006). Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 39(4), 394-407.
- Raimondi, S., Roncaglia, L., De Lucia, M., Amaretti, A., Leonardi, A., Pagnoni, U. M., & Rossi, M. (2009). Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), 943-950.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Roginsky, V., & Alegria, A. E. (2005). Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4529-4535.
- Sang, S., Lee, M. J., Hou, Z., Ho, C. T., & Yang, C. S. (2005). Stability of Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Formation of Dimers and Epimers under Common Experimental Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9478-9484.
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D., & Biavati, B. (2010). Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.), S98-S108.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., & Blaut, M. (1999). Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology*, 171(2), 81-91.
- Serra, A., Maclà, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N., & Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, 130(2), 383-393.
- 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), M278-M282.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Strahsburger, E., Baeza, M., Monasterio, O., & Lagos, R. (2005). Cooperative uptake of Microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 3083-3086.

- Su, P., Henriksson, A., Nilsson, C., & Mitchell, H. (2008). Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1837-1842.
- Suzuki, M., Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T., & Maeda-Yamamoto, M. (2003). Epimerization of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate: Relationship between epimerization and chemical structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 510-514.
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 1965-1969.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., & Shah, N. P. (2002). Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 67(8), 3104-3113.
- Uskova, M. A., Kravchenko, L. V., Avrenjeva, L. I., & Tutelyan, V. A. (2010). Effect of *Lactobacillus casei* 114001 Probiotic on Bioactivity of Rutin. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 149(5), 578-582.
- Weisburger, J. H., & Chung, F. L. (2002). Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), 1145-1154.
- Wu, J., Aluko, R. E., & Muir, A. D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatographic assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *J. Chromatogr. A*, 950, 125-130.

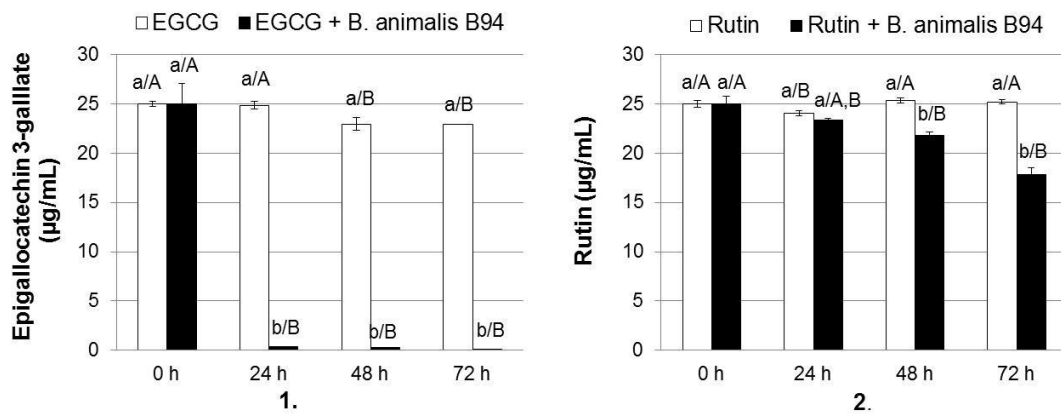


Figure 1. Comparison of the disappearance of EGCG and rutin solutions prepared separated, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis* B94. The results are expressed as mean \pm standard $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n = 3$). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time ($p < 0.05$). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment ($p < 0.05$).

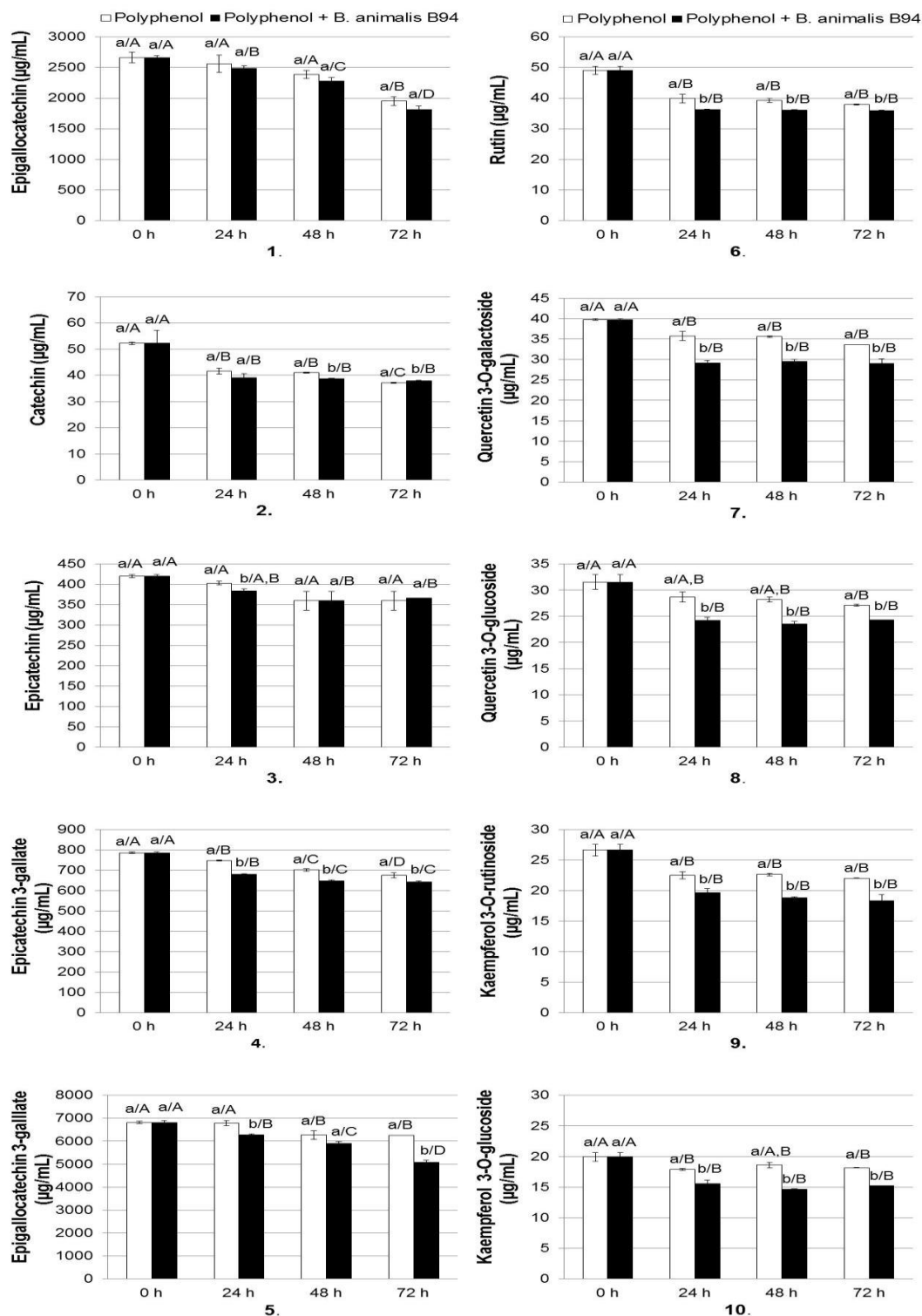


Figure 2. Comparison of the disappearance of green tea polyphenols present in *Wu Lu Mountain*, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis* B94. The results are expressed as mean \pm standard $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n = 3$). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time ($p < 0.05$). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment ($p < 0.05$).

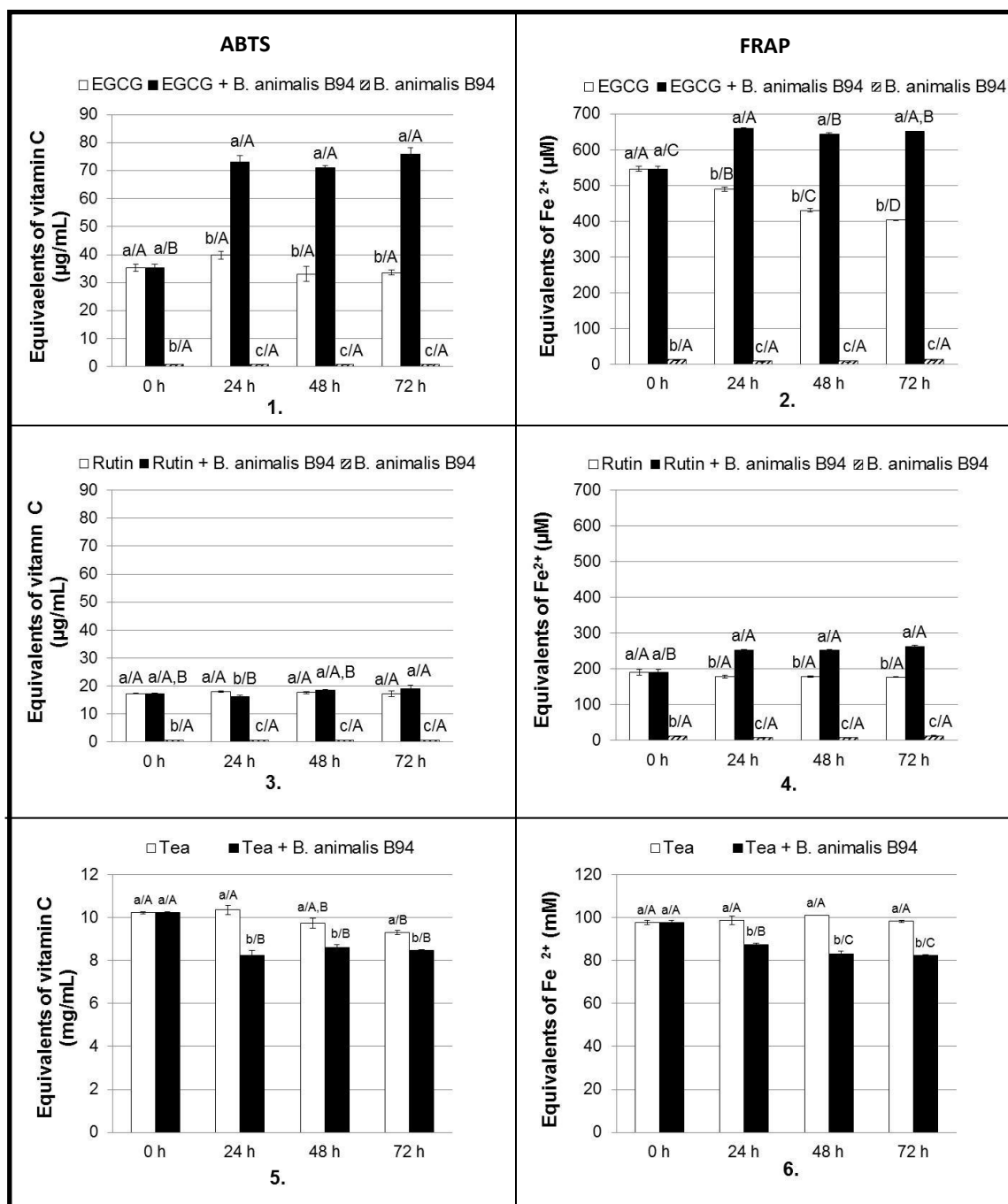


Figure 3. Comparison of vitamin C equivalents (ABTS) and Fe²⁺ equivalents (FRAP) of 2 phenolic (epigallocatechin 3-gallate and rutin) compounds solutions prepared separated and of *Wu Lu Mountain*, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis B94*. The results are expressed as mean ± standard (n = 3). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time (p < 0.05). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment (p < 0.05).

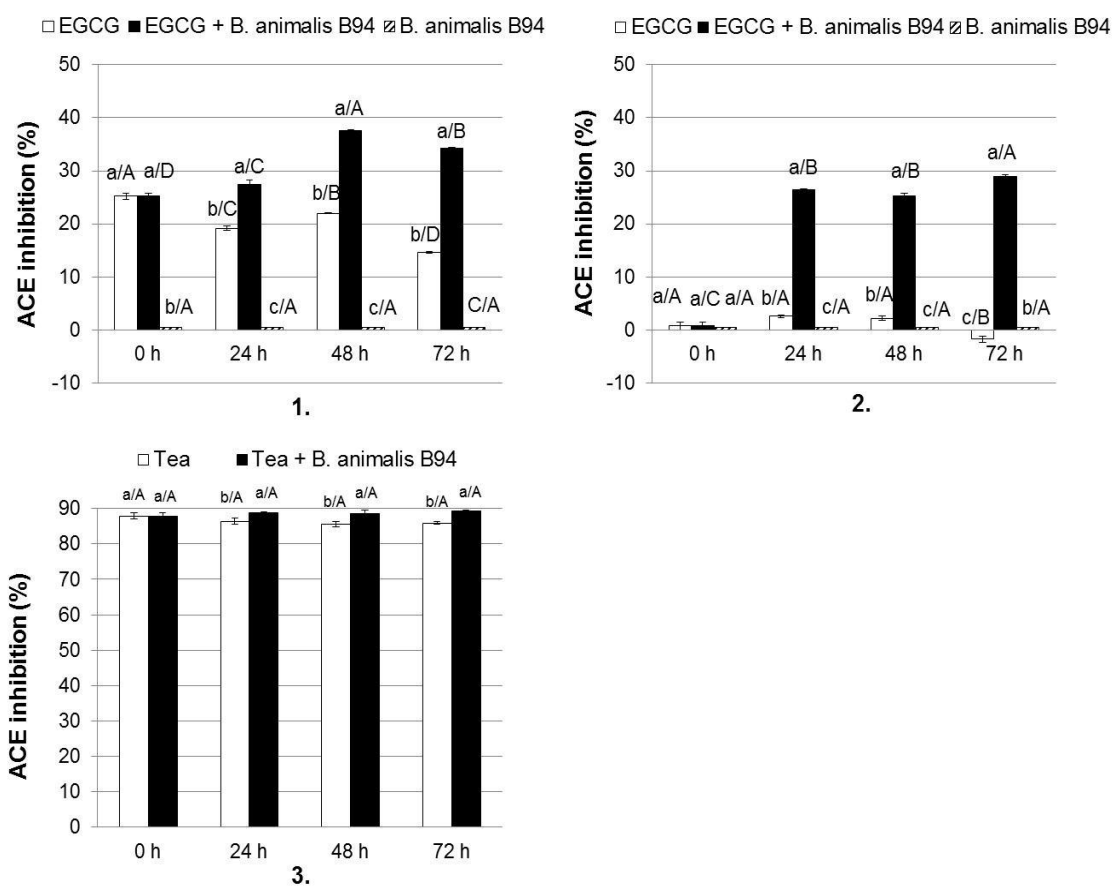


Figure 4. Comparison of ACE inhibition of 2 phenolic compounds solutions prepared separated and of *Wu Lu Mountain* Tea, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis B94*. The results are expressed as mean \pm standard % (n = 3). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time (p < 0.05). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment (p < 0.05).

Table 1

β -Glucosidase, β -galactosidase and α -rhamnosidase activities of probiotic strains.

Probiotic bacteria	β-glucosidase	β-galactosidase	α-rhamnosidase
<i>L.acidophilus</i> L10	3.41 \pm 0.16 ^a	3.36 \pm 0.09 ^a	1.90 \pm 0.02 ^b
<i>L. paracasei</i> L26	2.45 \pm 0.01 ^b	3.05 \pm 0.07 ^b	2.03 \pm 0.07 ^a
<i>B. animalis</i> B94	2.33 \pm 0.11 ^b	2.63 \pm 0.07 ^c	2.03 \pm 0.01 ^a

Activity was expressed as units of enzyme (U). One Unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that released 1 nanomole of *p*-nitrophenol from the substrate per mL per min at 37 °C. Results are expressed as mean \pm standard of units of enzyme (n = 3). ^{a,b,c} Means in the same column with different lower case letters are significantly different (p < 0.05).

Table 2
Survival of probiotic bacteria in Green Tea Extracts (GTE).

	Incubation time (h)															
	0				24				48				72			
	Log CFU/ml	%	Log CFU/ml	%	Log CFU/ml	%	Log CFU/ml	%	Log CFU/ml	%	Log CFU/ml	%	Log CFU/ml	%		
Control	<i>L. acidophilus</i> L10	6.78 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	3.18 ± 0.04 ^{b/C4}	46.68 ± 0.72 ^{b/C4}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.23 ± 0.01 ^{b/A4}	92.94 ± 0.21 ^{b/A5}	3.60 ± 0.01 ^{c/A3}	53.85 ± 0.46 ^{c/A3}	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{a/B1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	5.44 ± 0.06 ^{b/B3}	88.73 ± 2.26 ^{b/B2}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
Japan Sencha Makinohara	<i>L. acidophilus</i> L10	5.80 ± 0.18 ^{a/C3,4}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	3.74 ± 0.06 ^{b/B3}	61.89 ± 2.57 ^{b/C3}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	5.70 ± 0.02 ^{c/A1}	84.55 ± 0.17 ^{c/A2}			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.50 ± 0.03 ^{b/A3}	96.42 ± 0.15 ^{b/B4}	6.49 ± 0.03 ^{b/A2}	96.36 ± 0.70 ^{b/B2}	6.35 ± 0.03 ^{a/B2}	103.45 ± 2.50 ^{a/A1}	6.63 ± 0.19 ^{a/A2}	98.40 ± 3.30 ^{a/B1,2}	6.64 ± 0.03 ^{a/A1}	98.62 ± 0.28 ^{a/B1}			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{b/B1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.45 ± 0.03 ^{a/A2}	105.19 ± 2.60 ^{a/A1}	6.14 ± 0.08 ^{a/C1}	103.20 ± 2.38 ^{a/B1}	6.60 ± 0.08 ^{a/A1}	107.41 ± 3.40 ^{a/A1}	6.60 ± 0.08 ^{a/A1}	107.27 ± 2.73 ^{a/A1}	6.59 ± 0.08 ^{a/A1}	107.27 ± 2.73 ^{a/A1}			
Gyokuro Asahi	<i>L. acidophilus</i> L10	5.95 ± 0.06 ^{b/C2,3}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.14 ± 0.08 ^{a/C1}	103.20 ± 2.38 ^{a/B1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.84 ± 0.01 ^{a/A1}	101.84 ± 0.56 ^{a/B1}	6.71 ± 0.07 ^{a/B1}	107.92 ± 1.38 ^{a/A1}	6.63 ± 0.19 ^{a/A2}	98.40 ± 3.30 ^{a/B1,2}	6.63 ± 0.19 ^{a/A2}	98.40 ± 3.30 ^{a/B1,2}	6.64 ± 0.03 ^{a/A1}	98.62 ± 0.28 ^{a/B1}			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{b/B1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.71 ± 0.07 ^{a/B1}	107.92 ± 1.38 ^{a/A1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
Cinnamon Green Tea	<i>L. acidophilus</i> L10	5.45 ± 0.05 ^{a/C5}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{a/B1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
Lung Ching	<i>L. acidophilus</i> L10	6.01 ± 0.02 ^{a/B2}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.78 ± 0.20 ^{a/A1}	100.69 ± 0.64 ^{a/B1,2}	6.48 ± 0.06 ^{b/B2}	96.19 ± 0.62 ^{b/B2}	6.48 ± 0.06 ^{b/B2}	96.19 ± 0.62 ^{b/B2}	6.48 ± 0.06 ^{b/B2}	96.19 ± 0.62 ^{b/B2}	6.48 ± 0.06 ^{b/B2}	96.19 ± 0.62 ^{b/B2}			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{c/B1}	100 ± 0.00 ^{b/A1}	6.56 ± 0.09 ^{a/B1,2}	106.78 ± 3.64 ^{a/A1}	6.63 ± 0.07 ^{a/A1}	107.97 ± 1.13 ^{a/A1}	6.63 ± 0.07 ^{a/A1}	107.97 ± 1.13 ^{a/A1}	6.34 ± 0.04 ^{b/A2}	103.22 ± 1.56 ^{a/B1}	6.34 ± 0.04 ^{b/A2}	103.22 ± 1.56 ^{a/B1}			
China White Hair	<i>L. acidophilus</i> L10	5.67 ± 0.06 ^{a/C4}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	5.11 ± 0.06 ^{b/C2}	84.47 ± 1.63 ^{b/C2}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.77 ± 0.06 ^{a/A1}	100.44 ± 0.71 ^{b/B2}	6.82 ± 0.04 ^{a/A1}	101.32 ± 0.07 ^{a/B1}	6.82 ± 0.04 ^{a/A1}	101.32 ± 0.07 ^{a/B1}	6.82 ± 0.04 ^{a/A1}	101.32 ± 0.07 ^{a/B1}	6.82 ± 0.04 ^{a/A1}	101.32 ± 0.07 ^{a/B1}			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{b/B1}	100 ± 0.00 ^{b/A1}	6.52 ± 0.14 ^{a/B1,2}	106.12 ± 0.75 ^{a/A1}	6.55 ± 0.07 ^{a/B1}	106.61 ± 3.29 ^{a/A1}	6.55 ± 0.07 ^{a/B1}	106.61 ± 3.29 ^{a/A1}	6.42 ± 0.07 ^{a/B2}	104.55 ± 3.39 ^{a/B1}	6.42 ± 0.07 ^{a/B2}	104.55 ± 3.39 ^{a/B1}			
Wu Lu Mountain	<i>L. acidophilus</i> L10	6.05 ± 0.06 ^{a/B2}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	5.95 ± 0.07 ^{a/B1}	100.29 ± 4.10 ^{a/B1}	<2	<20	<2	<20	<2	<20	<2	<20			
	<i>L. paracasei</i> L26	6.74 ± 0.04 ^{a/A1}	100 ± 0.00 ^{a/A1}	6.68 ± 0.02 ^{a/A2}	99.23 ± 0.51 ^{a/B3}	6.52 ± 0.02 ^{a/B2}	96.83 ± 0.70 ^{a/B2}	6.52 ± 0.02 ^{a/B2}	96.83 ± 0.70 ^{a/B2}	6.60 ± 0.04 ^{b/A1}	98.04 ± 0.61 ^{b/B1}	6.60 ± 0.04 ^{b/A1}	98.04 ± 0.61 ^{b/B1}			
	<i>B. animalis</i> B94	6.14 ± 0.13 ^{b/B1}	100 ± 0.00 ^{b/A1}	6.71 ± 0.08 ^{a/A1}	109.22 ± 0.91 ^{a/A1}	6.65 ± 0.06 ^{a/A1}	108.20 ± 1.27 ^{a/A1}	6.65 ± 0.06 ^{a/A1}	108.20 ± 1.27 ^{a/A1}	6.60 ± 0.01 ^{a/A1}	107.47 ± 2.26 ^{a/A1}	6.60 ± 0.01 ^{a/A1}	107.47 ± 2.26 ^{a/A1}			

Results are expressed as mean ± standard of Log CFU/mL and of survival percentage % (n = 3). ^{a, b, c} Means in the same line with different lower case letters indicate significant differences among different times for the same strain and GTE (p < 0.05). ^{A, B, C} Means in the same column with different upper case letters indicate significant differences among different strains for the same time and GTE (p < 0.05). ^{1, 2, 3} Means in the same column with different numbers indicate significant differences among different GTEs for the same strain and time (p < 0.05).

Table 3
Survival of probiotic bacteria in Wu Lu Mountain Tea.

	Incubation time (h)							
	0		24		48		72	
	Log CFU/mL	%	Log CFU/mL	%	Log CFU/mL	%	Log CFU/mL	%
Control	6.14 ± 0.13 ^{a/E}	100 ± 0.00 ^{a/A}	5.45 ± 0.05 ^{b/C}	88.73 ± 2.26 ^{b/B}	<2	<20	<2	<20
Epigallocatechin-3-gallate	6.14 ± 0.06 ^{a/E}	100 ± 0.00 ^{a/A}	3.54 ± 0.01 ^{b/F}	57.62 ± 0.41 ^{b/E}	<2	<20	<2	<20
Rutin	6.28 ± 0.06 ^{a/C,D,E}	100 ± 0.00 ^{a/A}	4.41 ± 0.08 ^{b/E}	70.27 ± 1.05 ^{b/D}	2.97 ± 0.03 ^{c/E}	47.32 ± 0.70 ^{d/E}	<2	<20

Results are expressed as mean ± standard of Log CFU/mL and of survival percentage % (n = 3). ^{a, b, c} Means in the same line with different lower case letters indicate significant differences among different times for the same strain and GTE (p < 0.05). ^{A, B, C} Means in the same column with different upper case letters indicate significant differences among different strains for the same time and GTE (p < 0.05). ^{1, 2, 3} Means in the same column with different numbers indicate significant differences among different GTEs for the same strain and time (p < 0.05).

Table 4
Comparison of antimicrobial activity of Wu Lu Mountain tea incubated without and with *B. animalis* B94 on different microorganisms.

		Antimicrobial activity (inhibition zone diameter mm)			
		Incubation time (h)			
		0	24	48	72
<i>V. parahaemolyticus</i>	GTE	9.00 ± 0.01 ^{aB/3}	9.17 ± 0.29 ^{a/A/3}	8.50 ± 0.50 ^{a/A/3}	8.83 ± 0.29 ^{a/A/3}
	GTE + <i>B. animalis</i> B94	9.67 ± 0.29 ^{a/A/3}	9.17 ± 0.29 ^{a, b/A/3}	8.67 ± 0.58 ^{b/A/3}	8.83 ± 0.29 ^{a, b/A/3}
<i>S. putrefaciens</i>	GTE	15.67 ± 0.58 ^{a/A/2}	15.67 ± 0.29 ^{a/A/2}	14.83 ± 0.29 ^{a/A/2}	15.67 ± 0.58 ^{a/B/2}
	GTE + <i>B. animalis</i> B94	15.50 ± 0.50 ^{b/A/2}	15.83 ± 0.29 ^{b/A/2}	14.50 ± 0.50 ^{c/A/2}	16.83 ± 0.29 ^{a/A/2}
<i>P. phosphoreum</i>	GTE	20.33 ± 0.58 ^{a/A/1}	19.33 ± 0.58 ^{a/A/1}	19.33 ± 0.58 ^{a/A/1}	19.33 ± 0.58 ^{a/A/1}
	GTE + <i>B. animalis</i> B94	20.50 ± 0.71 ^{a/A/1}	19.17 ± 0.29 ^{b/A/1}	19.50 ± 0.71 ^{a, b/A/1}	20.00 ± 0.01 ^{a, b/A/1}

The results are expressed as mean ± standard mm (n = 3).^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among time for the same treatment and strain (p < 0.05).^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among treatment for the same time and strain (p < 0.05).^{1, 2, 3} Means with different lower case letters indicate significant differences among strains for the same treatment and time (p < 0.05).

ARTÍCULO 7

López de Lacey, A.M., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E. y Montero P. (2012)

Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols by probiotic bacteria

Journal Agricultural and Food Chemistry

BIOTRANSFORMATION AND RESULTING BIOLOGICAL PROPERTIES OF GREEN TEA POLYPHENOLS PRODUCED BY PROBIOTIC BACTERIA

Ana M. López de Lacey^a, Efrén Pérez-Santín^a, M. Elvira López-Caballero^{a*}, and Pilar Montero^a

^a Institute of Food Science, Technology and Nutrition, ICTAN (CSIC) (formerly Institute of Refrigeration), C/ José Antonio Nováis, 10, 28040. Madrid, Spain.

*Corresponding author: E-mail address: elvira.lopez@ictan.csic.es

Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antioxidant properties and ACE inhibition capacities of eight individual flavonoids before and after incubation with *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis LAFTI@B94*[®]. Changes in flavonoid content and in the survival of this commercial probiotic strain, incubated in individual flavonoid solutions as the only source of carbon, were also determined to assess their effect on biological activities. The glycosylated flavonoids permitted a higher survival rate of the probiotic bacteria with survival percentages above 50% at 48 h of incubation. The incubation of *B. animalis* B94 with individual catechins would supposedly produce an increase in all the biological activities tested (ABTS, FRAP and ACE inhibition), but the increments were minor or imperceptible in the flavonol solutions. Epigallocatechin, catechin and epicatechin solutions registered the most important changes in ABTS, FRAP and ACE inhibition capacity, in some cases even doubling their biological activities after incubation with the bacteria. The metabolites produced from glycosylated flavonoids possessed better reducing power (FRAP) than radical scavenging capacity (ABTS). These results are encouraging as the incorporation of *B. animalis* B94 in various polyphenol-rich foods could be a way of improving the antioxidant properties of the foods. In addition, the polyphenol-rich food could act as a matrix for probiotic strains.

Key words: polyphenols, probiotic bacteria, survival, antioxidant properties, ACE inhibition

1. INTRODUCTION

Flavanols, particularly those of the catechin and catechin-gallate ester family, together with the flavonols quercetin, kaempferol and their glycosides, are the major polyphenols in green teas (Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996). The biological activity of green teas has been associated principally with this group of polyphenol compounds (Higdon & Frei, 2003). Numerous *in vitro* assays have demonstrated the well-known strong antioxidant properties of catechins (Majchrzak, Mitter & Elmadfa, 2004). However, the beneficial effects of polyphenols depend on their bioavailability (Walle, 2004).

Probiotic bacteria, live cells with a wide variety of positive health effects, are principally members of the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* family, although some strains of *Bacillus*, *Pediococcus* and yeast have also been found to be suitable candidates (Soccol et al., 2010). These microorganisms contribute to intestinal microbial balance and play a role in maintaining health (Soccol et al., 2010). The recent interest in adding probiotics to some foods rich in phenolic compounds (Marotti, Bonetti, Biavati, Catizone & Dinelli, 2007; Otieno, Ashton & Shah, 2006) is because certain enzymatic activities such as deglycosylation, ring-fission, dehydroxylation, demethylation or decarboxylation, etc. (Aura, 2008) are present in some probiotics. These enzymatic activities can, in some cases, convert polyphenols into more bioavailable or bioactive forms than the original phenolic compounds (Donkor & Shah, 2008; Tsangalis, Ashton, McGill & Shah, 2002; Uskova, Kravchenko, Avrenjeva & Tutelyan, 2010). The fermentation of flavonol glycosides with some probiotic microorganisms with glucosidase activity, such as β -glucosidase, β -galactosidase or α -rhamnosidase, could improve their bioavailability. This bioavailability is increased since the bacteria transform the flavonol glycoside into its aglycone which is more absorbable (Izumi et al., 2000). Moreover, the deglycosylation of flavonol glycosides such as rutin or quercetin rutinoside to quercetin, improves their antioxidant capacity (Rice-Evans et al., 1996).

Although some studies have been published dealing with flavonoid biotransformations produced by *Bifidobacterium* or *Lactobacillus* sp. (Ávila, Hidalgo, Sánchez-Moreno, Pelaez, Requena & Pascual-Teresa, 2009; Donkor et al., 2008; Marotti et al., 2007), there are not many published reports on the effect of probiotic bacteria on flavonol antioxidant activity.

Catechin fermentation with bacteria is even less studied than flavonols. The work done by Macedo, Battestin, Ribeiro and Macedo (2011) demonstrated that green tea polyphenols treated with *Paecilomyces variotti* tannase exhibited a greatly increased antioxidant capacity *in*

vitro. However, no additional studies have been found dealing with the biological activities of catechin metabolites produced by a specific strain, since research is focused principally on catechin metabolism by faecal species (Aura, Mattila, Seppänen-Laakso, Miettinen, Oksman-Caldentey & Orešič, 2008; Meselhy, Nakamura & Hattori, 1997).

Thus, the objectives of this study were to investigate the survival of *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis LAFTI@B94* in different polyphenols solutions and explore the changes in the composition of polyphenols incubated with these probiotics. The antioxidant properties and ACE activity of the metabolites derived from polyphenol solutions in the presence of probiotic bacteria were also studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Standard polyphenol compounds: (-)-epigallocatechin (CAS: 970-74-1), (+)-catequin (CAS:154-23-4), (-)-epicatequin (CAS: 490-46-0), (-)-epicatechin-3-gallate (CAS: 1257-08-5), quercetin-3-*O*-galactoside (CAS: 482-36-0), quercetin-3-*O*-glucoside (CAS: 482-35-9), kaempferol-3-*O*-rutinoside (CAS: 17650-84-9), kaempferol-3-*O*-glucoside (CAS: 480-10-4) were purchased from Extrasynthese (Genay, Cedex, France).

Reagents for enzyme activity assay: *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, *p*-nitrophenyl- α -D-ramnopyranoside, *p*-nitrophenol were provided by Sygma-Aldrich (Stenheim, Germany).

HPLC-MS: HPLC grade methanol, acetonitrile and formic acid (VWR international, Inc., Barcelona, Spain). HPLC grade water was prepared from distilled water using a Milli-Q system (Millipore Laboratory Bedford, MA).

Antioxidant activity; FRAP: (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine), FeCl₃ and FeSO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA). ABTS: [2,2'-azino-*bis*-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], potassium persulphate, Vitamin C (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA).

Reagents for ACE-inhibition: HHL (Hippuryl-*L*-Histidyl-*L*-Leucine), ACE (CAS: 9015-82-1), potassiumphosphate buffer, containing 300 mM NaCl, pH 8.3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA).

Culture media: MRS (de Man, Rogosa and Shape, Oxoid, Basingstoke, UK).

2.2. Bacterial strains and growth conditions

Bifidobacterium animalis ssp. Lactis LAFTI@B94 (*B. animalis* B94) was selected as a commercial probiotic strain. This strain was purchased lyophilized in DSM (DSM Food Specialties Ltd., Sydney, Australia) and kept at -20 °C until use.

For experiments, one portion of lyophilized strain was dissolved in 0.05% cysteine MRS broth. Then one aliquot of this solution was streaked on 0.05% cysteine MRS agar plates, which were incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions. After the incubation, one colony of *B. animalis* B94 was transferred into broth medium and was grown at 37 °C under anaerobic conditions for 24 h.

2.3. Infusion preparation

Chinese green tea *Wu Lu Mountain* was used for preparing the extract. *Wu Lu Mountain* was purchased from a local specialized tea store. The preparation of green tea extract was carried out according to the method described by López de Lacey, Pérez Santín, López-Caballero and Montero (2011). Briefly, 35 g of each leaves was pulverized in a blender (Osterizer sunbeam model nº 4153-50) and mixed with 350 mL of water (milli-Q) at 80 °C for 30 minutes, with constant shaking and was then centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at 5 °C. The supernatant was filtered two times through Whatmann N°1 filter papers. The infusion filtered was stored at -20 °C until analysis.

2.4. Survival of *B. animalis* B94 in eight separately prepared polyphenol standard solutions

B. animalis B94 was grown as mentioned previously. Then the cells were harvested by centrifugation (6,000 g, 10 min, 5 °C), washed twice with 0.9% NaCl solution and suspended in the same solution to an OD₆₂₀ ~ 0.6. One aliquot of 50 µL of harvested cells adjusted to OD₆₂₀ ~ 0.6 were mixed with 950 µL of green tea extract in order to study bacterial survival in green tea extracts. Another 50 µL of 0.9% NaCl solution was used for control purpose.

To study *B. animalis* B94 survival in polyphenol standards, 1 mL of harvested cells adjusted to OD₆₂₀ ~ 0.6 were mixed with 19 mL of 0.9% NaCl solution. The standards were first dissolved in HPLC grade methanol before being added to the NaCl solution to a final concentration of 25 µg/mL. The same concentration of standards (25 µg/mL) was used for all the samples in order to compare the effect on probiotic survival of each compound. The final

bacterial concentration was approximately 10^6 CFU/mL. The bacterial strains were incubated at 37 °C for 72 h in anaerobic conditions.

Cell viability was assessed by determining the viable population present at 0, 24, 48 and 72 h of incubation by analysing 100 μ L of each culture using the microdot method (Strahsburger, Baeza, Monasterio & Lagos, 2005) on 0.05% cysteine MRS agar. All the counts were performed at least in triplicate.

2.5. Biotransformation of phenolic compounds

B. animalis B94 was used for the study of polyphenol biotransformation. The bacteria solutions ($OD_{620} \sim 0.6$) were prepared and mixed with each standard separately as explained above. The final bacterial concentration was approximately 10^6 CFU/mL and the final concentration of each standard in this solution was 25 μ g/mL. The bacterial strains were incubated at 37 °C for 72 h and in anaerobic conditions.

One aliquot of the solution was taken for the different analyses (counts, HPLC-MS, antioxidant activity and ACE inhibition) at 0, 24, 48 and 72 h of incubation at 37 °C. After the counts each aliquot was centrifuged 6,000 g, 10 min and 5 °C and the supernatant was kept for the rest of the analyses. All the analyses were performed at least in triplicate, except for the HPLC-MS analysis which was carried out in duplicate.

2.6. Quantification of polyphenols by HPLC-MS

Reverse phase high performance liquid chromatography was performed to analyse phenolic compounds present in the aqueous green tea extract. The separation module consisted of an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany), equipped with a C_{18} size column (250 x 4.6 mm, 5 μ m, C_{18} Tracer Excel ODS-A column, Teknokroma) and a diode array detector (DAD). The samples were eluted with a gradient system consisting of solvent A (deionized water) and solvent B (acetonitrile) both containing 1% formic acid, used as the mobile phase, with a flow rate of 1 mL/min.

The temperature of the column was maintained at 25 °C and the injection volume was 20 μ L. The gradient system started at 90% solvent A and decreased to 74% A within 40 min, followed by a decreased to 35% solvent A in 10 min. The final conditions were held for an additional 5 min. The peaks of the phenolic compounds were monitored by atmospheric pressure electrospray ionization source (ESI), operated in negative ion mode, with the electrospray capillary voltage set to 3000 V, a nebulizing gas flow rate 12 L/h, and a drying

temperature of 35 °C. Mass spectrometry data were acquired in the scan mode (mass range m/z 200-700) and in the sim mode (m/z 289, 305, 441, 441, 447, 457, 609).

The quantification was carried out using the external standard method. Solutions of each standard at various concentration levels of 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mg/L. were injected into column and the elution was performed in the same manner with the samples. Individual compound was quantified using a calibration curve of the corresponding standard compound.

2.7. Antioxidant activity before and after biotransformation

2.7.1. FRAP

The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay was carried out according to the method described by Benzie and Strain (1996) with some modification (Alemán, Pérez-Santín, Bordenave-Juchereau, Arnaudin, Gómez-Guillén & Montero, 2011). This assay measures the change in absorbance at 595 nm owing to the formation of a blue colored Fe^{II} -tripyridyltriazine compound from the colourless oxidized Fe^{III} form by the action of electron donating antioxidants (Benzie, Chung & Strain, 1999). An amount of 60 μ L of sample was incubated (37 °C) with 60 μ L of Milli-Q water and 900 μ L of FRAP reagent, containing 10 mM of TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) and 20 mM of $FeCl_3$. Absorbance values were read at 595 nm after 30 min, using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as μ mol Fe^{2+} equivalents/g of sample based on a standard curve of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. All determinations were performed at least in triplicate.

2.7.2. ABTS

The ABTS radical [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] scavenging capacity was carried out according to the method of Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang and Rice-Evans (1999). The amount of ABTS radical cation scavenged by antioxidants is measured by monitoring the decrease of absorbance of ABTS radical cation, and compared with the decrease of absorbance produced by the addition of known amount of vitamin C. The stock solution of ABTS radical consisted of 7 mM ABTS in potassium persulphate 2.45 mM, kept in the dark at room temperature for 16 h. An aliquot of stock solution was diluted with Milli-Q water in order to prepare the working solution of ABTS radical with absorbance at 734 nm of 0.70 ± 0.02 . An aliquot of 20 μ L of aliquot of sample was mixed with 980 μ L of ABTS reagent. The mixture was then left to stand in the dark at 30 °C for 10 min and absorbance

values were read at 734 nm using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g of sample based on a standard curve of vitamin C. All determinations were performed at least in triplicate.

2.8. ACE inhibition capacity before and after biotransformation

The reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to determine the ACE inhibition capacity of the green tea polyphenols and green tea extract. The method was according to Wu, Aluko and Muir (2002) with some modifications (Alemán et al., 2011). The total reaction volume was 230 mL, made up of 50 mL of 5 mM HHL (Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine), 160 mL of 0.025 U/mL of ACE and 20 mL of sample (all prepared with 100 mM potassiumphosphate buffer, containing 300 mM NaCl, pH 8.3). The mix was incubated at 37 °C for 120 min in a water bath with continuous agitation at 160 shaking/min (OSL 200, Grant Instruments Ltd., Cambridge, England) and the reaction was quenched by addition of 100 mL 0.1 M HCl. The released hippuric acid (HA) was quantified by RP-HPLC (model SPE-MA10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japan) on a C₁₈ column (Tracel excel, 120 ODSA 5 mm, Teknokroma, Barcelona, Spain). The injection volume was 50 mL and the flow rate 0.8 mL/min using an acetonitrile gradient from 20% to 60% in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) for 26 min. The HA and HHL were monitored at 228 nm and eluted at 8.30 and 15.70 min, respectively. A solution with the probiotic commercial organism and incubated in equal conditions was prepared in order to determine the possible ACE inhibition contributed by the bacteria. All determinations were carried out at least in triplicate.

2.9. Statistical analyses

Statistical tests were performed using the SPSS® computer program, version 19.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Survival of *Bifidumbacteria animalis* B94 in standard polyphenol solutions

Polyphenolic compounds do not all have the same effect on microorganism survival, so some polyphenols were selected (as standard) to evaluate the survival of a probiotic (*B. animalis* B94) in the presence of each of them as the only source of food. The selection of the eight polyphenols was based on the phenolic compound composition of the green teas.

The viable counts of *B. animalis* B94 in the eight different solutions prepared with the eight polyphenol standards are shown in table 1. *B. animalis* B94 growth was not affected by the methanol in which the standard polyphenols had been dissolved (Table 1). A decrease of viable counts was observed at 24 h of incubation in all the solutions. After 24 h, the counts were below the control values (88.73%) in all the samples except for catechin (98.49%), epigallocatechin (91.97%) and quercetin-3-*O*-galactoside (91.96%). A 50% reduction of viable cells was observed in the epicatechin-3-gallate solutions. It is significant that the glycosylated flavonoids permitted *B. animalis* B94 to prolong survival for at least 48 h of incubation. Thus, this strain survives longer in the presence of flavonoids linked to sugars than in the presence of catechins. The enzymes β -glucosidase, β -galactosidase and α -rhamnosidase are capable of breaking down the *O*-glucosidic, galactosidic and rhamnosidic linkages, respectively, present in glycosylated flavonoid. *B. animalis* B94 can produce these enzymes during incubation to obtain the sugars linked to the flavonols (Schneider, Schwiertz, Collins & Blaut, 1999) so this would permit the bacteria to survive longer. In general, the lowest reduction in viable cells during incubation in the glycosylated flavonoid solutions, was observed after 2 days in the solutions with quercetin-3-*O*-galactoside and kaempferol-3-*O*-glucoside. On the other hand, the largest reduction in the number of viable cells was detected in the solution with kaempferol-3-*O*-rutoside, which possesses rhamnose in its structure. These results are consistent with *B. animalis* B94 enzyme activity values, because this bacterium is better at hydrolysing galactosidic and glucosidic bonds than rhamnosidic bonds (data not shown). It is also important to note that the probiotic strain survived longer but with fewer cells. This might indicate that the sugar obtained from the flavonoid glycosides prevented the survival of a larger number of cells. The number of cells decreased between 24 and 72 h due to a diminishing source of energy. The polyphenol concentration was very small for the bacteria populations, so perhaps a greater concentration of phenolic compounds might have prolonged

the survival of more cells. Shorter periods of incubation (less than 24 h) might permit the observation of major differences between control and sample.

No information has been found on the influence of polyphenols on the growth and viability of this probiotic strain.

3.2. Biotransformation of standard polyphenol solutions by *B. animalis* B94

Figure 1 shows the concentration of each polyphenol during incubation with and without *B. animalis* B94 for 72 h at 37 °C. Significant differences were observed between the sample with and those without *B. animalis* B94 after 24 h of incubation in all the solutions. Catechin (C), epicatechin (EC) and kaempferol-3-*O*-glucoside levels incubated without bacteria remained stable for 72 h. A drop in concentration was observed in the epigallocatechin (EGC) solution but the slight decreases in the epicatechin-3-gallate (ECG), quercetin-3-*O*-galactoside and quercetin-3-*O*-glucoside solutions were not significant in the samples without bacteria. This decrease in the concentration could be due, in part, to the instability of polyphenols during incubation in solutions with pH ~ 6. Stability studies have demonstrated that green tea catechins can undergo many changes such as oxidation and epimerization in solutions with pH > 6 (Ananingsih, Sharma & Zhou, 2011; Neilson, Hopf, Cooper, Pereira, Bomser & Ferruzzi, 2007; Roginsky & Alegria, 2005). However, this reduction in the control samples was minor compared with the decreases in the presence of probiotic bacteria. Moreover, the presence of bacteria without polyphenol compounds showed that no phenols had been liberated, in this sense indicating the absence of bacterial metabolites (data not shown).

The highest rate of polyphenol disappearance was clearly evident in solutions incubated with bacteria. Catechins were more affected than the glycosylated flavonoids by the presence of *B. animalis* B94 because a strong fall in catechin concentration was detected during incubation with this probiotic organism. EGC suffered a progressive diminution during incubation and practically a total loss of concentration at 72 h. Decreases for the other catechins were not so drastic and remained around 50% (between 12.16-14.18 µg/mL) after 72 h of incubation with the strain. Despite this, reductions were different for the first two days, being gradual for C and EC and more drastic for ECG, where the fall occurred during the first 48 hours and then remained constant. Serra, Maclà, Romero, Reguant, Ortega and Motilva (2012) observed the same behaviour with flavonoid metabolism taking place between 24-48 h of incubation with rat microflora.

Glycosylated flavonoid levels were maintained throughout the period studied, scarcely losing 2-5% on some occasions, thus indicating flavonoid stability in comparison with catechins (figure 1). This ratio decreased during incubation with the probiotic bacteria, but again, to a lesser extent than catechins, the largest decrease being for quercetin-3-*O*-galactosidase and just perceptible for the rest. This could mean that *B. animalis* B94 has less affinity for these phenols, or that the flavonols could suffer less transformation.

Our results show a flavonol concentration decline between 24-72 h of incubation with bacteria, which coincides with a decrease in cell counts < 2 log CFU/mL (Fig. 1.1-4, Table 1). It was somewhat more pronounced in quercetin-3-*O*-galactoside than in the other flavonols, which presented only a slight fall in concentrations with the microbial counts not falling below 50% (Fig. 1.5, Table 1). Thus, no clear relationship was observed between the number of cells and the reduction caused by a transformation of polyphenols in other compounds. However, Donkor et al. (2008) studied the hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *B. animalis* B94 and observed that the maximum concentration of aglycones was produced when the cell population was high.

3.3. Antioxidant properties before and after biotransformations

The antioxidant capacity of each polyphenol during incubation with and without *B. animalis* B94 for 72 h at 37 °C was determined by radical scavenging capacity (ABTS) (Fig. 2) and iron reducing power (FRAP) (Figure 3). A solution with this probiotic commercial organism was prepared and incubated under equal conditions in order to detect any possible antioxidant activities contributed by the bacteria. It could happen that the bacteria themselves present antioxidant properties as reported by Kullisaar et al. (2002). However, bacteria without polyphenolic compounds showed no antioxidant activity (by ABTS or FRAP), or indicative bacterial metabolites that complement this activity (Fig. 3).

The antioxidant activity assayed by ABTS showed a similar range of values for all flavan-3-ol (catechins) of between 30 and 40 µg/mL, and was quite stable throughout the period (72 h) although slight drops in the ABTS values of some flavan-3-ol solutions (catechin and epicatechin) were observed. This fact is related to polyphenol concentration in the standard solutions observed above (Figure 1) since there were also slight variations in the concentrations of catechins. The most unstable catechin in the sample controls during incubation was EGC (Figure 1), but the antioxidant activity was not affected by these changes in concentration in spite of the decrease of EGC. This could indicate that the product/s formed

from EGC could have had the same antioxidant activity as EGC at the beginning of incubation. In general, untreated catechins, especially gallocatechins and catechin gallates, showed greater activity than flavonol glycosides. Thus, the ABTS values of untreated catechins are in accord with Rice-Evans et al. (1996): a greater number of hydroxyl groups and gallic acid in the catechin structure produces an increment in antioxidant activity.

The antioxidant activity of polyphenol standards increased sharply when these compounds were incubated in the presence of bacteria. Their values doubled in most cases with the exception of EGC, which only increased by 42%. After 24 hours antioxidant activity remained practically constant. This rise in antioxidant activity (by ABTS) confirms that catechins were transformed by the bacteria because there was a direct relationship between the disappearance of catechins during incubation with the bacteria and the increase of antioxidant activity.

The antioxidant activity by ABTS as shown by the different flavonols, was significantly lower than that of the flavan-3-ol (catechins), ranging between 20 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Although there were slight differences during the 72 h period, the variations are no greater than 5% in all cases. With regard to flavonols, there seems to be a more limited relationship between changes in polyphenol content and smaller variations in radical scavenger activity during the 72 h period (with and without bacteria).

Previous studies have demonstrated that *B. animalis* B94 has β -glucosidase, β -galactosidase and α -ramnosidase activities. These enzymes catalyse the deglycosylation of glycosylated flavonoids to their corresponding aglycones, which possess more antioxidant activity than the glycoside forms (Cai, Mei, Jie, Luo & Corke, 2006). This reaction is considered to be the first step in glycosylated flavonoid metabolism (Aura, 2008; Braune & Blaut, 2011; Serra et al., 2012). Despite the reduction of the glycosylated form, antioxidant activity did not increase (Fig 2.6, 2.7 and 2.8). Thus, the disappearance of flavonols could be associated with the formation of aglycones, which are transformed into other metabolites with different antioxidant activities. (Serra et al., 2012).

The flavonol most affected by the presence of bacteria was quercetin-3-*O*-galactoside. The other flavonols incubated with *B. animalis* B94 all reached similar values between 22.97-23.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 2). The results obtained for quercetin-3-*O*-galactoside are also consistent with enzyme activity because in a previous study it was shown that *B. animalis* B94 exhibited more β -galactosidase and β -glucosidase than α -rhamnosidase activity (data not shown). The

decrease in glycosylated forms occurs to a lesser extent in the early hours of incubation than towards the end, close to 72 hours, so it does not match a majority of surviving bacteria.

Figure 3 shows the FRAP analysis of polyphenols studied during incubation with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °

C. The reducing power of iron by catechins (flavan-3-ols) showed different values ranging from 400 for EGC, EC and C, and from about 600 for ECG. All values suffered a slow, progressive decline, with the exception of EGC and EC that experienced a dramatic fall of approximately 25% and 20%, respectively. Unlike the radical chelating activity, the increases obtained in FRAP activity by flavanols in the presence of probiotic bacteria were less dramatic, approximately 25% (EC and EG) mainly during the first 24-48 h, which coincides with the largest number of surviving bacteria. Catechin increases in the FRAP analysis were lower than those registered in the ABTS analysis. Thus, bacteria could have transformed these compounds, indicated by greater antioxidant power in the FRAP assay.

The behaviour of flavonols with respect to the reducing power of iron is more heterogeneous than the radical scavenger activity. The presence of probiotic bacteria revealed increased activity in the reducing power of iron for all flavonols tested. Quercetin-3-*O*-galactoside and quercetin-3-*O*-glucoside were more active, whereas kaempferol-3-*O*-rutinoside and kaempferol-3-*O*-glucoside were significantly less active. The increase was not very pronounced, only ranging between 15 and 36%, but sufficient to show that the bacteria had been transformed into other compounds which exhibited a greater reducing power. In fact, some metabolites like 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid produced by colonic degradation of flavonoids can exhibit higher values in FRAP assays than quercetin, but lower values than quercetin in ABTS assays (Dueñas, Surco-Laos, González-Manzano, González-Paramás & Santos-Buelga, 2011).

3.4. Antihypertensive activity before and after transformation

Figure 4 shows the ACE inhibition analysis of studied polyphenols during incubation with and without *B. animalis* B94 for 0, 24, 48 and 72 h at 37 °C. Marked differences between the polyphenols alone or in the presence of *B. animalis* B94 were observed, mainly after 24 h of incubation. Initially ACE inhibition values for the different catechins alone were very low with ECG showing the most stability during 72 h. On the other hand EGC and EC showed a progressive loss of activity. The lack of C activity, with even an occasional hypertensive effect, but low intensity is significant. No ACE inhibition was displayed in the sample used as a control.

The ACE inhibition percentages for catechins were always 10-27% higher than their respective controls after 24 h of incubation when incubated with *B. animalis* B94, but behaviour during the 72 h study was different in each case. The EGC and catechin solutions showed their highest values at 48 and 72 h, EGC being very stable throughout this period. EC and ECG values differed significantly from the control but to a lower extent (no more than 5% inhibition). The catechin solution produced the most outstanding result because there was no ACE inhibition until the probiotic organism was added to the solution which gave rise to an ACE inhibition of up to 30%.

The behaviour of the flavonols was also heterogeneous and their values were not as prominent as those presented by most of the catechins. Almost all the flavonols exhibited stable activity, except for kaempferol-3-*O*-glucoside which showed no antihypertensive effect after 72 h.

The presence of bifidobacteria in the different flavonol solutions had a heterogeneous effect. Quercetin-3-*O*-galactoside exhibited 30% inhibition at 24 h, although it was quite unstable with the percentage tending to drop to around 12-15% at 48 and 72 h. Similar behavior but with less pronounced instability was observed in kaempferol-3-*O*-glucoside. Of all the flavonols, the greatest antihypertensive effect was observed in kaempferol-3-*O*-rutinoside in the presence of bifidobacteria.

In summary, incubation of *B. animalis* B94 in polyphenol solutions generally supposed an increase in the majority of biological activities of the flavonoids tested. In addition, the bacteria was able to survive longer in solutions with glycosylated flavonoids, although only 24 h more than in the catechin solutions. These results are encouraging as the incorporation of *B. animalis* B94 in various polyphenol-rich food sources could be a way of improving the antioxidant properties of these foods. In addition, the polyphenol-rich food could act as a matrix for probiotic strains. Further research will be necessary to study the metabolites formed by the bacteria from each polyphenol in order to determine the cause of the increase in biological activities.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by Ministerio de Ciencia e Innovación under project AGL2008-00231/ALI. Programs JAE-CSIC predoctoral and Ángeles Alvariño, Xunta de Galicia (European Social Fund), are fully acknowledged. The authors wish to thank Mr. Chiverton for revising the English version.

ICTAN-CSIC has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the requirements of the ISO standard 9001:2000.

References

- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, *44*(4), 1044-1051.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., & Zhou, W. (2011). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, doi:101016/j.foodres201103004.
- Aura, A. M., Mattila, I., Seppänen-Laakso, T., Miettinen, J., Oksman-Caldentey, K. M., & Orešič, M. (2008). Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: Comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochemistry Letters*, *1*(1), 18-22.
- Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, *7*(3), 407-429.
- Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., & Pascual-Teresa, S. D. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus. *Food Research International*, *42*(10), 1453-1461.
- Benzie, I. F. F., Chung, W. Y., & Strain, J. J. (1999). Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *J Nutr Biochem*, *10*, 146-150.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76.
- Braune, A., & Blaut, M. (2011). Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environmental Microbiology*, *13*(2), 482-494.
- Cai, Y. Z., Mei, S., Jie, X., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, *78*(25), 2872-2888.
- Donkor, O. N., & Shah, N. P. (2008). Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis, and Lactobacillus casei in soymilk. *Journal of Food Science*, *73*(1), M15-M20.
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology*, *232*(1), 103-111.

- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89-143.
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., & Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*, 130(7), 1695-1699.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., & Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 72(3), 215-224.
- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2011). Biological activity of green tea (*Camelia sinensis*) based on its chemical composition. *LWT- Food Science and Technology*, Submitted.
- Macedo, J. A., Battestin, V., Ribeiro, M. L., & Macedo, G. A. (2011). Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 491-497.
- Majchrzak, D., Mitter, S., & Elmadfa, I. (2004). The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chemistry*, 88(3), 447-451.
- Marotti, I., Bonetti, A., Biavati, B., Catizone, P., & Dinelli, G. (2007). Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) flavonoid glycosides by *Bifidobacterium* species from human intestinal origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3913-3919.
- Meselhy, M. R., Nakamura, N., & Hattori, M. (1997). Biotransformation of (-)-epicatechin-3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(5), 888-893.
- Neilson, A. P., Hopf, A. S., Cooper, B. R., Pereira, M. A., Bomser, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8941-8949.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F., & Shah, N. P. (2006). Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 39(4), 394-407.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Roginsky, V., & Alegria, A. E. (2005). Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4529-4535.
- Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., & Blaut, M. (1999). Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology*, 171(2), 81-91.

- Serra, A., Maclà, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N., & Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, *130*(2), 383-393.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, *48*(4), 413-434.
- Strahsburger, E., Baeza, M., Monasterio, O., & Lagos, R. (2005). Cooperative uptake of Microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(7), 3083-3086.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., & Shah, N. P. (2002). Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *Journal of Food Science*, *67*(8), 3104-3113.
- Uskova, M. A., Kravchenko, L. V., Avrenjeva, L. I., & Tutelyan, V. A. (2010). Effect of *Lactobacillus casei* 114001 Probiotic on Bioactivity of Rutin. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *149*(5), 578-582.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(7), 829-837.
- Wu, J., Aluko, R. E., & Muir, A. D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatographic assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *J Chromatogr A*, *950*, 125-130.

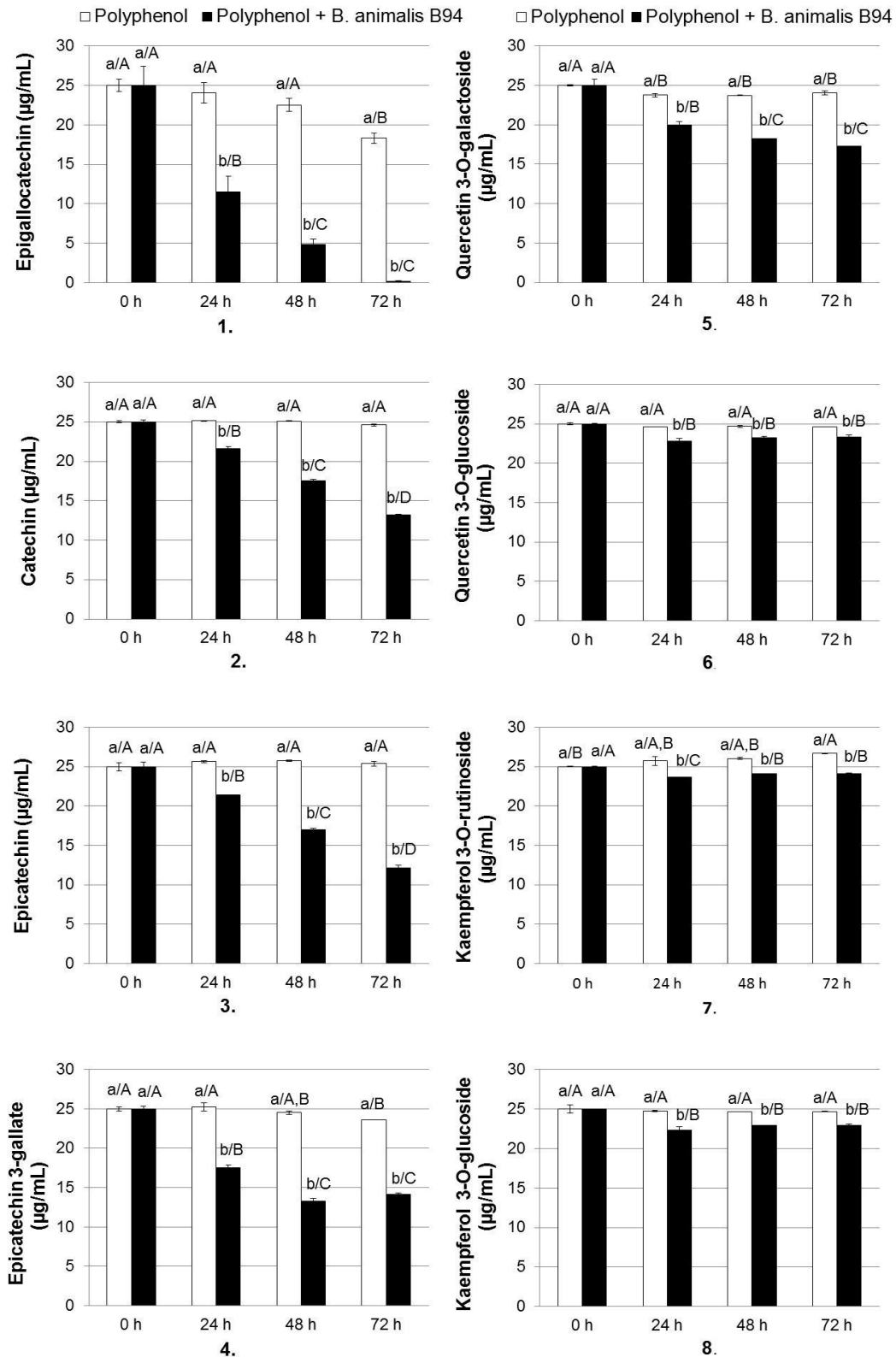


Figure 1. Comparison of the disappearance of 8 phenolic compounds solutions prepared separated, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis* B94. The results are expressed as mean \pm standard $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time ($p < 0.05$). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment ($p < 0.05$).

□ Polyphenol ■ Polyphenol + *B. animalis* B94 ∅ *B. animalis* B94 □ Polyphenol ■ Polyphenol + *B. animalis* B94 ∅ *B. animalis* B94

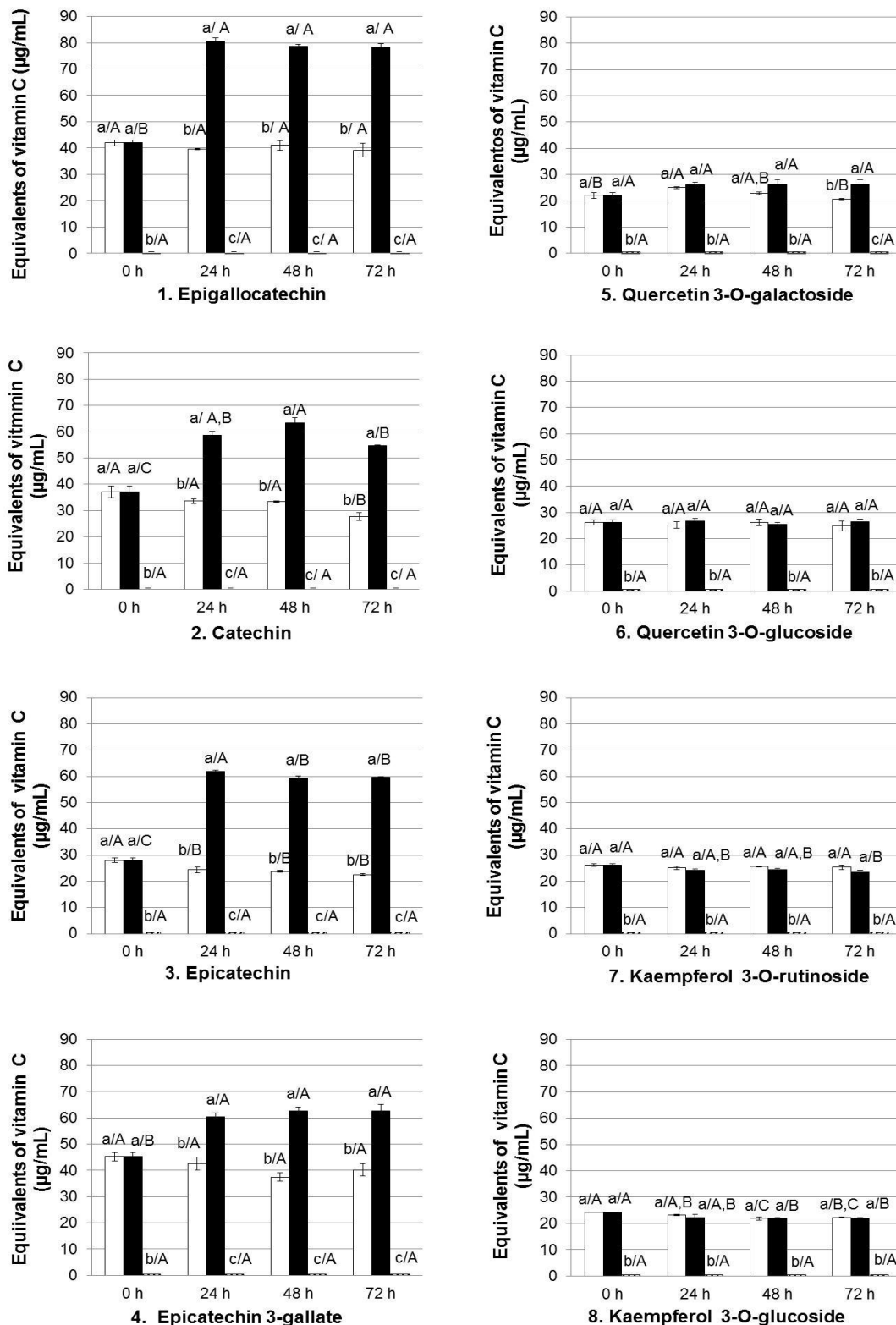


Figure 2. Comparison of vitamin C equivalents (ABTS) of 8 phenolic compounds solutions prepared separated, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis* B94. The results are expressed as mean \pm standard $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time ($p < 0.05$). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment ($p < 0.05$).

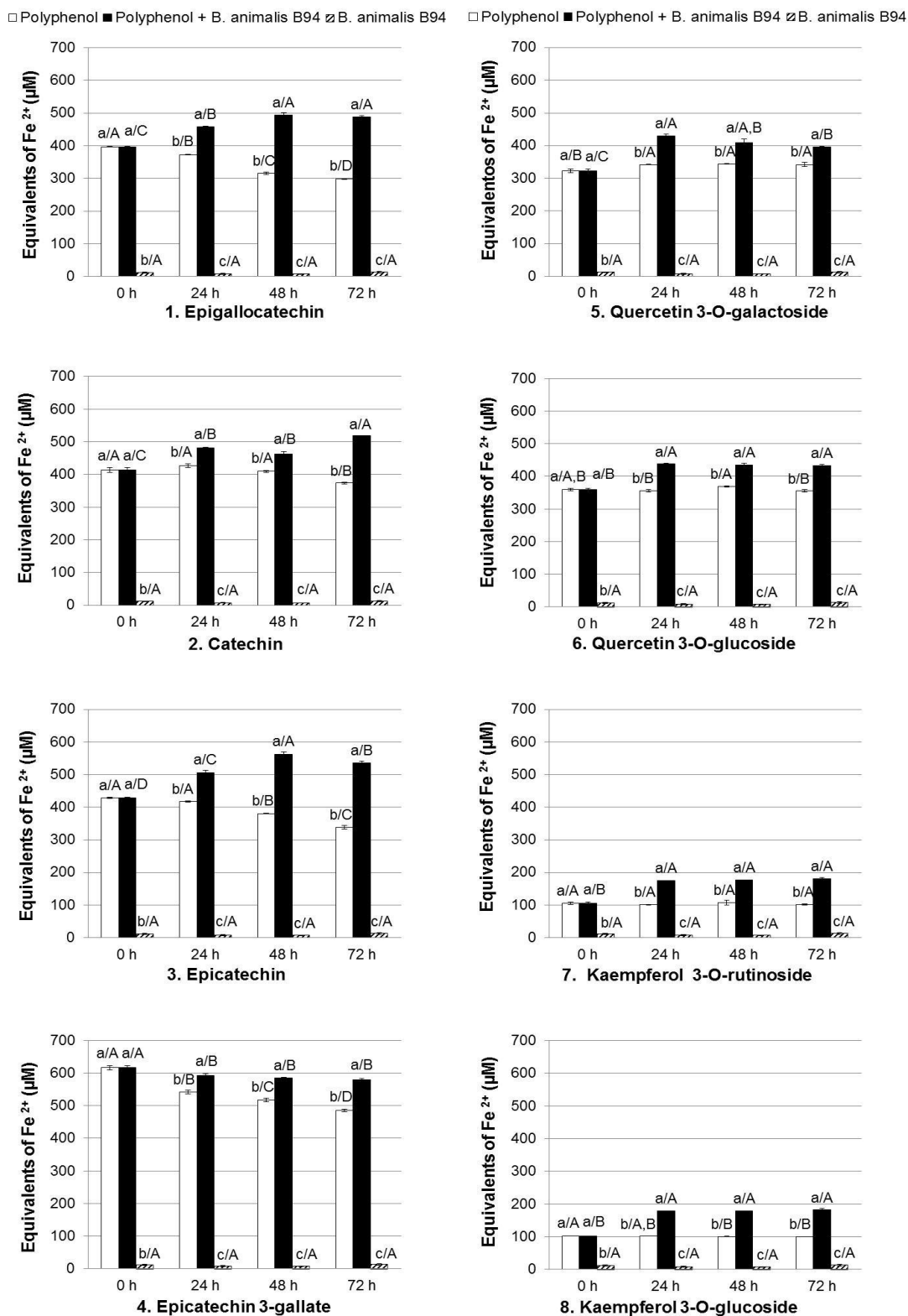


Figure 3. Comparison of Fe²⁺ equivalents (FRAP) of 8 phenolic compounds solutions prepared separated, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis* B94. The results are expressed as mean ± standard μM (n=3). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time (p < 0.05). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment (p < 0.05).

□ Polyphenol ■ Polyphenol + *B. animalis* B94 ∅ *B. animalis* B94

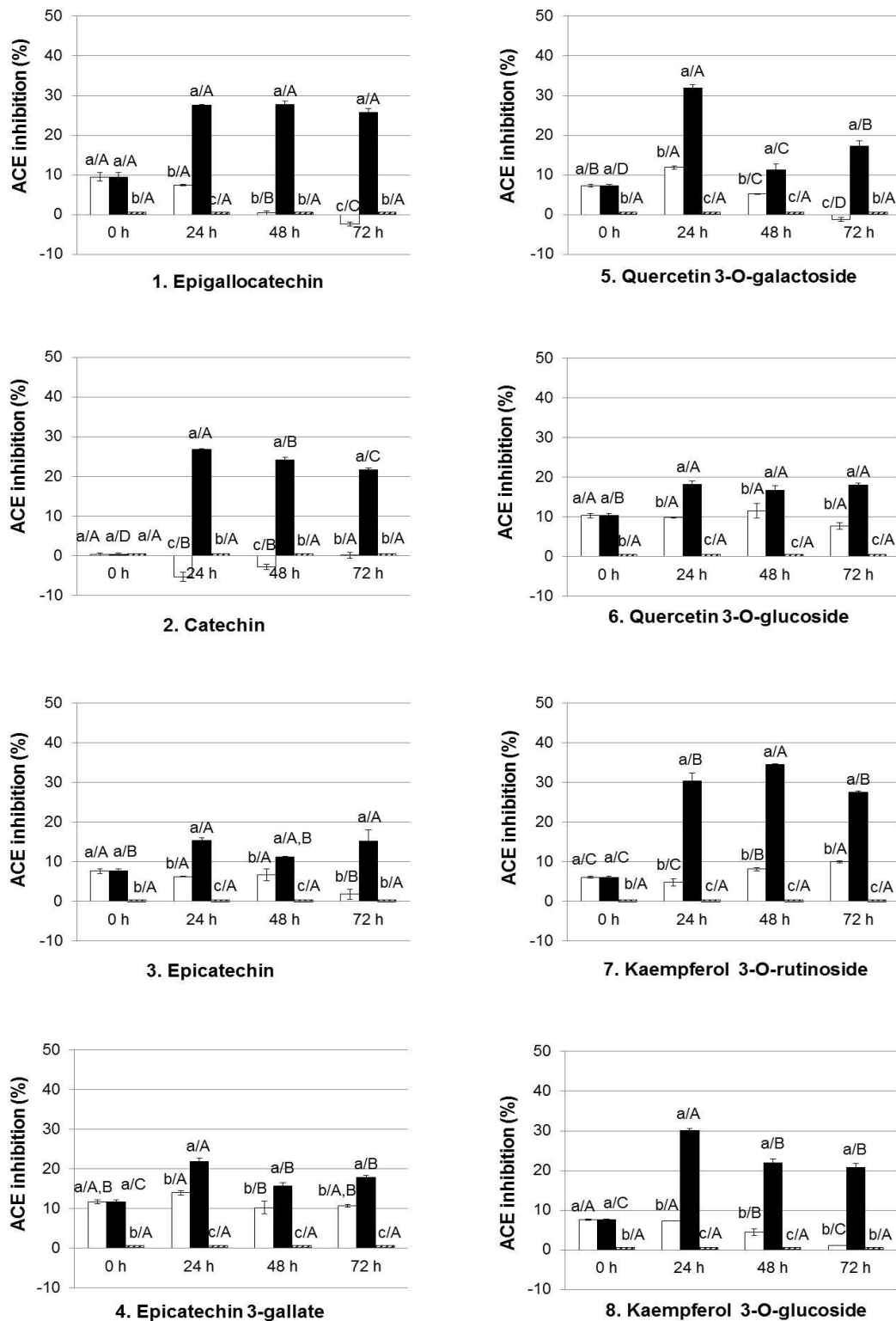


Figure 4. Comparison of ACE inhibition of 8 phenolic compounds solutions prepared separated, a) in control sample (without bacteria) and b) in the presence of *B. animalis* B94. The results are expressed as mean \pm standard % (n=3). ^{a, b, c} Means with different lower case letters indicate significant differences among treatments for the same time ($p < 0.05$). ^{A, B, C} Means with different upper case letters indicate differences among times for the same treatment ($p < 0.05$).

Table 1.
Survival of probiotic bacteria in Green Tea Extracts (GTE) expressed as mean \pm standard of Log CFU/mL and of survival percentage % (n=3).

	Incubation time (h)							
	0		24		48		72	
	Log CFU/mL	%	Log CFU/mL	%	Log CFU/mL	%	Log CFU/mL	%
Control	6.14 \pm 0.13 ^{a/E}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	5.45 \pm 0.05 ^{b/C}	88.73 \pm 2.26 ^{b/B}	<2	<20	<2	<20
Epigallocatechin	5.86 \pm 0.08 ^{a/F}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	5.39 \pm 0.07 ^{b/C}	91.97 \pm 0.09 ^{b/B}	<2	<20	<2	<20
Catechin	6.23 \pm 0.08 ^{a/D,E}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	6.13 \pm 0.08 ^{a/A}	98.49 \pm 2.90 ^{a/A}	<2	<20	<2	<20
Epicatechin	6.1 \pm 0.11 ^{a/E}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	4.49 \pm 0.16 ^{b/E}	73.49 \pm 2.14 ^{b/D}	<2	<20	<2	<20
Epicatechin 3-gallate	6.18 \pm 0.09 ^{a/D,E}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	3.58 \pm 0.12 ^{b/F}	57.86 \pm 1.28 ^{b/E}	<2	<20	<2	<20
Hyperoside	6.38 \pm 0.06 ^{a/E,C,D}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	5.86 \pm 0.07 ^{b/B}	91.96 \pm 2.06 ^{a/B}	5.07 \pm 0.15 ^{b/B}	79.56 \pm 2.14 ^{b/B}	<2	<20
Quercetin 3-glucoside	6.56 \pm 0.13 ^{a/A,B}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	5.42 \pm 0.08 ^{b/C}	82.64 \pm 1.45 ^{b/C}	3.33 \pm 0.04 ^{b/D}	51.26 \pm 1.42 ^{b/D}	<2	<20
Kaempferol 3-rutinoside	6.48 \pm 0.04 ^{a/B,C}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	4.72 \pm 0.02 ^{b/D}	72.90 \pm 0.56 ^{b/D}	4.2 \pm 0.1 ^{c/C}	64.79 \pm 1.32 ^{b/C}	<2	<20
Kaempferol 3-glucoside	6.72 \pm 0.01 ^{a/A}	100 \pm 0.00 ^{a/A}	5.48 \pm 0.03 ^{b/C}	81.58 \pm 0.54 ^{b/C}	5.51 \pm 0.05 ^{b/A}	81.97 \pm 0.93 ^{b/A}	<2	<20

a, b, c Means in the same line with different lower case letters indicate significant differences among different times for the same strain and GTE ($p < 0.05$). A, B, C Means in the same column with different upper case letters indicate significant differences among different strains for the same time and GTE ($p < 0.05$). 1, 2, 3 Means in the same column with different numbers indicate significant differences among different GTEs for the same strain and time ($p < 0.05$).

ARTÍCULO 8

López de Lacey, A.M., López-Caballero, M.E. y Montero, P.
(2012)

Agar films containing green tea extract and probiotic
bacteria for extending fish self-life

Food Microbiology

AGAR FILMS CONTAINING GREEN TEA EXTRACT AND PROBIOTIC BACTERIA FOR EXTENDING FISH SHELF-LIFE

López de Lacey A.M., López-Caballero M.E*, Montero P.

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) (formerly Instituto del Frío), C/ José Antonio Novais, 10, 28040. Madrid, Spain.

*Corresponding author: elvira.lopez@ictan.csic.es

Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

ABSTRACT

A bioactive film composed of agar, incorporating green tea extract and probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* L26 and *Bifidobacterium lactis* B94) was applied on hake fillets in order to evaluate the effect of the films during the fish storage. Hake was previously inoculated with *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium phosphoreum* to simulate a spoilage process. The green tea and/or probiotic film provoked a reduction, particularly of H₂S-producing bacteria counts and inhibition of the luminescent colonies, and also reduced the total microflora, *Pseudomonas* sp. and *Enterobacteriaceae* throughout the storage period. The probiotic strains (*B. animalis* B94 and *L. acidophilus* L26) added to the film passed to the fish producing an increment of lactic acid bacterial counts, even in the presence of green tea extract. The effect of the films also caused a decreased in the indexes of fish quality (NBVT, TMA and pH). The total viable counts and *Enterobacteriaceae* were maintained above the limits of acceptability during 7 days for the fillet covered with the green tea + probiotic film, compared to only 2 days for the rest of the samples. Films with green tea and probiotic films were able to extend shelf-life of hake and increase the beneficial lactic acid bacteria in fish.

Key words: active packaging, film, green tea, probiotic bacteria, fish shelf life.

1. INTRODUCTION

Fish is highly perishable during refrigerated storage, mainly due to rapid microbial growth of microorganisms naturally present in fish or from contamination, which can occasionally result in either economic or health-related problems (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010). In this connection, *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium phosphoreum* are some of the specific spoilage microorganisms that cause, among other things, unpleasant off-odors in fish like the production of trimethylamine from trimethylamine oxide (López-Caballero, Álvarez Torres, Sánchez-Fernández & Moral, 2002; López-Caballero, Sánchez-Fernández & Moral, 2001; Dalgaard, 1995). For this reason, some strategies have been recently developed with the objective to inhibit spoilage and pathogenic microorganisms.

One of these strategies is the application of active edible films which have proved to enhance shelf-life or even safety of fish (Gómez-Estaca, López de Lacey, Gómez-Guillén, López-Caballero, & Montero, 2009; Gómez-Estaca, et al., 2010). In addition to being an alternative to plastic packaging, edible films can avoid moisture loss, gas exchange, oxidation and photo-degradation. Furthermore, safety, nutritional and even sensory properties of edible films can be improved by the addition of several active ingredients into the polymer matrix (Gómez-Estaca, et al., 2009; Gómez-Estaca, et al., 2010; Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009).

Along with these ingredients, green teas possess, among other healthy beneficial effects, antimicrobial and antioxidant properties, primarily due to its own composition rich in polyphenols and other compounds like minerals, amino acids (Graham, 1992; López de Lacey, Pérez Santín, López-Caballero, & Montero, 2012a). These activities make tea extracts very suitable for its use as an active ingredient in edible films. Lately green tea extracts added to edible films, formulated with *Gelidium corneum*-gelatin blend or soy protein isolate, have been reported to improve their physical and antimicrobial properties of these films (Hong, Lim, & Song, 2009; Kim et al., 2006).

On the other hand, recently in the literature appears papers reporting that the incorporation of probiotic bacteria to films contribute to the stability and security of food: that is alginate-gellan incorporated with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 for coating of fresh fruits (apple and papaya) (Tapia et al., 2007) and in sodium-caseinate films incorporated with *Lactobacillus sakei* to control *Listeria monocytogenes* in culture medium and in fresh beef

(Gialamas et al., 2010). However, no references of the joint incorporation of probiotic bacteria and phenolic compounds in edible films have been reported.

Thus, the aim of this work was to investigate the effect of applying the films incorporating green tea extract and probiotic strains to fish during chilled storage. Changes on the natural microflora, paying special attention to *S. putrefaciens* and *P. phosphoreum*, and to the biochemical changes in muscle, were studied in order to evaluate the role of the films during the spoilage of fish.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Extraction of green tea

Chinese green tea (*Camellia sinensis* L.), known as *Wu Lu Mountain*, was used for preparing the extract. *Wu Lu Mountain* was purchased from a local specialized tea store. Dry green tea was ground into fine powder using a blender (Osterizer sunbeam model nº 4153-50). To prepare water extract, the powder (35 g) was mixed with distilled water (350 mL) at 80 °C for 30 minutes, with continuous stirring. The slurry mixture was centrifuged at 12000 g for 10 minutes at 5 °C. The supernatant was filtered twice through Whatman filter papers Nº 1. Finally, the filtered extract was stored at - 20 °C before the preparation of the film and analysis.

2.2. Bacterial strains and culture conditions

Two spoilage bacteria, obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT), were used for the inoculation of the fish: *Photobacterium phosphoreum* CECT 4192 and *Shewanella putrefaciens* CECT 5346T. The strains were stored at -80 °C in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) with 25% glycerol (Panreac, Moncada i Reixac, Barcelona, Spain) until use. The strains were grown in BHI broth (Oxoid) supplemented with 1% NaCl, and were incubated at 30 °C for *S. putrefaciens* and at 15 °C for *P. phosphoreum* for 24 h. Then, each bacteria suspension, obtained after incubation, was appropriately diluted in 0.9 % NaCl solution in order to obtain a target inoculum of 10^3 - 10^4 CFU/mL.

Two commercial probiotic bacteria purchased in DSM (DSM Food Specialties Ltd., Sydney, Australia) were used for the preparation of the bioactive films: *Lactobacillus paracasei* spp. LAFTI@L26 and *Bifidobacterium animalis* spp. lactis LAFTI@B94. The selection of the two strains was based on its antimicrobial properties against *Escherichia coli*, *Listeria*

monocytogenes and *Salmonella typhimurium* (Mahoney & Henriksson, 1999; Pidcock, Heard, & Henriksson, 2002), and its resistance to green tea extract studied. These strains were acquired lyophilized, and were kept at -20 °C. Appropriate quantity of each lyophilized bacteria was suspended in 0.9 % NaCl solution with the aim to obtain a target inoculum of 10^8 - 10^9 CFU/mL.

2.3. Preparation of films

Agar film forming solutions were prepared by dissolving 1.5 g of agar (Gold Agar, Hispanagar, Burgos, Spain), 1 g of glycerol, 2 g of glucose in 100ml of water (agar film) or a 50/50 v/v mixture of distilled water and green tea extract (agar-green tea film). Glycerol was employed as a plasticizer. The mixtures were stirred to obtain a good blend, and the films made by casting 40ml on 144 cm²-square plates, drying afterwards at 40 °C in a forced-air oven for 16-18h to yield a uniform thickness in all cases [200 µm (p≤0.05)]. The films were conditioned in desiccators for 2 days at 22 °C at 63% relative humidity.

For preparing the bioactive film, 100 µL of each probiotic bacteria solution (*Lactobacillus paracasei* LAFTI@L26 and *Bifidobacterium animalis lactis* LAFTI@B94), made as it was explained above in section 2.2., were spread on each squared film (12×12 cm) with a sterile loop. The inoculum was applied on agar and agar-green tea film. Four different types of films were then obtained: (i) agar film, (ii) agar probiotic film, (iii) agar green tea film and (iv) agar probiotic green tea film.

2.4. Fish preparation, inoculation and storage

Fillets of defrosted hake (*Merluccius capensis*), purchased at a local market, were cut in portions of (c.a. 100 g each). Each portion was inoculated with 5 mL of each spoilage bacteria suspensions prepared as it was explained above in section 2.2., with the objective to have an initial concentration of 10^{3-4} CFU/g. Finally, each piece of fish was covered with two squared films, which had the same dimensions (12 × 12 cm), and then vacuum-packed in bags (Cryovac BB-1, Grace, Barcelona, Spain). Batches were stored at 4 °C during 15 days. Five lots were prepared, all of them from hake inoculated with the microorganisms already mentioned: hake (H), hake with film (HF), hake with film and probiotic bacteria (HFP), hake with green tea film (HFT) and hake with green tea film and probiotic bacteria (HFTP).

2.5. Microbiological analysis

The microbial counts on the sample were performed immediately after inoculation and after 2, 7, 10 and 15 days of storage. The microbiological analyses were as follows: a total amount of 10 g of fish, from at least 3 different packages, was collected and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 mL of buffered 0.1% peptone water (Oxoid, Basingstoke, UK) in a vertical laminar-flow cabinet (mod. AV 30/70 Telstar, Madrid, Spain.) After 1 min in a Stomacher blender (model Colworth Stomacher 400), appropriate dilutions were prepared for the following microorganisms determinations: (i) luminescent bacteria on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 5 days as presumptive *Photobacterium phosphoreum*; (ii) H₂S-producing bacteria, as black colonies and presumptive *Shewanella putrefaciens*, on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 72 h; (iii) total bacteria counts (TBC) on spread plates of Iron Agar 1% NaCl incubated at 15 °C for 72 h; (iv) *Enterobacteriaceae* on double-layered plates of Violet Red Bile Glucose agar (VRBG, Oxoid) incubated at 30 °C for 24 h; (v) *Pseudomonas* on spread plates of Pseudomonas Agar Base (Oxoid) with added CFC (Cetrimide, Fucidine, Cephalosporine) supplement for *Pseudomonas spp.* (Oxoid) incubated at 25 °C for 48 h; (vi) lactic acid bacteria on double-layered plates of MRS Agar (Oxoid) incubated at 30 °C for 72 h; (vii) total viable bacteria on pour plates of PCA incubated at 30 °C for 72 h. All microbial counts are expressed as the log of the colony-forming units per gram (log CFU/g) of sample. All analyses were performed in triplicate.

2.6. pH

Approximately 5 g of muscle were homogenized with a double quantity (g/mL) of distilled water. After 5 min at ambient temperature, pH was determined with a pHm93 pH meter and a combined pH electrode (Radiometer, Copenhagen, Denmark). The experiments were repeated at least in triplicate.

2.7. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N)

Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N) determinations were performed by the methods described by Antonacopoulos and Vyncke (1989) and Malle and Tao (1987), respectively. Briefly, 10 g of the ground sample were weighed in a suitable container and homogenized with 100 mL 6% perchloric acid solution for 2 min. After filtering, the extract was alkalized with 20% sodium hydroxide solution for TVB-N determination or with 20% sodium hydroxide solution and formaldehyde for the TMA-N determination. Then,

the extracts were submitted to steam distillation. The volatile base components were absorbed by an acid receiver and determined by titration.

2.8. Instrumental colour analysis

The colour parameters lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) were measured using a Konica Minolta CM-3500d colorimeter (Aquatecnica S.A., Valencia, Spain). Illuminant D65 and 10° observer angle were used. Measurements were taken at a number of 4 locations in different fish portions and each point is the mean of at least 16 measurements.

2.9. Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm standard deviation (sd). Statistical tests were performed using the SPSS® computer program, version 19.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA). One-way and two-way analysis of variance (ANOVA) was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Microbial counts

Microbial counts (Log CFU/g) of hake fillet covered with different films are shown in Figure 1. Fillets were previously inoculated with two spoilage bacteria *S. putrefaciens* and *P. phosphoreum*, in order to simulate the fish spoilage and then to assess the effect of the films during storage. In spite of the inoculation of fish with *P. phosphoreum*, the luminescent bacteria could not be detected during the first days of storage (Fig. 1d). This is attributed to the adaptation of the strain to the storage conditions.

All the bacterial counts in hake sample (H) increased through storage, except for lactic acid bacteria (Fig. 1, Table 1). The lactic acid bacteria counts gradually decreased until small lower initial values were reached at the end of storage (Fig 1f), which could be due to the low storage temperature of fish. At the end of storage, H_2S -producing bacteria became the dominant group in hake (H) since their counts constitute the majority percentage of the total flora at 15 °C. The prevalence of *S. putrefaciens* was also observed by Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogués and Vidal-Carou (2003) in Mediterranean hake during storage.

In general, the application of films on hake fillet during the storage, especially those that contain green tea, reduced the major part of the microorganisms studied ($p \leq 0.05$). This effect is much lower or even insignificant on films that do not contain tea (with or without bacteria), whose counts were close or similar to those found in the control lot (Fig. 1).

Hake covered with the film + probiotic (HFP) showed an increment of the lactic flora at day 2 of storage, which is corresponded to the increase of the total flora (30 °C) (Fig. 1b, f). The increment of lactic acid bacteria can be due to the passage of probiotic bacteria from film to muscle. A slight reduction of H₂S-producing bacteria and *Enterobacteriaceae* was observed in this lot at the early stages of the storage (Fig. 1c, g). The effect of probiotic bacteria against the mentioned bacteria seems to be lost along the preservation of fish. However, other authors observed an important improvement in the production and safety of the Hungarian salami by the use of probiotic bacteria cultures (the same used in the present work) (Pidcock, et al., 2002). In that case, salami was fermented with the probiotic bacteria at 25 °C, followed by maturation at 15 °C; whereas in our study the conditions of fish storage were at 4 °C. This low temperature may not favour the growth of the probiotic bacteria, and therefore the bacteria might not be in a good condition to exert an effect on fish microflora.

The films containing green tea extract (samples HFT and HFTP) reduced or even inhibited most of the studied microorganisms. Green tea extract is likely the principal responsible for the inhibitory activity, especially for those counts of psychrotropic organisms (total bacteria at 15 °C, H₂S-microorganisms, *Pseudomonas* sp., and luminiscent colonies) (Fig 1). The most sensitive microorganisms were the luminescent colonies, presumptive *P. phosphoreum* (Fig. 1d), since the green tea films inhibited completely its growth, while lactic acid bacteria (Fig. 1f) remained more or less constant during the storage. The decrease in counts was more noticeable in H₂S-producing bacteria and total flora (15 °C), with reductions up to 4 logarithmic cycles ($p \leq 0.05$). It is also interesting to note that the inhibitory effect of green tea films is lost over time in some cases. Thus, for example, *Enterobacteriaceae* was reduced to a large extent at 10 days ($p \leq 0.05$) rather than at 15 days of storage. This could be due to some reasons: the effect of tea might last a period of time and lose activity during the whole storage; the strains might adapt to antimicrobial compounds of green tea and develop resistance to these compounds or that the green tea films could not be able to inhibit the growth by the effect of the bacterial proliferation.

The antimicrobial activity of the green tea extract (*Wu Lu Mountain*) added to the film has been demonstrated against Gram negative bacteria, such as *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and *Vibrio parahaemolyticus* (López de

Lacey, et al., 2012a). In this connection, green tea extracts (both aqueous and ethanolic ones) showed inhibition on Gram-positive microorganisms (including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*), but not on Gram-negative microorganisms (*E. coli* or *Salmonella enterica*), (Chiu et al., 2010). These authors found that when green tea extract was incorporated to edible coatings (based on tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gun), a clear antimicrobial activity on Gram-positive bacteria was also found since the active compounds could migrate from the coating and increase the inhibition area.

Catechins, group of polyphenols, present abundantly in green tea extract, have been reported as responsible for the antimicrobial action of tea infusions against Gram negative and positive bacteria (Almajano, Carbó, Jiménez, & Gordon, 2008; Singh Arora, Jeet Kaur, & Kaur, 2009; Sivarooban, Hettiarachchy, & Johnson, 2008). Ku, Hong and Song, 2008 obtained that the incorporation of catechin into the *Gelidium–corneum* edible film increased the degree of inhibition of *E. coli* O157:H7, with an increase in the catechin concentration. Several effects of catechins on the bacteria, proposed by different authors (Cushnie & Lamb, 2011), could provoke the inhibition or the reduction of the bacterial growth such as: alteration of the cell morphology (Sivarooban, et al., 2008), inhibition of essential enzymes (Gradišar, Pristovšek, Plaper, & Jerala, 2007; Navarro-Martínez et al., 2005), inhibition of energy metabolism (Chinnam et al., 2010) or the production of hydrogen peroxide by oxidation of catechins (Arakawa, Maeda, Okubo, & Shimamura, 2004). According to Shimamura, Zhao and Hu (2007) the inhibition caused by the attack of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) to the lipid bilayer of bacterial cell membrane may be minor in Gram-negative bacteria since this membrane is protected by an outer cell wall. Our results showed that the sensitivity of Gram-negative bacteria to catechins natural, presented in green tea incorporated into an edible film, could be variable, ranging from major (*P. phosphoreum*) to minor inhibition (*Pseudomonas sp.*).

Previous studies have demonstrated that green tea do not affect the growth of *Bifidobacterium* B94 and *Lactobacillus* L26 (López de Lacey et al., 2012b). For this reason, the counts of lactic acid bacteria in both lots containing bacteria with tea (HFPT) or without tea (HFP) should have been similar. However, >2 log units of difference was found (the lower counts corresponding to HFPT) (Fig. 1f). Thus, it might be possible that green tea film could affect the growth of lactic acid bacteria of hake somehow, but not affecting to the probiotic inoculated.

In general, hake covered with green tea film and probiotic (HFTP) presented the lowest values of microbial counts at the end of storage ($p \leq 0.05$). Thus, although green tea is the principal responsible for the reduction of the microbial counts, the joint presence of probiotic

bacteria could have a certain additive effect on microbial growth (Fig 1a, g, e). In this sense, Su, Henriksson, Nilsson and Mitchell (2008) observed a clear synergistic effect between *L. acidophilus* L10, *B. animalis* B94 and *L.casei* L26 and a green tea extract (“TEAVIGO™”) in relation to the inhibition of growth *in vitro* of *S. aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Even although previous references on the joint incorporation of tea extract and probiotics in an edible film are not known, the relationship between probiotics and other polyphenolic compounds is established. Thus, flavonoids have been reported to have effects on the gut microflora as an increase in the count of beneficial bacterias (*Lactobacillus rhamnosus*), enhance adherence of this bacterium on the gut wall and inhibition of the proliferation of enteropathogens like *S. aureus* or *Salmonella thyphimurium* (Parkar, Stevenson & Skinner, 2008).

3.2. pH

Changes in pH of hake are shown in Figure 2a. Hake (H) used in the experiment had an initial pH of 7.02. This pH remains constant until day 10, reaching pH>7.7 at 15 days ($p\leq 0.05$). Similar behaviour was observed in HF and HFP lots, being the progression of this last sample slower. On the contrary, the hake covered with green tea film, with or without probiotic bacteria (HFT, HFTP), maintained the initial levels of pH ~7 at the end of storage period. This result can be a consequence of the low bacterial counts observed in these samples since the bacterial activity was reduced, and therefore, could produce minor quantities of some volatile base compounds, which can provoke an increment of pH (Reddy, Villanueva, & Kautter, 1995).

3.3. Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N)

The initial TVB-N was 9.95 mg/100 g fish (Figure 2b). The TVB-N values increased gradually throughout the conservation in all the samples, except in the hake covered with the green tea film, without (HFT) or with probiotic (HFTP). Thus, the production of TVB-N of these samples was markedly reduced by about 75 and 62 %, respectively, comparing with the control at day 15 of storage. These results are consistent with the higher antimicrobial capacity of these films (Fig 1). It is also worth noting that the hake covered with green tea maintained the levels of TVB-N above the limit of acceptability (30 to 35 mg/100 g) set by the European Union regulation (EC, 1995). The initial TMA-N in hake was 9.43 mg/100 g fish (Figure 2c). The major reduction in these values was also noticed in the HFT and HFTP lots at the end of the storage, with decreases around 80 % compared with the control sample (H).

In both indexes, TMA and TVB, the behavior of the lots is similar until 10 day, from which the lots that do not contain green tea extract in their film formulation presented an exponential rise of the amine volatile concentration. This fact was consistent with the lessening of H₂S-producing bacteria and luminescent colonies, which were also observed from day 10. Thus, green tea film seems to be the cause of the reduced levels of TVB-N and TMA-N, caused mainly by the inhibition or reduced growth of bacteria such as *S. putrefaciens* and *P. phosphoreum*, which are involved in the production of basic compounds (TVB-N and TMA-N) in fish (López-Caballero et al., 2001, 2002; Dalgaard, 1995).

3.4. Colour

All the samples maintained stable values of lightness (L*) throughout the conservation and although significant small differences were founded in some cases, they do not differ by more than 10 per cent. The low values of redness (a*) are according to the lack of hematic pigment, etc. characteristic of hake. The samples H and HF did not present modifications ($p \leq 0.05$) of the tendency towards yellowness value (b*). However, the application of the green tea film produced a slight yellow tone in the fish which can be attributed to the polyphenols present in green tea. This colour was stable throughout the storage ($p \leq 0.05$).

In summary, the application of green tea films on hake delayed or even prevented the growth of microorganisms in fish and, therefore, reduced the spoilage indexes. The probiotic strains passed to the fish, producing an increment of lactic acid bacterial counts, even in the presence of green tea extract; but they had a smaller effect over the chemical spoilage indicators. Probiotic strains alone exerted a biopreservation on fish by reducing the H₂S-producing organisms. Thus, it can be concluded that films with green tea and probiotic films could extend shelf-life of hake and, at the same time, it could be a way to incorporate beneficial probiotics strains to the fish.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by Ministerio de Ciencia e Innovación under projects I3-200670I141, AGL2008-00231/ALI and CYTED 309ACO382. Program JAE-CSIC predoctoral is fully acknowledged. The author thanks Joan Therese de Lacey for the English language revision of the article.

This centre has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the requirements of the ISO standard 9001:2000.

References

- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, *108*(1), 55-63.
- Antonacopoulos, N., & Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *189*(4), 309-316.
- Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S., & Shimamura, T. (2004). Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(3), 277-281.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (2003). Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage. *European Food Research and Technology*, *217*(2), 164-167.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38*(2), 99-107.
- Chinnam, N., Dadi, P. K., Sabri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A., & Ahmad, Z. (2010). Dietary bioflavonoids inhibit Escherichia coli ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules*, *46*(5), 478-486. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.03.009
- Chiu, P.-E., & Lai, L.-S. (2010). Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *International Journal of Food Microbiology*, *139*(1-2), 23-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.010
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, *26*(3), 319-333.
- EC. The Commission of the European Communities 95/149/EC (1995). Determination of the concentration of volatile nitrogenous bases (TVB-N) in fish and fish products: a reference procedure. *Official Journal of the European Communities*, N° L 97:84-7.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of Lactobacillus sakei into sodium-caseinate films for controlling Listeria monocytogenes in foods. *Food Research International*, *43*(10), 2402-2408. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.020
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2009). Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and

- Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 46-52. doi: 10.1080/10498850802581252
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Gradišar, H., Pristovšek, P., Plaper, A., & Jerala, R. (2007). Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(2), 264-271.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350. doi: 10.1016/0091-7435(92)90041-f
- Hong, Y. H., Lim, G. O., & Song, K. B. (2009). Physical properties of Gelidium corneum-gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. *Journal of Food Science*, 74(1), C6-C10.
- Kim, K. M., Lee, B. Y., Kim, Y. T., Choi, S. G., Lee, J., Cho, S. Y., & Choi, W. S. (2006). Development of antimicrobial edible film incorporated with green tea extract. *Food Science and Biotechnology*, 15(3), 478-481.
- Ku, K. J., Hong, Y. H., & Song, K. B. (2008). Mechanical properties of a Gelidium corneum edible film containing catechin and its application in sausages. *Journal of Food Science*, 73(3), C217-C221. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00700.x.
- López-Caballero, M. E., Álvarez Torres, M. D., Sánchez-Fernández, J. A., & Moral, A. (2002). Photobacterium phosphoreum isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in model system under controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 215(5), 390-395.
- López-Caballero, M. E., Sánchez-Fernández, J. A., & Moral, A. (2001). Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained at 0 °C under different CO₂ and O₂ concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, 64 (3):277-287.
- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2012a). Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (*Camellia sinensis* L.) as an expression of its chemical composition. (Submitted).
- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2012b). Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. (Submitted).

- Mahoney M., H. G., & Henriksson A. (1999). Novel probiotic lactic acid bacteria that grow in curing salts and inhibit pathogens associated with fermented meat products. In: *Seventeenth International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH, Food Micro '99)*, Veldhoven, The Netherlands, 1999.
- Malle, P., & Tao, S. H (1987). Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation. *Journal of Food Protection*, 50(9), 756–760.
- Navarro-Martínez, M. D., Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Ruiz-Gómez, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2005). Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2914-2920.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E., & Skinner, M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 295-298.
- Pidcock, K., Heard, G. M., & Henriksson, A. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 75-81.
- Reddy, N. R., Villanueva, M., & Kautter, D. A. (1995). Shelf life of modified-atmosphere-packaged fresh tilapia fillets stored under refrigeration and temperature-abuse conditions. *Journal of Food Protection*, 58(8), 908-914.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(10), 438-447.
- Shimamura, T., Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2007). Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an anti-infective agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 6(1), 57-62.
- Singh Arora, D., Jeet Kaur, G., & Kaur, H. (2009). Antibacterial activity of tea and coffee: Their extracts and preparations. *International Journal of Food Properties*, 12(2), 286-294.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal of Food Protection*, 71(10), 2105-2109.

- Su, P., Henriksson, A., Nilsson, C., & Mitchell, H. (2008). Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1837-1842.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A., & Martín-Belloso, O. (2007). Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. *Journal of Food Science*, 72(4), E190-E196. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00318.x

Figure legends

Figure 1. Microbial counts in hake during chilled storage (4 °C). (H), hake-film (HF), hake-film + probiotic (HFP), hake-green tea film (HFT) and hake-green tea film + probiotic bacteria (HFTP)

Figure 2. pH, total volatile base nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N) of hake during chilled storage (4 °C). Hake (H), hake-film (HF), hake-film + probiotic (HFP), hake-green tea film (HFT) and hake-green tea film + probiotic bacteria (HFTP).

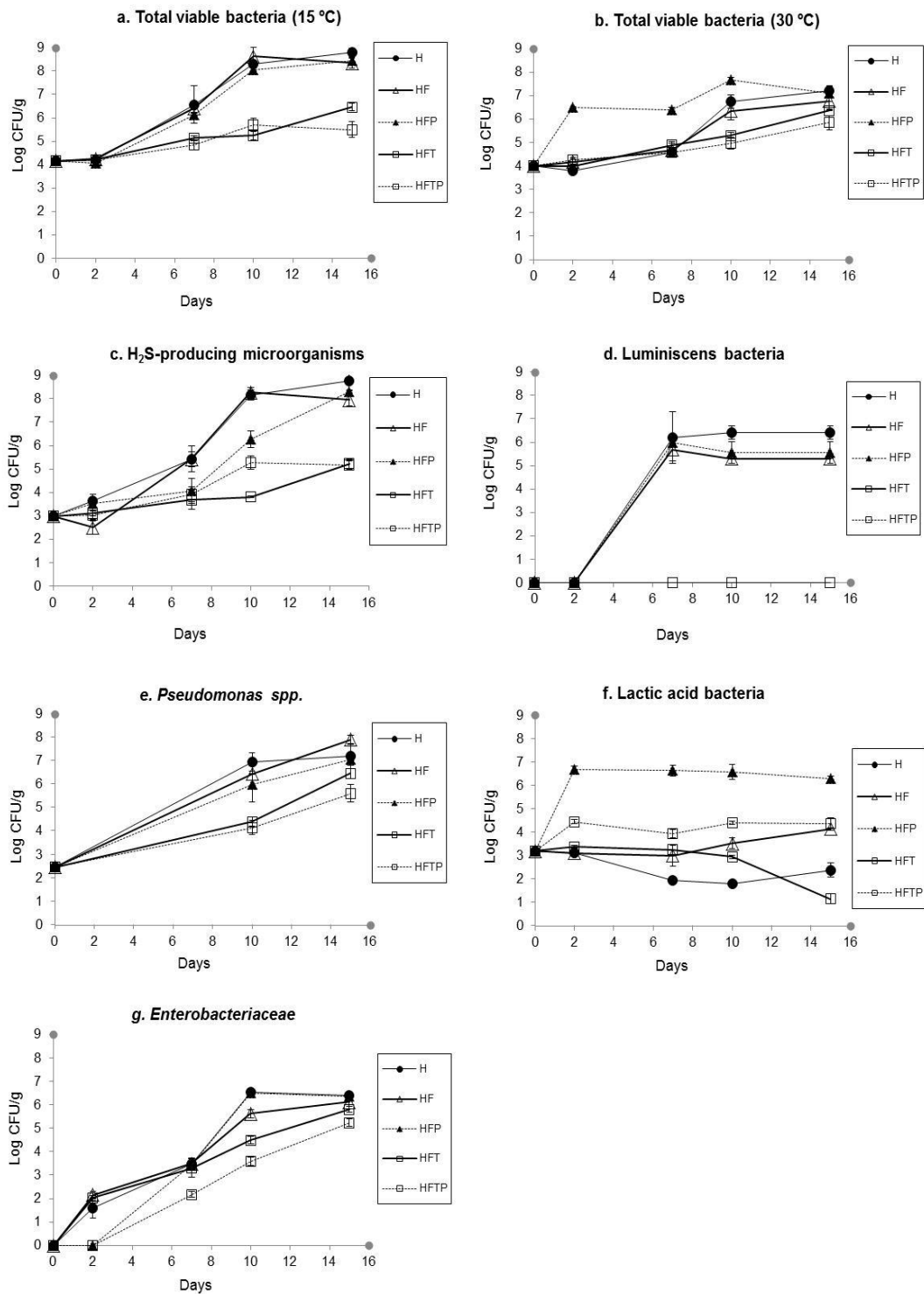


Figure 1.

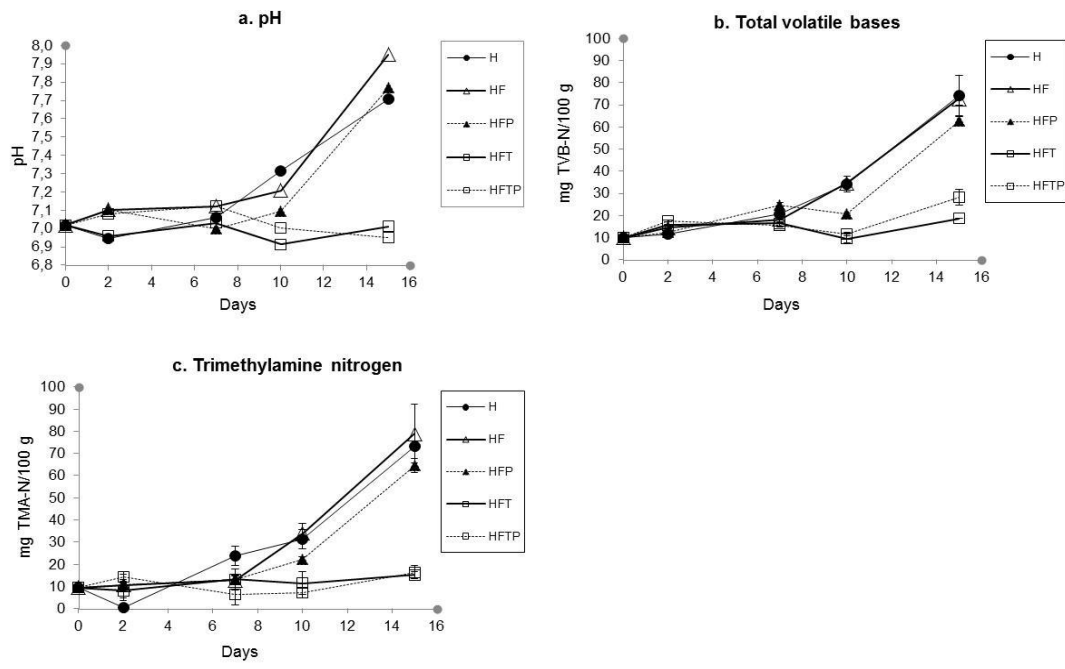


Figure 2.

ARTÍCULO 9

López de Lacey, A. M., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Faulks R., Mandalari, G., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2012)

Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible agar film during simulated human digestion

Food Research International.

doi:10.1016/j.foodres.2012.04.024.

Accepted Manuscript

Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible agar film during simulated human digestion

A.M. López de Lacey, B. Giménez, E. Pérez-Santín, R. Faulks, G. Mandalari, M.E. López-Caballero, P. Montero

PII: S0963-9969(12)00173-1
DOI: doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.024
Reference: FRIN 4095

To appear in: *Food Research International*

Received date: 12 February 2012
Accepted date: 11 April 2012

Please cite this article as: López de Lacey, A.M., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Faulks, R., Mandalari, G., López-Caballero, M.E. & Montero, P., Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible agar film during simulated human digestion, *Food Research International* (2012), doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.024

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



BIOACCESSIBILITY OF GREEN TEA POLYPHENOLS INCORPORATED INTO AN EDIBLE AGAR FILM DURING SIMULATED HUMAN DIGESTION

López de Lacey, A. M.^a, Giménez, B.^{a,*}, Pérez-Santín, E.^a, Faulks R.^b, Mandalari, G.^{b,c}, López-Caballero, M. E.^a, Montero, P.^a

^a Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC**, C/ José Antonio Novais, 10, 28040. Madrid, Spain.

^b Model Gut Platform, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UA, United Kingdom.

^c Pharmaco-Biological Department, University of Messina, Vill. SS. Annunziata 98168 Messina, Italy

* Corresponding author: e-mail: bgimenez@ictan.csic.es; Tel.: +34 91 5492300; fax: +34 91 5493627.

** This centre has implemented and maintains a Quality Management System which fulfils the requirements of the ISO standard 9001:2000.

ABSTRACT

Simple edible films can be manufactured to meet not only their primary protective purpose but can be easily manipulated to meet sensory expectations and to contain compounds which enhance the protective properties or even have the potential to deliver health benefits. However, the use of such edible films not only to protect the food but as a vehicle to deliver health benefits has not been investigated. In this paper we study agar films containing an aqueous extract of green tea, rich in polyphenol compounds, and the bioaccessibility of these compounds during simulated digestion in the upper gastro-intestinal tract using a dynamic gastric model (DGM) and a static duodenal model. It is concluded that the recovery of the tea compounds added to the agar film mainly occurs in the stomach (50-80%) and that little or no additional recovery is observed in the duodenum. Furthermore, the green tea compounds recovered show both reducing power and radical scavenging ability, but not antimicrobial activity. The bioaccessibility of the green tea flavonols is reduced in the presence of gelatin used to simulate the presence of protein in the stomach, but it is not clear if this is due to reduced release or sequestration of released compounds by the gelatin.

Key words

Edible film, green tea, polyphenols, bioaccessibility, digestion

Abbreviations

EGC, (-)-epigallocatechin; C, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; ECG, (-)-epicatechin-3-gallate; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate; DGM, dynamic gastric model; HPLC, high performance liquid chromatography; FRAP, ferric reducing ability of plasma; ABTS, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); VCEAC, vitamin C equivalent antioxidant capacity; T, green tea extract; FT, agar-green tea film; TG, green tea extract + gelatin; FTG, agar-green tea film + gelatin.

1. INTRODUCTION

The quality and safety of fresh and processed food can be enhanced by the application of edible films and coatings. These edible films can avoid moisture loss, gas exchange, oxidation, photo degradation and control surface microbial spoilage and contamination. Furthermore, safety, nutritional and even sensory properties of edible films and coatings can be improved by the addition of several active ingredients into the polymer matrix (Gómez-Estaca, López De Lacey, Gómez-Guillén, López-Caballero, & Montero, 2009; Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén, & Montero, 2010; Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009). Green tea extract has been recently used as a safe active ingredient in edible films for the improvement of physical and antimicrobial properties (Hong, Lim, & Song, 2009; Kim et al., 2006).

Green teas are rich in flavan-3-ols (epicatechin, catechin and galloylated derivatives), which are responsible for the majority of biological activities. Other polyphenols present in green teas are the flavonols which are mainly glycosylated derivatives of quercetin and kaempferol. Green tea also contains pigments, amino acids, vitamins, carbohydrates, minerals and purine alkaloids (Graham, 1992). The beneficial effects of green tea have been widely described (Graham, 1992) and attributed to many of these compounds, but mainly to phenolic compounds and their antioxidant properties (Bolling, Chen, & Blumberg, 2009; Weisburger & Chung, 2002). When incorporated into edible films, green tea extract can have two functions: active packaging (improving shelf life and quality of food) (Hong et al., 2009) and as a vehicle to deliver compounds which may have potential beneficial effects when the edible film is consumed and releases the polyphenols.

In the literature there are scarcely any studies on the simulated digestibility of edible films and/or on the release of active compounds incorporated into them. However, in order to retain the potential health benefits of green tea components incorporated into edible films, it is essential to know if they are released during digestion. Only the polyphenols released from solid matrices become bioaccessible and are potentially available for absorption by the gastrointestinal tract and, therefore, able to exert their beneficial effects in the human body (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). Other factors involved in the bioaccessibility of polyphenols are the transformations (degradation, epimerization, hydrolysis and oxidation) suffered by polyphenols under gastro-intestinal conditions and the interaction between these compounds and food components, which may also modify the biological

activity of the phenolic compounds. Interactions between phenolic compounds and some dietary factors, for example proteins and iron, can alter the biological properties and bioaccessibility of polyphenols (Argyri, Proestos, Komaitis, & Kapsokafalou, 2005). Proteins can link to polyphenols and form protein-polyphenol complexes by multiple weak interactions (mainly hydrophobic) or strong interactions (covalent bonds) (Ishii et al., 2008; von Staszewski, Pilosof, & Jagus, 2011). These interactions are affected by the nature of the protein, the temperature of the system and the presence of other components (von Staszewski et al., 2011).

In this study green tea extract and green tea edible films were subjected to simulated human digestion in the upper gastrointestinal (GI) tract (gastric and duodenal digestion). The release of total polyphenols as well as the major flavan-3-ol and flavonols of the green tea was determined in aliquots collected at different times during *in vitro* GI digestion of both tea extract and edible films. Furthermore, the antioxidant and antimicrobial activities were determined in these aliquots and compared with those of the green tea extract. To assess the effect of the well known interactions between protein and polyphenols, gelatin was added to simulate the presence of dietary protein during the digestion.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemical and enzymes

Standard polyphenol compounds: (-)-epigallocatechin (EGC; CAS: 970-74-1), (+)-catechin (CAS:154-23-4), (-)-epicatechin (EC; CAS: 490-46-0), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG; CAS: 1257-08-5), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG; CAS: 989-51-5), rutin (CAS: 153-18-4), Hyperoside (CAS: 482-36-0), quercetin-3-*O*- glucoside (CAS: 482-35-9), kaempferol-3-*O*-rutinoside (CAS: 17650-84-9), kaempferol-3-*O*-glucoside (CAS: 480-10-4) were purchased from Extrasynthese (Genay, Cedex, France).

***In vitro* digestion:** Egg L- α -phosphatidylcholine (PC, lecithin grade 1, 99% purity) was obtained from Lipid Products (South Nutfield, Surrey, U.K.). Porcine gastric mucosa pepsin (activity of 3,300 U/mg of protein calculated by using hemoglobin as substrate), bovine α -chymotrypsin (activity of 40 U/mg of protein using benzoyl-L-tyrosine ethyl ester as substrate), α -amylase (activity 10 U/mg of solid using starch as substrate), porcine trypsin (activity of 13,800 U/mg of protein using benzoyl-L-arginine ethyl ester as substrate), porcine pancreatic lipase (activity of 25,600 U/mg protein), cholesterol, porcine colipase, sodium taurocholate

and sodium glycoldeoxycholate were obtained from Sigma (Poole, Dorset, U.K.). Lipase for the gastric phase of digestion was a gastric lipase analogue of fungal origin (F-AP15; activity of ≥ 150 U/mg) from Amano Enzyme (Nagoya, Japan). Porcine gelatin (60 bloom), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine, FeCl_3 , FeSO_4 , ABTS radical [2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], potassium persulphate, and L-ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA.

2.2. Extraction of green tea

Chinese green tea known as *Wu Lu Mountain (Camellia sinensis L.)* was purchased from a local specialized tea store. The dry green tea was ground into powder using a blender (model 4253-50, Oster, Madrid, Spain). To prepare water extract, the powder (35 g) was mixed with MiliQ water (350 mL) at 80 °C for 30 min, with continuous stirring. The slurry was centrifuged at 12 000 g for 10 min at 5 °C. The decanted supernatant was filtered twice through Whatman N° 1. The filtered extract was stored at - 20 °C until preparation of the film and analysis.

2.3. Preparation of films

Agar film forming solutions were prepared by dissolving 1.5 g of agar (Gold Agar, Hispanagar, Burgos, Spain) and 1 g of glycerol in 100ml of water (agar film, F) or a 50/50 v/v mixture of distilled water and green tea extract (agar-green tea film, FT). The mixtures were stirred to obtain a good blend, and the films made by casting 40ml on 144 cm²-square plates, drying afterwards at 40 °C in a forced-air oven for 16-18h to yield a uniform thickness in all cases [200 μm ($p \leq 0.05$)]. Films were conditioned in desiccators for 2 days at 22 °C at 58% relative humidity.

2.4. *In vitro* digestion studies

Duplicate *in vitro* digestions under gastric and duodenal conditions with and without gelatin (16 mL of porcine gelatin solution at 0.5 % per digestion) were carried out on: green tea extract (T), agar-green tea film (FT), green tea extract + gelatin (TG) and agar-green tea film + gelatin (FTG). The agar film without green tea (F) extract was used as a control to check for interference in the analysis of polyphenols by digestion products.

Before performing the simulated human digestion, 20 mL of green tea extract, volume necessary to prepare 1.1 g of film, was mixed with 20 mL of simulated gastric secretion and made up to 240 mL with sterile water. The film (1.1 g) was mixed with the same proportions of

sterile water (240 mL) and gastric solution (20 mL) before the *in vitro* digestion studies. Porcine gelatin solution (16 mL) at 0.5 % was added to the sterile water in the samples with gelatin, keeping the same proportion previously mentioned. The samples thus dissolved were fed to the dynamic gastric model (DGM), used to provide a realistic and predictive simulation of human gastric processing. The DGM is a computer controlled gastric model which incorporates the chemical, biochemical, physical environment and processes of the human stomach, based on the kinetic data derived from Echo planar -MRI and data on the rates of GI digestion obtained from human studies via naso-gastric and naso-duodenal aspiration and ileostomy patients (Marciani et al., 2007; Marciani et al., 2008).

The simulated gastric secretions, bile and pancreatic bile, were prepared as previously reported (Pitino et al., 2010) with some modifications. The DGM works in real time to produce a variable number of samples simulating the digesta that would be emptied from the antrum into the duodenum (Pitino et al., 2010). The digestion conditions of each sample were such as to provide 6 samples over the total gastric digestion time of 24 min, and a gastric emptying rate of approximately 11.3 mL/min. Each gastric sample was weighed, the pH measured and adjusted to 6.8 with NaOH in order to inhibit gastric enzyme activity before performing the determinations.

2.4.1. Simulated gastric secretions

The simulated gastric acid solution contained HCl (0.2 M), NaCl (58 mM), KCl (30 mM), CaCl₂ (0.5 mM) and NaH₂PO₄ (0.9 mM). The simulated gastric enzyme solutions were prepared by dissolving porcine gastric mucosa pepsin (8962 U/mL) and gastric lipase (60 U/mL) in the above described salt mixture (no acid). A solution of single shelled lecithin liposomes prepared as described by (Mandalari et al., 2008) was added to the gastric enzyme solution at a final concentration of 0.38 mM.

2.4.2. Simulated bile

Simulated bile contained lecithin (6.5 mM), cholesterol (3 mM), sodium taurocholate (12.5 mM) and sodium glycodeoxycholate (12.5 mM) in a salt solution made of NaCl (146.0 mM), CaCl₂ (2.6 mM) and KCl (4.8 mM). The suspension was covered with a blanket of nitrogen, adjusted to pH 6.8 and equilibrated in an orbital shaking incubator (170 rpm) at 37 °C.

2.4.3. Simulated pancreatic juice

Pancreatic juice solution contained NaCl (146 mM), KCl (4.8 mM), CaCl₂ (2.6 mM), MgCl₂ (0.7 mM) and ZnSO₄·7H₂O (36.9 μM). Porcine pancreatic lipase (500 U/mL), porcine colipase (0.2 mg/mL), porcine trypsin (11 U/mL), bovine α-chymotrypsin (24 U/mL) and porcine α-amylase (300 U/mL) were added to pancreatic juice.

2.4.4. Simulated duodenal digestion

The serial samples obtained from the DGM were incubated under duodenal conditions as previously reported (Pitino et al., 2010). An aliquot (3.3 mL) of each gastric sample was used for simulated duodenal digestion and 1 mL of hepatic mix and 2.8 mL of pancreatic enzymes solution were added. Samples were digested for 2 h at 37 °C, and aliquots (1 mL) were taken every 30 min for the different analyses.

2.5. Determination of phenol compounds and antioxidant activity

The different determinations were carried out on aliquots of a timed series of samples collected during simulated gastric and duodenal digestion. These determinations permitted the calculation of the percentage of total phenolic compounds, eleven green tea flavonoids (HPLC), reducing power (FRAP assay) and radical scavenging capacity (ABTS assay) released over time during each stage of the digestion.

2.5.1. Determination of total phenolic

Although the Folin-Ciocalteu or total phenolic assay has been used for many years as a measure of total phenolics in natural products, this method actually measures the sample's reducing capacity and therefore can be considered as an antioxidant capacity assay (Prior, Wu, & Schaich, 2005; Huang, Ou, & Prior, 2005). The total phenolic content in the samples was determined spectrophotometrically (UV-1601, model CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japan) in triplicate using gallic acid as a standard according to a modified method of Slinkard and Singleton (1977) with the Folin-Ciocalteu's reagent. An aliquot of 20 μL of sample was mixed with 1.58 mL of distilled water and oxidized with 100 μL of Folin-Ciocalteu reagent sample. The reaction was alkalinized with 300 μL of 20% sodium carbonate solution and incubated for 2 h at room temperature. The absorbance of the resulting blue colour was measured at 765 nm. Total phenolic content was expressed as mg gallic acid (GA) equivalent/mL of sample.

2.5.2. Quantification by HPLC

Reverse phase high performance liquid chromatography was performed to analyse phenolic compounds present in the aqueous green tea extract. The separation module consisted of an model SPE-MA10AVP HPLC-UV (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a C18 column (25 x 0.78 cm, 5 μ m, C18 Tracer Excel 120 ODS-A column, Teknokroma, Barcelona, Spain) and a UV-Vis detector (SPD-10V). The samples were eluted with a gradient system consisting of a solvent A (MilliQ water) and solvent B (acetonitrile) both containing 1% formic acid at a flow rate of 2.8 mL/min. The temperature of the column was maintained at 25 °C, and the injection volume was 20 μ L. The gradient system started at 95% solvent A and decreased to 75% A over 70 min, followed by a further decrease to 35% solvent A over 10 min. The final conditions were held for 10 min. The peaks of the phenolic compounds were monitored by absorbance at 210 nm and 350 nm.

The quantification was carried out using solutions of each standard at various concentrations. Individual compounds were quantified using a calibration curve of the corresponding standard compound. All analyses were performed in triplicate.

2.5.3. Antioxidant activity

2.5.3.1. FRAP

The ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay was carried out according to the method described by (Benzie & Strain, 1996) with some modification. The sample (60 μ l) was incubated (37 °C) with 60 μ l of MilliQ water and 900 μ l of FRAP reagent, containing 10 mM TPTZ (2, 4,6-tripyridyl-s-triazine) and 20 mM FeCl₃. Absorbance values were read at 595 nm after 30 min, using an UV-1601 spectrophotometer (Model CPS-240, Shimadzu, Japan). Results were expressed as μ mol Fe²⁺ equivalents/g of sample based on a standard curve of FeSO₄·7H₂O. All determinations were performed at least in triplicate.

2.5.3.2. ABTS

The ABTS radical [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] scavenging capacity was carried out according to the method of (Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, & Rice-Evans, 1999). The stock solution of ABTS (7 mM ABTS in potassium persulphate 2.45 mM,) was kept in the dark at room temperature for 16 h. An aliquot of stock solution was diluted with MilliQ water in order to prepare the working solution of ABTS radical with

absorbance at 734 nm of 0.70 ± 0.02 . A 20 μL aliquot of sample was mixed with 980 μL of ABTS reagent. The mixture was then left to stand in the dark at 30 °C for 10 min and absorbance values were read at 734 nm. Results were expressed as mg of Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g of sample based on a standard curve of L-ascorbic acid. All determinations were performed at least in triplicate.

2.6. Antimicrobial activity

2.6.1. Bacterial strains and growth conditions

The antimicrobial activity of the samples was determined by the disk diffusion method in agar against 26 microbial strains (including Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and molds) from the Spanish Type Culture Collection (CECT) as previously described by Gómez-Estaca et al. (2010). Briefly, spread plates of medium were inoculated with 100 μL of bacterial suspensions microorganism (10^5 - 10^6 CFU/mL) overnight grown. Filter paper disks (0.5 cm diameter), soaked with 40 μL of sample were put on the plate surface. After incubation the inhibition area (mm) was measured using specific software for digital image analysis (MIP 4 ADV, ver. 1. Consulting the Imagen Digital, S.L. & Microm España). Results were expressed as the percentage of inhibition with respect to the total plate surface. A minimum of three replicates disks were used for each sample.

2.7. Cumulative recovery of polyphenols and antioxidant activity during GI digestion

The cumulative amount of total polyphenols recovered from the samples at each time of the digestion (gastric + duodenal) was calculated and expressed as a % of the initial total phenolic content before digestion as following:

$$\% \text{ recovered each time of digestion} = (PR_D/PR_I) * 100$$

where PR_D = the total phenolic content (μg) after each step of digestion , PR_I = the initial phenolic content (μg) before digestion.

In the same way, the cumulative recovery of the major green tea polyphenols, ABTS and FRAP was calculated and expressed as % of the initial content of each corresponding phenolic compound, vitamin C equivalents and Fe^{2+} equivalents, respectively.

2.8. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the SPSS computer program (SPSS Statistical Software Inc., Chicago, IL, USA). One-way analysis of variance was carried out. Differences between pairs of means were assessed on the basis of confidence intervals using the Tukey-b test. The level of significance was $p \leq 0.05$. Pearson correlation among variables was performed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Cumulative recovery of total phenolics

Figure 1 shows the cumulative recovery of equivalents of gallic acid from the samples during the GI digestion. The initial content of total phenolics in the film was 187 mg gallic acid equivalents. This amount was considered as 100% of total phenolic compounds for calculation of the cumulative recovery during digestion. The first 24 min describe the gastric digestion in the DGM and the rest of the time (24-140 min) the duodenal digestion. A linear increase was observed in the recovery of the gallic acid equivalents from tea extract during the gastric digestion, independently of the presence of gelatin (T and TG). However in the case of film samples (FTG, FT) the recovery was faster at the beginning of the digestion and tended to decrease significantly as the gastric digestion proceeded, especially in the case of FTG. Furthermore, little or no additional release was observed during the intestinal digestion. The rate of equivalents of gallic acid recovered from the samples after GI digestion ranged from about 40 to 60%. It was observed that the percentage of polyphenols recovered was higher in the tea extract (T, TG) than in the film (FT, FTG). The presence of gelatin slightly favors the recovery of green tea polyphenols from tea (TG) ($p > 0.05$). On the other hand, the addition of gelatin during the digestion of the green tea film diminished the recovery of total phenolic from the films (FTG) by about 33% after 18 min. The presence of gelatin during digestion either sequesters some of the released phenolics or hinders the release of these compounds from the film.

3.2. Cumulative recovery of individual polyphenols

The recovery of the major polyphenols (catechins and gallic acid) and the most abundant glycosylated flavonols in green tea during the GI digestion is shown in Fig. 2 and 3, respectively. A significant decrease in flavan-3-ols, gallic acid, and flavonols was observed in all

the samples after the simulated digestion, except for catechin, which gave recoveries greater than 100%. Most of the release of polyphenols from tea extract or film, with or without gelatin (TG, T, FTG, FT), occurred in the gastric phase of digestion, whereas little or no increase was observed in the duodenal phase.

3.2.1. Catechins and gallic acid

In contrast with the pattern described for the recovery of total polyphenols during gastric digestion (Fig. 1), the recovery rates of gallic acid and catechins showed a random behavior, both in tea extract and film, independently of the presence of gelatin during the digestion.

The percentages of cumulative recovery of EGC after the GI digestion were significantly lower than those of EGCG in all the samples (Fig. 2a, b). The low recovery of EGC compared to EGCG may be due to a higher degradation, together with a lower release from the film. In the case of EGC, the major recovery was observed in TG samples, although the values did not reach 40% (Fig. 2a). The recovery of both EGC and EGCG was especially low in FT samples, with percentages of about 5% and 25% for EGC and EGCG, respectively.

In the case of gallic acid (Fig. 2c), the recovery from the film samples was significantly lower ($p \leq 0.05$), irrespectively of the presence of gelatin (30 and 20% for FTG and FT, respectively). A different behavior was shown in Figure 2d, since the infusions and the films showed a higher recovery of ECG when the simulated digestion was performed in the presence of gelatin (75-85% of recovery; $p \leq 0.05$), whereas no more than 40% was recovered in the absence of gelatin. Regarding EC (Fig. 2e), all the samples showed a similar trend, with 80-90% of recovery ($p > 0.05$).

The results show that the recovery of catechins and gallic acid almost stops after the simulated gastric digestion of both green tea extract and films when the samples are moved to simulated duodenal conditions. This may be due to a lack of further release from the matrix film or to a balance between release and transformation of the polyphenols that have been released. It is well known the instability of polyphenols at near neutral or alkaline pH. Stability studies have demonstrated that green tea catechins can undergo many chemical changes such as oxidation and epimerization in solutions with $pH > 6$ (Ananingsih, Sharma, & Zhou, 2011; Green, Murphy, Schulz, Watkins, & Ferruzzi, 2007; Neilson et al., 2007; Roginsky & Alegria, 2005). Tagliazucchi et al. (2010) observed a loss of bio-accessible total polyphenols, flavonoids and anthocyanins of grape during *in vitro* digestion, attributed to the transition from acidic gastric to the mild alkaline intestinal environment. The interaction of tea polyphenols with

digestive enzymes can also contribute to the losses observed in the recovery (He, Lv, & Yao, 2006). However, other authors claim that digestive enzymes are not involved in the decrease of polyphenols recoveries (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán, & García-Conesa, 2007; Green et al., 2007; Neilson et al., 2007).

Comparing each individual sample, the cumulative recovery of the ECG and EC (fig. 2d and 2e) was higher than the recovery of EGC and EGCG (fig. 2a and 2b). Thus, the recovery of EGC, EGCG, ECG and EC from the film (FT) was less than 5, 20, 40 and 80 %, respectively. This result is in accordance to the stability of polyphenols in different buffer conditions. Sang, Lee, Hou, Ho, and Yang (2005) observed that EGC and EGCG which presented a similar stability, were more instable than ECG and EC due to the oxidation of the trihydroxy structure on the B-ring.

In our study, the presence of gelatin seems to allow a significantly higher release of EGC and ECG (fig. 2a and 2d) from both tea extract and film samples ($p \leq 0.05$), as well as EGCG and gallic acid from the film sample ($p \leq 0.05$). It is well known the ability of polyphenols to interact with proteins. These interactions may be through covalent bonds (Chen, Wang, Zhang, Ren, & Zeng, 2011; Ishii, et al., 2008) or by hydrophobic and hydrogen bonds (von Staszewski et al., 2011). However, the interactions established between polyphenols and gelatin in this study seemed to be weak, allowing, therefore, an easy release of polyphenols. In this sense, it has been observed that when protein is highly aggregated (e.g. bovine gelatin), the ability to interact with polyphenols is lower than when protein is less aggregated (e.g. from marine origin), giving a higher release of phenolic compounds (Gómez-Estaca, Montero, Fernández-Martín, & Gómez-Guillén, 2009).

Another reason of the major recovery from samples with gelatin may be that EGC and EGCG form complexes with gelatin that protect them from degradation, although those complexes formed may be weak. This mechanism of protection of EGC and EGCG during digestion was also observed by Green et al. (2007) when green tea catechins were formulated with milk. Furthermore, Roginsky and Alegria (2005) found that the addition of milk to green tea extracts reduced the oxidation of polyphenols, since polyphenols bound to milk proteins are less accessible for oxidation. By the contrary, Argyri et al. (2005) observed a decrease in the concentration of the phenolic compounds in red wine after *in vitro* digestion with protein (meat and casein). All these discrepancies could be due to the different polyphenols affinity to different proteins.

Regarding catechin (Fig. 2 f), the percentages of recovery overcame the initial quantity (100-140%) in all the samples after digestion. Catechin has been described to derive from

other phenolic compounds: epimerization of EC and hydrolysis of ECG and its epimer catechin gallate (CG) (Ito et al., 2003). However, according to the percentages of recovery of EC and ECG obtained in this study (Figures 2d and 2e), this mechanism seems unlikely.

3.2.2. Flavonols

The recovery of flavonols after the simulated digestion ranged from 30 to >70%, depending on the individual compound and the sample (Figure 3a-e). Tavares et al. (2012) observed similar recoveries of quercetin derivatives to those observed in this study from blackberry extract after gastrointestinal digestion (40->80%), whereas the recoveries of flavonols after gastric and pancreatic digestion of chokeberry juice was higher (70-85%) (Bermúdez-Soto et al., 2007).

Rutin seemed to be the most stable flavonol at the experimental conditions, showing the highest percentage of recovery (45-75%; Fig. 3d), whereas quercetin 3-glucoside showed the lowest recoveries, especially in TG and FTG (around 30%, Fig. 3b). In general, gelatin had a negative effect in the recovery of all the determined flavonols, probably due to polyphenol-protein interactions. Thus, the flavonols showed significantly higher percentages of recovery from T and FT than from the corresponding samples with gelatin, TG and FTG, after gastrointestinal digestion ($p \leq 0.05$); with the exception of rutin which was recovered in similar percentages from T and TG samples ($p > 0.05$). Furthermore, whereas a linear increase was observed in the recovery of all the flavonols from T and TG during the gastric digestion, the recovery of flavonols from the film samples (FTG, FT) was faster at the beginning of the digestion and tended to decrease significantly as the gastric digestion proceeded, especially in the case of FTG.

As in the case of catechins, whereas flavonols are highly stable at *in vitro* gastric digestion, partial degradation has been reported under intestinal conditions due to neutral or slightly alkaline conditions (Bermúdez-Soto et al., 2007). Some losses may be also due to the transformation of flavonoid glycosides into aglycones during the simulated digestion. Tarko, Duda-Chodak, Sroka, Satora, and Michalik (2009) found that the polyphenols of selected fruits were hydrolyzed to aglycones during the simulated digestion process, especially quercetin and cyanogenic glycosides.

3.3. Cumulative recovery of antioxidant and antimicrobial activity

The cumulative recovery of compounds with reducing power and radical scavenging capacity during gastrointestinal digestion is illustrated in Figures 4 a (FRAP) and b (ABTS), respectively. The initial antioxidant capacity of the film, measured by FRAP and ABTS, was given by the antioxidant capacity of the total amount of green tea extract added to the film: 3.77 mmol Fe²⁺ equivalents and 319.5 mg vitamin C equivalents for FRAP and ABTS, respectively. These values were considered as 100% of FRAP and ABTS for calculation of the cumulative recovery during digestion.

The profiles of both Fe²⁺ and vitamin C equivalents recovered from the samples were in accordance with the total phenolic compounds recovered (Fig.1), with values which tended to be higher in T and TG than in FT and FTG. The antioxidant activity recovered from both extract and film after GI digestion was below 40%, higher in terms of FRAP (25-37.5%; Fig. 4a) than in ABTS (7-17%; Fig. 4b). This remarkable decrease in antioxidant properties of all the samples may be indicative of a low release of polyphenols from the matrix. The transformation (degradation, epimerization, hydrolysis and oxidation) during simulated digestion could affect their activity. It has been reported that EGCG, EGC, and ECG are extensively degraded at near-neutral pH conditions such as those occurring during intestinal digestion. B-ring homodimers and heterodimers have been described as auto-oxidation products formed from these catechins under simulated digestive conditions (Neilson et al., 2007; Neilson, Song, Sapper, Bomser, & Ferruzi, 2010). Some of these catechins B-ring dimers have been reported to show antioxidant activities equal or higher than the catechins precursors (Yoshino, Suzuki, Sasaki, Miyase, & Sano, 1999), which may contribute to the antioxidant activity recovered.

The interaction of polyphenols with proteins may involve a decrease in antioxidant potential. Arts et al. (2002) indicated that the antioxidant activity of some components of green tea is masked due to interactions with casein and albumin. In our work, the antioxidant properties of green tea extract (T) and green tea film (FT) were affected differently when gelatin was present during the digestion. In the case of the tea extract, the observed increment in catechins recovery when the gelatin was present during the digestion was accompanied by a higher recovery of antioxidant activity (fig. 4a, b). However, in the case of the film with gelatin, in spite of a major release of catechins, no increment of the antioxidant capacity was detected. In this connection, sometimes the interaction gelatin-polyphenol does not necessarily affect negatively their ability to act as an antioxidant. According to Almajano, Delgado, and Gordon (2006) the polyphenol-proteins complexes would still retain some

antioxidant activity when the hydroxyl groups on aromatic ring of the polyphenol molecule, responsible of antioxidant capacity, are not involved in the interaction.

As could be observed in Figure 2 (a-e), a higher recovery of catechins was obtained from the films when gelatin was present during the digestion (FTG). Furthermore, the polyphenols from FTG seem to be released at a faster rate at the beginning of the gastric digestion (Fig. 2, 3). Therefore, they could easily form complexes with the gelatin or even be more modified because they are exposed during a longer time in the digestion environment. These complexes can be reversible or irreversible with major or minor affinity, depending on flavonoid and protein concentration, pH, temperature, type of protein and polyphenol, etc. (Luck et al., 1994; Papadopoulou, Green, & Frazier, 2005; von Staszewski et al., 2011). Hence, the discrepancies between samples might be due to the wide number of factors that can influence the protein-complexes. Another factor to be taken into account is the addition of proteases (pepsin, trypsin and chymotrypsin) that hydrolyze the protein in peptides and amino acids which may bind to the polyphenols, resulting in less aggregated complexes than those formed with the non-hydrolysed protein.

The antimicrobial activity from both green tea extract and film was not observed after the simulated digestion process. Nevertheless, the green tea *Wu Lu Mountain* showed antimicrobial activity in previous studies performed in our laboratory, especially against *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens* (data non-shown). Factors referred to previously, as the low stability of polyphenols at intestine pH, together with the polyphenol-protein interactions, could explain the lack of antimicrobial activity of the phenolic compounds of tea.

At the end of the gastrointestinal digestion there remain some indigestible compounds, especially the polymeric matrix of agar and a certain amount of tea extract material retained in the film, evident by the color that the digested film retains. This colon-available indigestible residue represents the polyphenols potentially available after upper gastrointestinal digestion, which may exert some beneficial effect in the colon. Okello, McDougall, Kumar and Seal (2011) observed protective effects of colon-available extract of green tea against hydrogen peroxide and beta-amyloid induced cytotoxicity in PC12 cells used as a model of neuronal cells. According to these authors, this colon available green tea extract was depleted in flavan-3-ol and relatively enriched in certain flavonols, hydroxycinnamates, caffeine, theobromine and a range of unidentified phenolic components.

4. CONCLUSION

The results obtained in our study demonstrate that green tea polyphenols contained in the agar films are bioaccessible and, therefore, susceptible for absorption during human digestion. The antioxidant activity recovered from the agar-green tea films (FT) was 25% (reducing power) and 15% (radical scavenging ability), probably because not all the polyphenols were released from the polymer matrix and/or they were modified during the digestion process. Furthermore, the presence of gelatin during the digestion of green tea films (FTG) can affect both the bioaccessibility and efficacy of polyphenols. In general, green tea extract, with or without the presence of gelatin, showed a higher antioxidant activity. However, the green tea films can have other additional properties and applications, as an edible active packaging material in contact with foods, improving their quality, shelf-life and safety.

Acknowledgements

This study was carried out under the CYTED Agrobioenvase project (Action 309AC0382) and was sponsored by the National project (MICNN) AGL2008-00231/ALI, Xunta de Galicia (Program: Ángeles Alvariño) and CSIC (Program: JAE-CSIC).

References

- Almajano, M. P., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (2006). Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chemistry*, *101*(1), 126-130.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A., & Zhou, W. (2011). Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, in press.
- Argyri, K., Proestos, C., Komaitis, M., & Kapsokefalou, M. (2005). Phenolic compounds in red wine digested in vitro in the presence of iron and other dietary factors. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *56*(3), 213-222.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H. P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*(5), 1184-1187.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76.

- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, *102*(3), 865-874.
- Bolling, B. W., Chen, C. Y. O., & Blumberg, J. B. (2009). Tea and health: Preventive and therapeutic usefulness in the elderly? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *12*(1), 42-48.
- Chen, R., Wang, J. B., Zhang, X. Q., Ren, J., Zeng, C. M. (2011). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (ECGC) induced intermolecular cross-linking of membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *507*(2), 343-349.
- Gómez-Estaca, J., López De Lacey, A., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2009). Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *18*(1-2), 46-52.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, *27*(7), 889-896.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study. *Journal of Food Engineering*, *90*(4), 480-486.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, *21*(3), 334-350.
- Green, R. J., Murphy, A. S., Schulz, B., Watkins, B. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*(9), 1152-1162.
- He, Q., Lv, Y., & Yao, K. (2006). Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, *101*(3), 1178-1182.
- Hong, Y. H., Lim, G. O., & Song, K. B. (2009). Physical properties of Gelidium corneum-gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. *Journal of Food Science*, *74*(1), C6-C10.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.

- Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Nakayama, T., & Akagawa, M. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(10), 1384-1394.
- Ito, R., Yamamoto, A., Kodama, S., Kato, K., Yoshimura, Y., Matsunaga, A., & Nakazawa, H. (2003). A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chemistry*, 83(4), 563-568.
- Kim, K. M., Lee, B. Y., Kim, Y. T., Choi, S. G., Lee, J., Cho, S. Y., & Choi, W. S. (2006). Development of antimicrobial edible film incorporated with green tea extract. *Food Science and Biotechnology*, 15(3), 478-481.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37(2), 357-371.
- Mandalari, G., Faulks, R. M., Rich, G. T., Lo Turco, V., Picout, D. R., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Dugo, P., Dugo, G., Waldron, K. W., Ellis, P. R., & Wickham, M. S. J. (2008). Release of protein, lipid, and vitamin E from almond seeds during digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 3409-3416.
- Marciani, L., Wickham, M. S. J., Singh, G., Bush, D., Pick, D., Cox, E., Fillery-Travis, A., Faulks, R., Marsden, C., Gowland, P., & Spiller, R. (2007). Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystokinin release and gall bladder contraction. *American Journal of Physics*, 292, G1607-G1613.
- Marciani, L., Faulks, R., Wickham, M. S. J., Bush, D., Barbara, D., Wright, J., Cox, E., Fillery-Travis, A., Gowland, P., & Spiller, R., (2008). Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *British Journal of Nutrition*, 5, 1-10.
- Neilson, A. P., Hopf, A. S., Cooper, B. R., Pereira, M. A., Bomser, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8941-8949.
- Neilson, A. P., Song, B. J., Sapper, T. N., Bomser, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2010). Tea catechin auto-oxidation dimers are accumulated and retained by Caco-2 human intestinal cells. *Nutrition Research*, 30, 327-340.

- Okello, E. J., McDougall, C. G., Kumar, S., & Seal, C. J. (2011). In vitro protective effects of colon-available extract of *Camellia sinensis* (tea) against hydrogen peroxide and beta-amyloid (A $\beta_{(1-42)}$) induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. *Phytomedicine*, 18, 691-696.
- Papadopoulou, A., Green, R. J., & Frazier, R. A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 158-163.
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R. M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C., & Wickham, M. S. J. (2010). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology*, 27(8), 1121-1127.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, D. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Roginsky, V., & Alegria, A. E. (2005). Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4529-4535.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(10), 438-447.
- Sang, S., Lee, M. J., Hou, Z., Ho, C. T., & Yang, C. S. (2005). Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9478-9484.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 49-55.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.

- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P., & Michalik, J. (2009). Transformations of Phenolic Compounds in an in vitro Model Simulating the Human Alimentary Tract. *Food Technology and Biotechnology*, 47(4), 456-463.
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G. J., Leitao, M. C., Vieira, H. L. A., Stewart, D., Alves, P. M., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131, 1443-1452.
- von Staszewski, M., Pilosof, A. M. R., & Jagus, R. J. (2011). Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 125(1), 186-192.
- Weisburger, J. H., & Chung, F. L. (2002). Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), 1145-1154.
- Yoshino, K., Suzuki, M., Sasaki, K., Miyase, T., & Sano, M. (1999). Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 223-229.

Legends to Figures

- Figure 1.** Cumulative recovery of equivalents of gallic acid (%) from the samples during simulated *in vitro* digestion. FT, green tea film; FTG, green tea film + gelatin, T, green tea extract; TG, green tea extract + gelatin. n =2, three replicates.
- Figure 2.** Cumulative recovery of gallic acid and catechins (%) from the samples during simulated *in vitro* digestion. FT, green tea film; FTG, green tea film + gelatin, T, green tea extract; TG, green tea extract + gelatin. n =2, three replicates.
- Figure 3.** Cumulative recovery of flavonols (%) from the samples during simulated *in vitro* digestion. FT, green tea film; FTG, green tea film + gelatin, T, green tea extract; TG, green tea extract + gelatin. n =2, three replicates.
- Figure 4.** Cumulative recovery (%) of Fe²⁺ equivalents (FRAP) and vitamin C equivalents (ABTS) from the samples during under simulated *in vitro* digestion. FT, green tea film; FTG, green tea film + gelatin, T, green tea extract; TG, green tea extract + gelatin. n =2, three replicates.

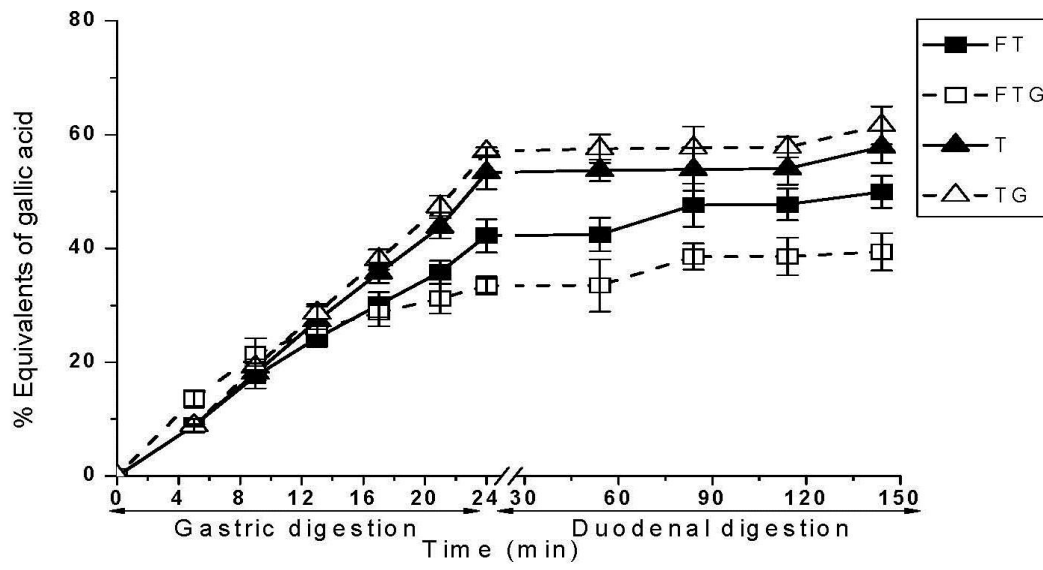


Figure 1.

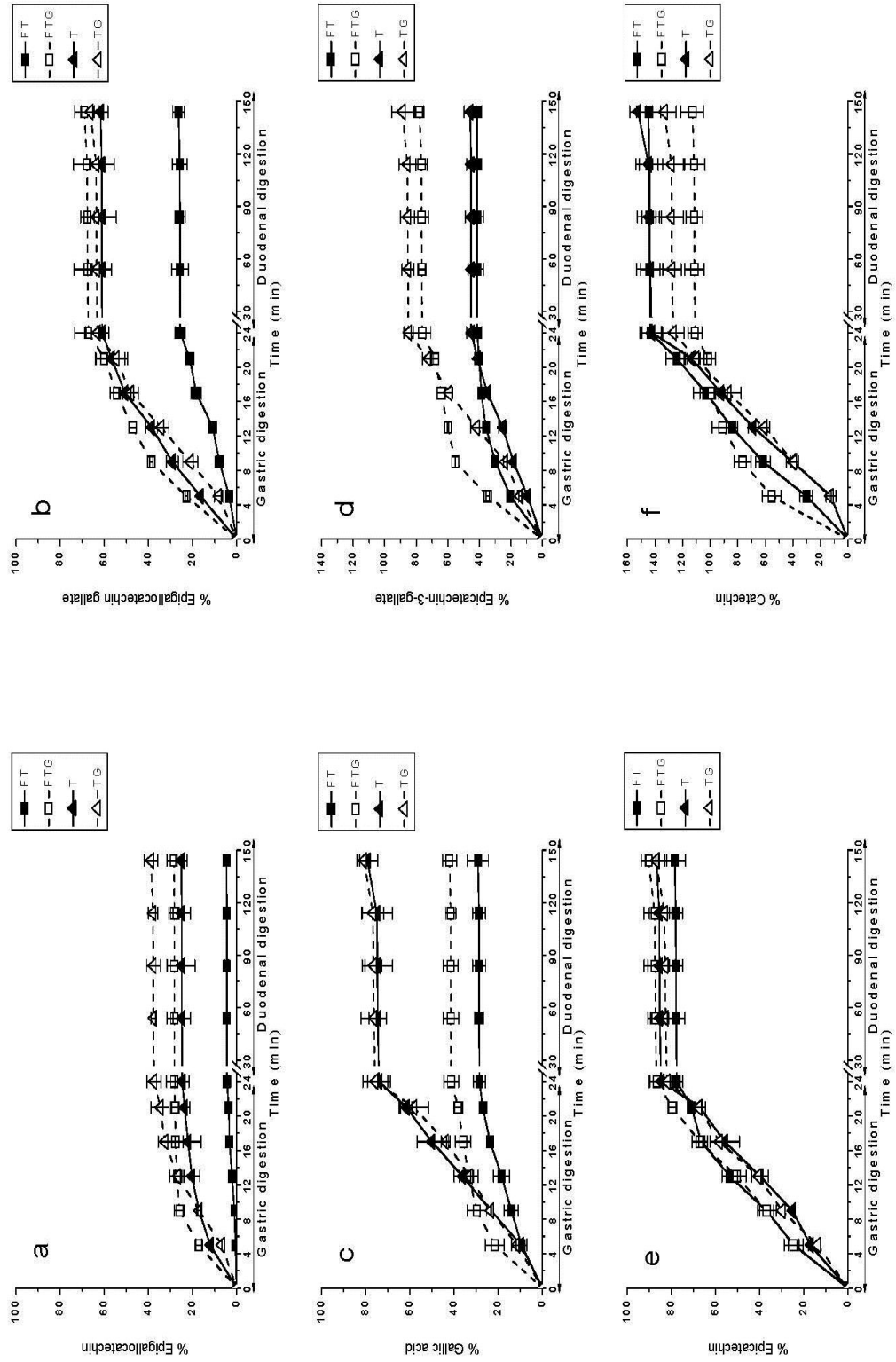


Figure 2.

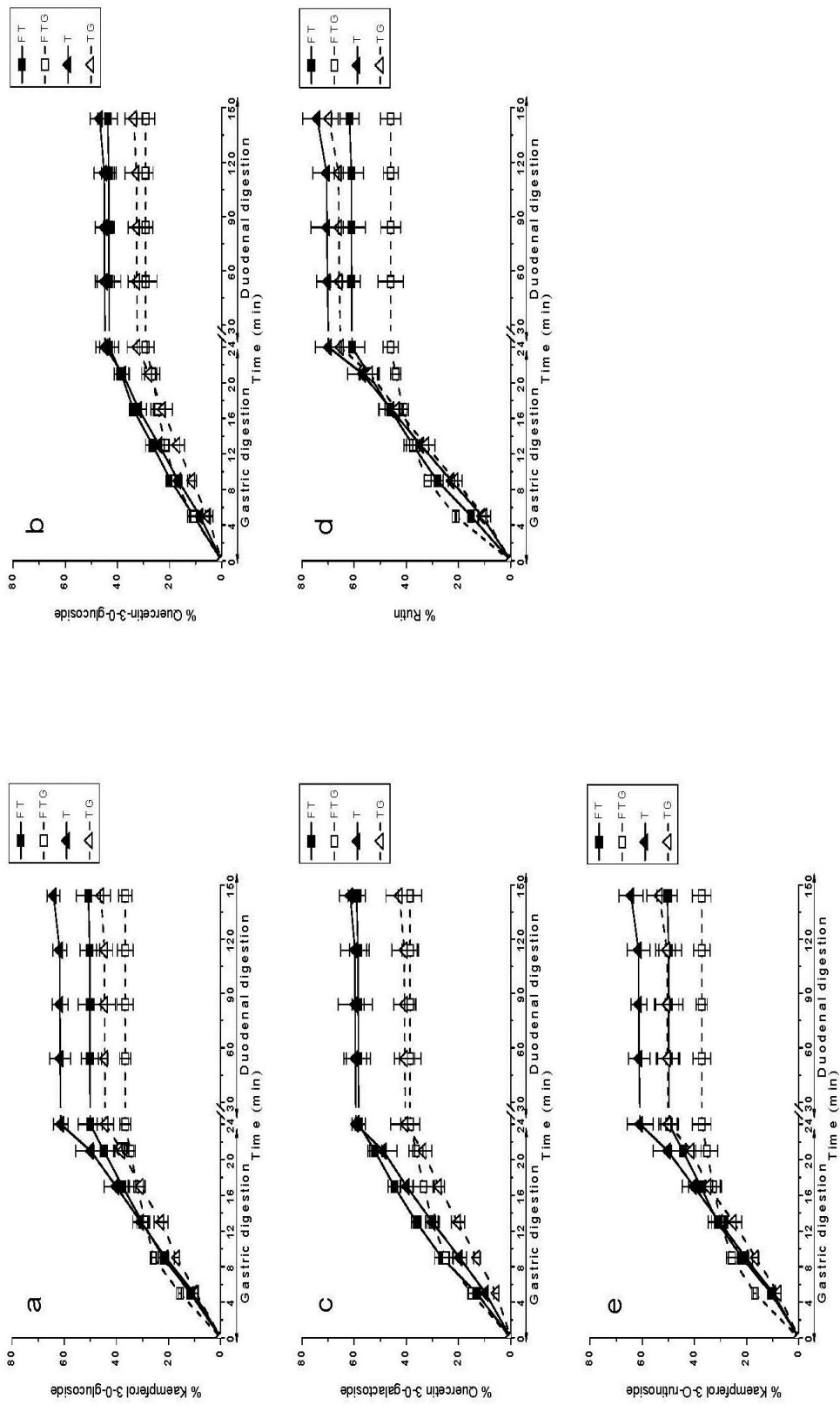


Figure 3

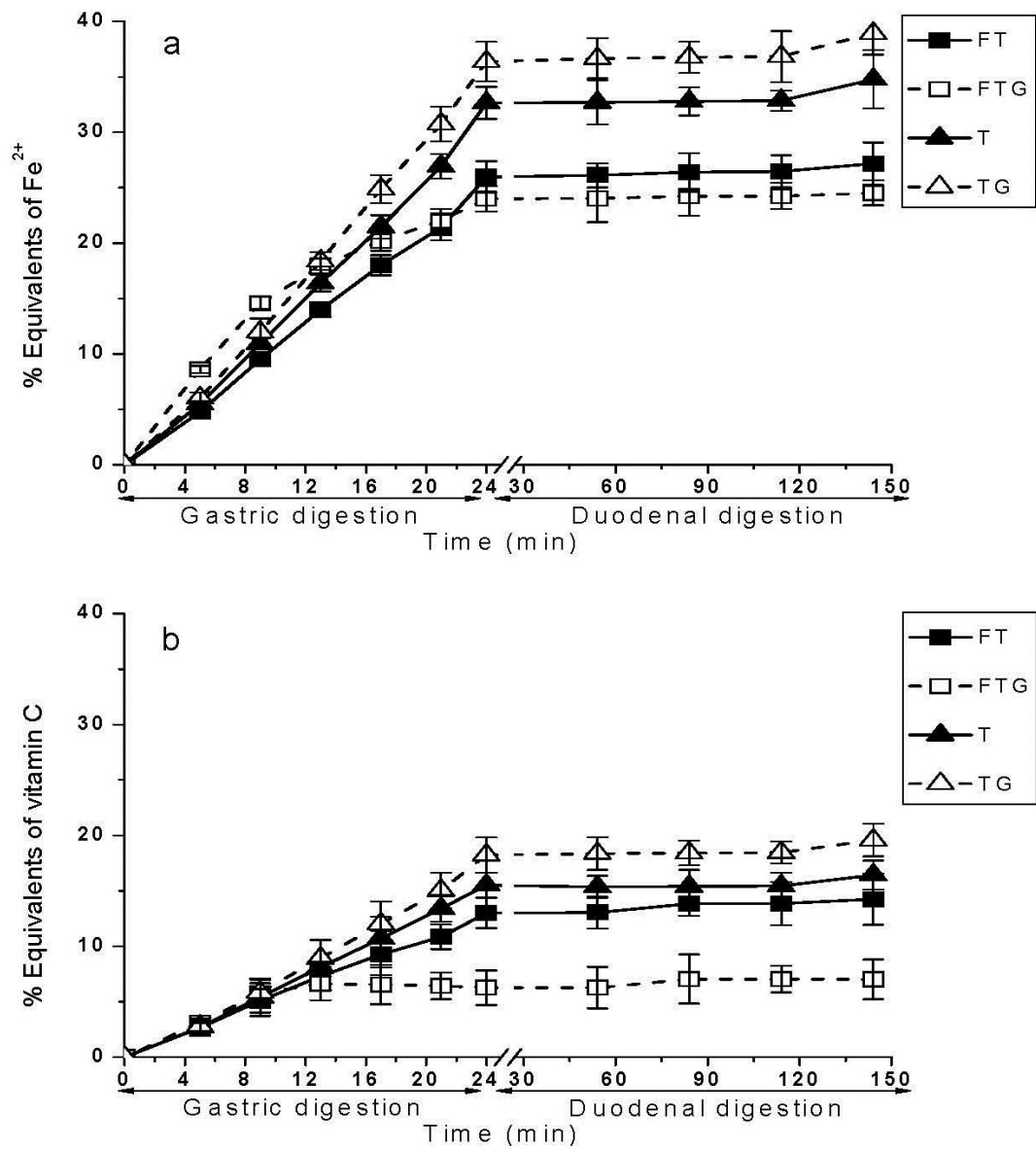


Figure 4.

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA

VI. DISCUSIÓN INTEGRADORA

1. DESARROLLO DE ENVASES COMESTIBLES CON ACEITES ESENCIALES Y APLICACIÓN EN PRODUCTOS PESQUEROS

1.1. Selección de aceites esenciales antimicrobianos para su incorporación a matrices complejas (gelatina-quitosano)

En la actualidad existe un gran interés por encontrar alternativas menos contaminantes para los envases plásticos convencionales que se utilizan principalmente en la industria alimentaria. Con este objetivo, en los últimos años se están desarrollando nuevos materiales biodegradables para el envasado de alimentos a partir de materiales naturales, tales como polisacáridos, lípidos y proteínas (Tharanathan, 2003), que en algunos casos se obtienen a partir de desechos de la pesca, agricultura o ganadería. A estos envases, con bajo impacto ambiental, se les puede añadir determinados compuestos que le confieran propiedades tales como antimicrobianas o antioxidantes. De este modo, estos envases biodegradables se pueden utilizar en el envasado de alimentos, prolongar la vida útil del producto, y reducir o inhibir microorganismos patógenos (Zivanovic y cols., 2005).

Estas propiedades resultan de gran interés en alimentos como el pescado. El pescado refrigerado es un alimento altamente perecedero debido al crecimiento microbiano (tanto de la flora endógena como de la adquirida por contaminación), lo que ocasionalmente origina pérdidas económicas o problemas de salud. Algunos aceites esenciales de origen vegetal presentan propiedades antimicrobianas frente a un amplio número de microorganismos (Burt, 2004; Deans y Ritchie, 1987; Dorman y Deans, 2000; Hammer, Carson y Riley, 1999), actividad que se debe a la propia composición de los aceites, que contienen principalmente compuestos fenólicos (carvacol, timol, eugenol, etc.) (Cosentino y cols., 1999).

Además de la incorporación de aceites esenciales, también se considera la incorporación del quitosano, polímero que presenta propiedades filmogénicas, antioxidantes y antimicrobianas (Jeon, Kamil y Shahidi, 2002; López-Caballero y cols., 2005). Existen en la literatura varios estudios sobre las propiedades antimicrobianas de películas que contienen quitosano y aceites esenciales (romero, orégano, clavo, etc.), con muy buenos resultados (Deans y Ritchie, 1987; Oussalah y cols., 2004; Seydim y Sarikus, 2006). También se han realizado estudios sobre la formulación de películas plásticas con aceite esencial de clavo

(López y cols., 2007). Sin embargo, en la literatura no se han encontrado estudios sobre la incorporación de aceite esencial del clavo en la matriz de gelatina o la aplicación de estas películas con aceite esencial de clavo sobre alimentos, lo que condujo a plantear el presente trabajo.

Por este motivo, el primer objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad antimicrobiana de 8 tipos de aceites esenciales frente a bacterias patógenas o responsables del deterioro de los alimentos, principalmente del pescado. Posteriormente se elaboraron películas biodegradables basadas en gelatina procedente de dos fuentes distintas (bovina y de pescado) solo o formando matrices complejas junto con el quitosano, a las que se incorporó aceite esencial de clavo (el aceite más activo), evaluando su actividad antimicrobiana frente a diversas cepas seleccionadas por su patogenicidad, por ser causantes del deterioro o por su efecto potencialmente probiótico.

Los aceites esenciales que presentaron mayor actividad antimicrobiana frente a las cepas seleccionadas fueron el clavo, lavanda, romero y tomillo; siendo el clavo el más activo. También se comprobó que de las 18 cepas estudiadas, las más sensibles fueron *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, mientras que las más resistentes fueron *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolítica* y *Listeria spp.* Esto se debe probablemente a que los lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias Gram-negativas impiden que los compuestos activos lleguen a la membrana citoplasmática (Ouattara, Simard, Holley, Piette y Bégin, 1997).

En la bibliografía se menciona que los aceites esenciales de clavo y romero presentan una marcada actividad antimicrobiana frente a *Brochothrix thermosphacta* y *Pseudomonas fluorescens* (Ouattara y cols., 1997) o frente a bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* o *Staphylococcus aureus* (Burt, 2004; Del Campo, Amiot y Nguyen-The, 2000). No obstante, no hay estudios del aceite esencial de clavo sobre *Shewanella putrefaciens*, un microorganismo de gran importancia en el deterioro del pescado (López-Caballero, Sánchez-Fernández y Moral, 2001). El presente trabajo revela que el clavo posee actividad antimicrobiana frente a este tipo de microorganismos.

Los aceites esenciales más activos en el análisis cualitativo (clavo, lavanda, romero y tomillo) se ensayaron frente a dos bacterias Gram-positivas (*Lactobacillus acidophilus* y *Listeria monocytogenes*) y cuatro Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium phosphoreum* y *Shewanella putrefaciens*) por el método de difusión en disco. El halo de inhibición medido por el método de análisis de imagen confirmó que la mayor área

de inhibición ($15,74 \pm 1,79\%$) correspondió al clavo ($p \leq 0.05$). Los microorganismos más sensibles al efecto de los aceites fueron *P. phosphoreum* ($10,61 \pm 0,3\%$) y *S. putrefaciens* ($15,74 \pm 1,79\%$), que son los principales responsables del deterioro del pescado (Gram y Huss, 1996; López-Caballero y cols., 2005), lo que resulta de gran interés por su uso potencial en la conservación del pescado. A modo de ejemplo en la Figura 1 se muestran los halos de inhibición producidos por los aceites esenciales a las 48 h de incubación de placas previamente inoculadas con *S. putrefaciens*. El clavo fue el aceite que causó una mayor inhibición del crecimiento de la cepa, después del romero.

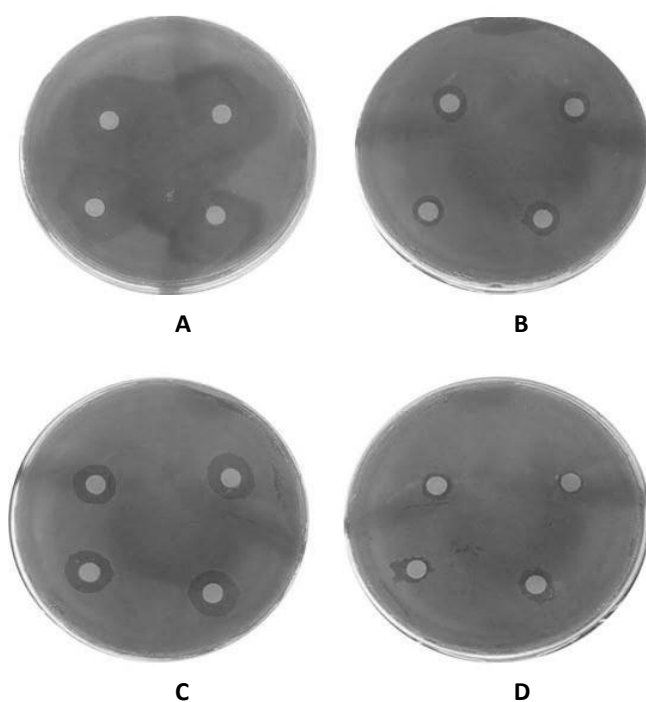


Figura 1. Halos de inhibición producidos por los aceite esenciales de clavo (A), lavanda (B), romero (C) y tomillo (D) en las placas inoculadas con *S. putrefaciens*.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el clavo para la elaboración de las películas con propiedades antimicrobianas. Las películas de gelatina procedentes de dos fuentes distintas (pescado y bovina) se formularon con aceite esencial de clavo y/o quitosano en su composición. En la Figura 2 se muestran las cuatro películas preparadas a base de gelatina bovina, donde se aprecian diferencias entre las películas en cuanto a su transparencia (ej. el fondo sólo se aprecia en las películas A y B) y su color (ej. más amarillas en las que contienen quitosano). Las películas de quitosano fueron aparentemente más rígidas y más opacas, y las películas constituidas a base de gelatina de pescado tuvieron un aspecto similar

(“Biodegradable gelatin-chitosan films with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation”).

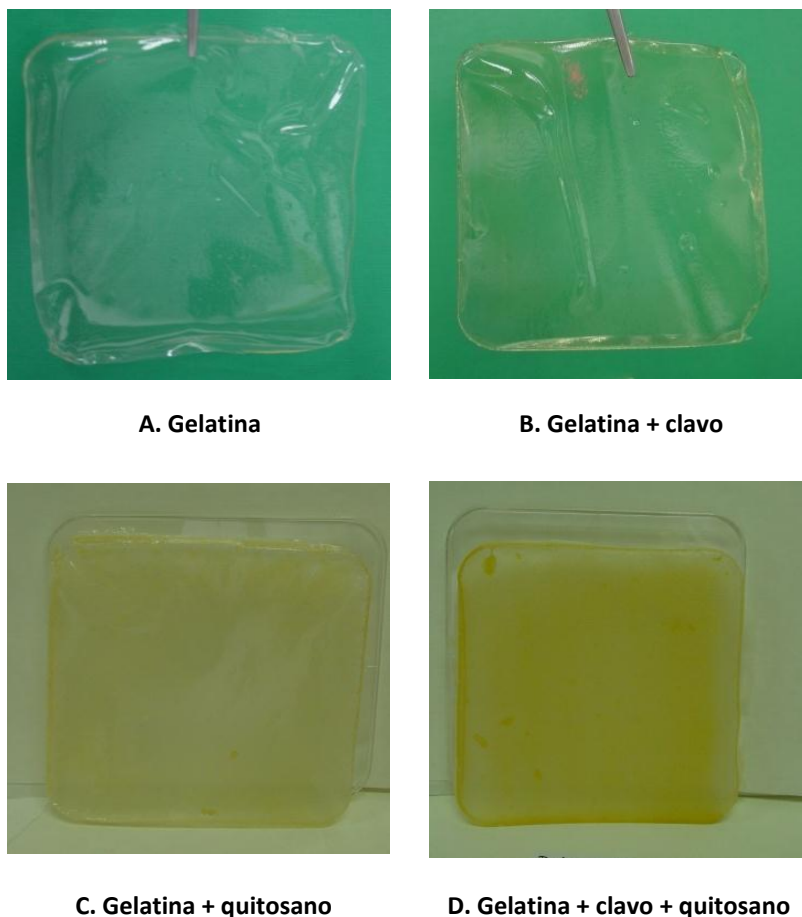


Figura 2. Películas preparadas a base de gelatina bovina (A), gelatina con clavo (B), gelatina con quitosano (C) y gelatina con clavo y quitosano (D).

Una vez elaboradas las películas se estudiaron sus propiedades antimicrobianas con el fin de comprobar si el clavo seguía manteniendo su actividad después de añadirse a las películas con o sin quitosano. Así se observó que las películas basadas en gelatina, tanto de pescado como bovina, y con/sin quitosano, no presentaron actividad antimicrobiana frente a las cepas seleccionadas. Sin embargo hay trabajos dónde sí se ha visto la efectividad de las películas y los recubrimientos basados en quitosano como tratamientos antimicrobianos (Chen y cols., 1998; Jeon y cols., 2002; López-Caballero y cols., 2005), si bien los resultados difieren en gran medida por las técnicas experimentales utilizadas. Las películas basadas en gelatina bovina y de pescado con clavo presentaron actividad frente a los cuatro microorganismos del estudio (*L. acidophilus*, *P. fluorescens*, *L. innocua* y *E. coli*), mientras que las películas sin clavo no

presentaron actividad. En la Figura 3 se representan los valores de actividad antimicrobiana de las películas compuestas con aceite esencial de clavo y/o quitosano.

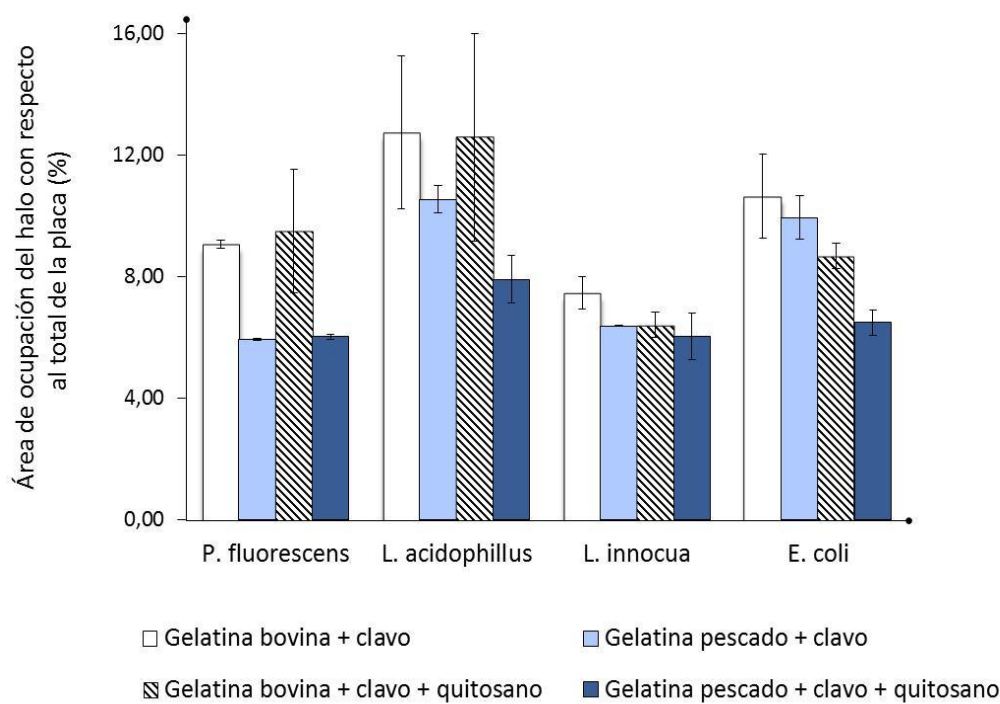


Figura 3. Actividad antimicrobiana de las películas con aceite esencial de clavo y/o quitosano frente a las cuatro cepas de estudio.

En la Figura 3 se observa que las películas constituidas a base de gelatina de pescado inhibieron el crecimiento microbiano en menor medida que las preparadas a partir de gelatina bovina. Estas diferencias en las propiedades antimicrobianas se deben probablemente a que el grado de interacción entre la gelatina, los polifenoles y/o el quitosano (Gómez-Estaca, Montero, Giménez y Gómez-Guillén, 2007) varía en función del origen de la proteína; dependiendo de esta interacción, se produce una menor o mayor liberación o disponibilidad de los compuestos activos. Por otro lado, los valores de actividad antimicrobiana de las películas basadas en gelatina de pescado y bovina variaron también en algunos casos en función de la matriz en la que estuviera incluido el aceite esencial de clavo (presencia o no de quitosano) (Figura 2). La película con quitosano y clavo presentó en algunos casos menor actividad que las películas que no contienen quitosano, especialmente en las de gelatina de origen marino. Este hecho se atribuye a la diferente solubilidad que presentan las películas, dependiendo de la matriz. En este sentido, cuando la película se coloca sobre la superficie del

alimento, la liberación de los compuestos antimicrobianos contenidos en ella viene determinada, en gran parte, por su solubilidad (Papadokostaki, Amarantos y Petropoulos, 1998). Así, la película de gelatina bovina presentó una baja solubilidad ($26,2 \pm 1,5\%$), semejante al estudio de Bertan, Tanada-Palmu, Siani y Grosso (2005) en películas de gelatina bovina. La película de gelatina-quitosano presentó una solubilidad parecida a la película anterior. Cuando el aceite esencial de clavo se incorporó en las películas de gelatina hubo un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en la solubilidad ($41,1 \pm 1,5\%$). Este hecho se puede atribuir a las interacciones entre el polifenol y la proteína mediante enlaces iónicos o puentes de hidrógeno (Taravel y Domard, 1995), que desestabilizan la red proteica, produciendo una disminución en la solubilidad de las películas preparadas a partir de estos dos compuestos. Sin embargo, la solubilidad se mantuvo cuando el aceite esencial se incorporó a la matriz gelatina-quitosano ($29,5 \pm 3,2\%$), probablemente por las interacciones entre la gelatina y el quitosano, que estabilizan la estructura de la película a pesar de la presencia del aceite esencial de clavo. Este hecho implica una menor liberación de antimicrobianos y, por otro lado, una mayor integridad de la película cuando ésta se aplica al pescado.

1.2. Aplicación de envases en la conservación de pescado refrigerado: salmón (*Salmo salar*) y bacalao (*Gadus morhua*)

Las películas basadas en gelatina de pescado a las que se añadió quitosano-clavo se aplicaron a salmón loncheado crudo refrigerado a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de estudiar su papel en la conservación del pescado. Así se observó que los recuentos de microorganismos totales en el pescado sin película se incrementaron rápidamente a lo largo de todo el periodo de conservación, mientras que en el pescado recubierto con la película se mantuvieron por debajo, y sólo a partir del día 9 se percibió un ligero aumento en estos valores. Al final de la conservación los recuentos en el pescado cubierto con la película fueron 2 unidades logarítmicas menos que los del control. La vida útil del salmón loncheado cubierto con estas películas se prolongó por lo menos hasta los 11 días. Al igual que en este estudio, en otros trabajos se ha visto que otras películas basadas en quitosano u otros aceites esenciales también presentaron buenas propiedades antimicrobianas en carne (Oussalah y cols., 2004), mortadela (Zivanovic y cols., 2005) o sardina ahumada (Gómez-Estaca y cols., 2007).

Dado que los resultados fueron satisfactorios, se planteó realizar un nuevo estudio, profundizando más exhaustivamente en los índices del deterioro y en los microorganismos causantes del mismo, evaluando el posible retraso en presencia de las películas con clavo. Para ello se escogieron matrices complejas de gelatina-quitosano; y en este caso la gelatina

seleccionada fue la de bovino para favorecer la interacción entre gelatina y quitosano, dejando más libres los polifenoles (Gómez-Estaca, Bravo, Gómez-Guillén, Alemán y Montero, 2009; Gómez-Estaca, López de Lacey, Gómez-Guillén, López-Caballero y Montero, 2009; Gómez-Estaca y cols., 2007). El pescado seleccionado para la conservación fue el bacalao por su suave color y sabor, de manera que cualquier modificación fuera fácilmente perceptible. La aplicación de las películas basadas en gelatina bovina con aceite esencial de clavo para mejorar la conservación del bacalao, también dió resultados prometedores y prolongó la vida útil.

En el análisis microbiológico de este estudio con bacalao se apreció una disminución e incluso una inhibición de los microorganismos estudiados en el bacalao recubierto con la película gelatina-quitosano-clavo ($p \leq 0.05$). En este caso se detectó una inhibición en el crecimiento de las bacterias productoras de H_2S y de las enterobacterias a los 3 y 9 días, respectivamente. También se observó una disminución en los recuentos de totales y *Pseudomonas*, y un descenso más moderado en las bacterias lácticas. Estos resultados estuvieron en consonancia con los índices bioquímicos del deterioro.

Inicialmente el pH del bacalao sin película fue de 6,7 y fue subiendo hasta un 7,3-7,4 durante los primeros días, manteniéndose así hasta el final de la conservación (11 días). Por otro lado, el pH del bacalao envuelto con la película permaneció por debajo de 7 ($p \leq 0.05$). El valor inicial del N-BVT fue de 13,5 mg N-BVT/100 g de músculo, valor que se incrementa a lo largo de la conservación (hasta alcanzar 35 mg N-BVT/100 g a los 4-5 días de conservación). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por (López-Caballero y cols., 2005) y (Olafsdottir, Lauzon, Martinsdóttir, Oehlenschläger y Kristbergsson, 2006). En los dos lotes de pescado (bacalao y bacalao con película) se observó un incremento progresivo a lo largo de la conservación, si bien los valores fueron inferiores ($p \leq 0.05$) en el bacalao con la película. Por lo tanto, la aplicación de las películas con gelatina-quitosano-clavo es útil para alargar la vida útil del pescado.

2. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE TÉ VERDE (*Camellia sinensis* L.) EN RELACIÓN A SU FUNCIONALIDAD Y DESARROLLO DE ENVASES COMESTIBLES

2.1. Selección de un extracto de té verde (*Camellia sinensis*) según sus propiedades biológicas entre distintas variedades en base a su composición química

Tal y como se ha visto en el apartado anterior, la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales es evidente; no obstante, es importante destacar que su aroma es muy intenso y su aplicación al alimento, incluso formando parte de un envase, en ocasiones origina características sensoriales indeseables.

En este sentido, la utilización de extractos acuosos de plantas (hojas, semillas, tallos, etc.) resulta más conveniente por presentar sabores y olores menos agresivos, siendo más fáciles y versátiles de aplicar, sin repercutir negativamente en las características sensoriales del alimento.

La mayoría de los extractos presentan propiedades antioxidantes manifiestas, tanto del extracto libre, como cuando se encuentran formando parte de la película, si bien es relativamente frecuente que las propiedades antioxidantes de las películas sean inferiores a la del extracto libre. Este hecho se atribuye a la interacción de los componentes antioxidantes del extracto con la matriz biopolimérica, ya que si la interacción es muy fuerte puede disminuir drásticamente la actividad.

Sin embargo, son menos numerosos los extractos que presentan propiedades antimicrobianas frente a un gran número de microorganismos, ya sean patógenos o del deterioro de alimentos, y este número disminuye teniendo en cuenta que en determinadas matrices continúan manifestando su actividad. Este hecho condujo a la búsqueda de extractos que por su coloración, aroma y sabor influyeran lo menos posible en las características sensoriales del alimento a utilizar, y a elaborar un extracto acuoso que manifestara tanto propiedades antioxidantes como antimicrobianas.

El extracto seleccionado fue el té verde (*Camellia sinensis*). El té verde es quizá una de las infusiones con más efectos beneficiosos que se conocen, y están ampliamente descritos (Cabrera, Artacho y Giménez, 2006). Sus efectos beneficiosos se atribuyen, principalmente, a la presencia de polifenoles, pigmentos, aminoácidos, carbohidratos, minerales y alcaloides presentes (Bolling y cols., 2009; Isigaki, Takakuwa, Takeo, 1991; Weisburger y Chung, 2002).

Aunque los extractos pueden ser muy diversos, la gran mayoría de los estudios de té se refieren a infusiones, es decir, a extractos acuosos en agua caliente (Lin, Chen y Harnly, 2008), apreciándose que en esas condiciones mantiene sus propiedades biológicas (Cabrera, Artacho y Giménez, 2006; Dufresne y Farnworth, 2001; Friedman, 2007; Hamilton-Miller, 1995).

A pesar de los muchos trabajos realizados sobre las propiedades que confieren diferentes extractos de té, apenas hay estudios que evalúen las diferencias y composición de extractos de té verde y su relación con las propiedades biológicas que manifiestan. En los pocos estudios publicados al respecto se presentan extractos realizados de diferente manera, por lo que su comparación es muy difícil. Por ello, se estudiaron 6 variedades de extractos de té realizados en las mismas condiciones y, de este modo, poder evaluar la relación que pudiera existir entre la composición y sus propiedades bioactivas. Los extractos de las diferentes variedades de té verde (*Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi*, *Canela Té Verde*, *Lung Ching*, *China White Hair* y *Wu Lu Mountain*) presentaron distinta composición. Como se refirió anteriormente ("*Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (Camellia sinensis L.) as an expression of its chemical composition*") no siempre es el mismo extracto el que muestra mayores cantidades de uno de los componentes, y hay grandes diferencias entre los valores, incluso del doble en algunas ocasiones. Así, el extracto de té *Canela Té Verde* es el que contiene más polifenoles totales (9770 mg/L equivalentes de ácido gálico) y flavonoles (236.6 mg/L), mientras que el de mayor contenido en catequinas fue el extracto de *Wu Lu Mountain* (11268.1 mg/L). Por el contrario, los valores más bajos, tanto de contenido en fenoles totales (4712 mg/L equivalentes de ácido gálico), como de catequinas (5361.4 mg/L), correspondió al extracto de *China White Hair*. El menor contenido en flavonoles totales se obtuvo en la variedad *Lung Ching tea* (84.7 mg/L).

Los 6 tipos de té verde se caracterizan por tener un alto contenido en catequinas, siendo la más abundante la epigalocatequina-3-galato (EGCG). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en varios extractos de té, en los cuales la EGCG aparece como una de las catequinas mayoritarias (Graham, 1992; Lin y cols., 2008), mientras que en otros tipos de té, como el té negro presentaron un contenido menor. En el estudio de composición realizado por Reto, Figueira, Filipe y Almeida (2007) en 9 variedades distintas de té verde, también es la EGCG una de las catequinas más abundantes.

El contenido de carbohidratos totales varió desde 1.75 mg/mL para *Japan Gyokuro Asahi* a 5.32 mg/L para *Lung Ching* ($p \leq 0.05$). No se ha encontrado información acerca del contenido de azúcares en extractos de té verde, por lo que la comparación con otros trabajos resulta difícil.

En cuanto al contenido en minerales, el potasio (K) fue el más abundante en todos los extractos, seguido de magnesio (Mg) y manganeso (Mn), mientras que el resto están en menor concentración, o incluso en forma de trazas como es el caso del cobre (Cu) y el hierro (Fe). Estos resultados coinciden con otros trabajos realizados en infusiones de té verde, donde el K fue el mineral mayoritario (Fernández, Pablos, Martín y González, 2002; Gallaher, Gallaher, Marshall y Marshall, 2006; Musa Özcan, Ünver, Uçar y Arslan, 2008; Reto y cols., 2007). Sin embargo, Fernández-Cáceres, Martín, Pablos y González (2001) encontraron que los minerales mayoritarios, tanto en té verde como en té negro, fueron calcio (Ca), magnesio (Mg) y aluminio (Al), pero con variaciones, dependiendo de la localización geográfica del té verde.

El perfil de aminoácidos presente en las seis variedades de té verde fue semejante, y los aminoácidos más abundantes fueron el ácido glutámico (Glu), el ácido aspártico (Asp), serina (Ser) y arginina (Arg). El contenido en aminoácidos totales se indica en orden decreciente para *Wu Lu Mountain, Canela Té Verde, Japan Gyokuro Asahi, Lung Ching, Japan Sencha Makinohara* and *China White Hair*. El predominio de un aminoácido en concreto varía de un estudio a otro, lo que se atribuye a las diferencias entre variedades de té y tipos de extractos. (Wang y Ruan, 2009) analizaron la composición en aminoácidos de varias infusiones de té verde (variedad Longjing) y encontraron que la teanina fue el aminoácido más abundante, seguido del ácido glutámico (Glu), prolina (Pro), aspártico (Asp), serina (Ser), arginina (Arg) e histidina (His), lo que coincide con los resultados de la presente memoria. De acuerdo con Wang y cols. (2010), los aminoácidos permiten diferenciar entre distintos tipos de tés, como por ejemplo, entre el té verde, negro u Oolong o incluso valorar la calidad de un determinado tipo de té. Estos mismos autores encontraron que el té verde posee mayor contenido de Asp, Glu y Ser, que el té negro y el Oolong. La composición en aminoácidos también se ha determinado en extractos acuosos de té verde, Oolong, negro y Pu-erh, y la mayoría de los tés verdes presentaron como aminoácidos mayoritarios la teanina, serina y valina (Syu, Lin, Huang y Lin, 2008), mientras que la teanina, ácido glutámico y aspártico fueron los aminoácidos más abundantes en todos los tés estudiados (Alcázar y cols., 2007).

El porcentaje de cada uno de los componentes estudiados, con respecto al contenido total (resultado de sumar las concentraciones obtenidas de cada uno de ellos), se muestra en la Tabla 1. Estos resultados permiten ver el peso que tienen los diferentes componentes en un mismo extracto de té. Como se observa en la tabla, los extractos de té tienen un patrón similar en cuanto a su composición relativa, ya que el mayor porcentaje está en los aminoácidos (44.65-53.78%) y en las catequinas (28.43-33.64%), seguido de los carbohidratos (7.44-21.03%), minerales (2.92-6.01%) y flavonoles (0.33-0.88%). Resulta difícil comprar estos

resultados con los de otros trabajos ya que no se han encontrado estudios que evalúen la composición de varios componentes a la vez y en un mismo extracto acuoso de té, ya que la mayor parte de los trabajos se centran en estudiar un solo componente (polifenoles, aminoácidos, minerales, etc.).

Tabla 1. Composición de los componentes mayoritarios de los extractos de té verde expresado en porcentaje (%)

Tipo	Catequinas totales	Flavonoles totales	Carbohidratos totales	Minerales totales	Aminoácidos totales
1. <i>Japan Sencha Makinohara</i>	29.14 ± 0.23	0.87 ± 0.01	17.99 ± 0.30	5.21 ± 0.03	46.79 ± 0.41
2. <i>Japan Gyokuro Asahi</i>	33.64 ± 0.53	0.77 ± 0.02	7.44 ± 0.26	5.27 ± 0.06	52.88 ± 0.55
3. <i>Canela Té Verde</i>	29.34 ± 0.15	0.81 ± 0.02	14.86 ± 0.07	3.44 ± 0.00	51.56 ± 0.21
4. <i>Lung Ching</i>	29.45 ± 0.67	0.33 ± 0.00	21.03 ± 0.40	4.53 ± 0.06	44.65 ± 0.72
5. <i>China White Hair</i>	28.43 ± 0.82	0.88 ± 0.00	13.81 ± 0.43	6.01 ± 0.04	50.87 ± 0.38
6. <i>Wu Lu Mountain</i>	33.30 ± 0.30	0.49 ± 0.00	9.51 ± 0.32	2.92 ± 0.03	53.78 ± 0.44

La actividad antioxidante fue distinta entre las variedades estudiadas. *Wu Lu Mountain* mostró la actividad más alta (FRAP 188.48 mmol/L Fe²⁺, ABTS 15.98 mg/mL equivalentes de vitamina C) y *China White Hair* la más baja (FRAP 88.37 mmol/L Fe²⁺, ABTS 7.20 mg/mL equivalentes de vitamina C y PCL 3.93 mg/mL equivalentes de vitamina C). Sin embargo, el *Canela Té Verde* obtuvo la actividad antioxidante determinada por Photochem (19.0 mg/mL equivalentes de vitamina C) más alta. A la vista de estos resultados, el grado de actividad antioxidante muestra una correlación alta con el contenido total en polifenoles determinado por el método de *Folin-Ciocalteu*, ($r_{FRAP/tpc} = 0,983$, $r_{ABTS/tpc} = 0,926$, $r_{PCL/tpc} = 0,926$). Hay que tener en cuenta que los tres métodos son ensayos de transferencia de electrón y miden el poder reductor de las muestras (Huang, Ou y Prior, 2005). Toschi y cols. (2000) observaron que la actividad antioxidante de los tés verdes (en un sistema modelo lipídico), es más alta en los tés con mayor cantidad de EGCG y EGC. En el presente trabajo, el extracto de té verde que más actividad mostró (*Wu Lu Mountain*) es el que tiene mayor contenido en EGCG y EGC. En estudios anteriores ya se ha estimado la relación que existe entre la composición relativa de los distintos polifenoles del té verde y la actividad antioxidante (Rice-Evans y cols., 1996),

indicando que la contribución de las catequinas a la actividad antioxidante del té verde sigue el siguiente orden: EGCG> EGC>>ECG=EC>C. La capacidad secuestradora de la EGCG y la ECG es más fuerte que en las otras catequinas, como la EGC, GC, EC y C, a pesar de que estas últimas tengan un menor impedimento estérico, por lo que se demuestra que la presencia del grupo galato juega un papel importante en la capacidad secuestradora de radicales libres (Guo y cols., 1999).

La capacidad antimicrobiana de los distintos extractos fue asimismo diferente. Las cepas más sensibles fueron *Photobacterium phosphoreum* y *Shewanella putrefaciens* para todos los extractos. Por el contrario, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas fluorescens* se mostraron menos sensibles frente a los extractos de té *Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi* y *Canela Té Verde*. Estos resultados demuestran que las infusiones de té verde son activas frente a organismos específicos del deterioro del pescado (López-Caballero y cols., 2005), lo que hace de estos extractos buenos candidatos para su utilización como antimicrobianos en productos pesqueros. Asimismo, este hecho tiene una gran relevancia dado que la actividad antimicrobiana de los tés se ha demostrado frente a un gran número de cepas, (Friedman, 2007; Singh Arora, Jeet Kaur y Kaur, 2009), pero no frente a *P. phosphoreum* y *S. putrefaciens*. La actividad antimicrobiana se ha asociado al contenido alto en polifenoles, especialmente catequinas de los tés verdes (Arakawa y cols., 2004; Cushnie y Lamb, 2011). En la revisión realizada por Friedman (2007) se menciona que los flavonoides del té son activos frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, como por ejemplo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* o *Escherichia coli*. En este trabajo solo fueron sensibles al extracto las bacterias Gram negativas. Este resultado se explica por el hecho de que cepas diferentes de un mismo microorganismo pueden expresar distinto grado de sensibilidad a los flavonoides del té (Hamilton-Miller, 1995).

Ninguno de los extractos de té mostró actividad antimicrobiana frente a las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* estudiadas. Este dato resulta muy interesante puesto que muchos extractos ricos en polifenoles, como el extracto de té verde, presentan actividad antimicrobiana frente a un amplio número de microorganismos, incluidos aquellos que son beneficiosos para el intestino. Almajano y cols. (2008) constataron este mismo hecho cuando probó la actividad antimicrobiana de varias infusiones de té verde frente a *Lactobacillus acidophilus*, la cual mostró una excepcional resistencia frente a los extractos acuosos de té investigados.

Japan Sencha Makinohara fue uno de los extractos más activos en cuanto a sus propiedades antimicrobianas y el té *Wu Lu Mountain* el que menos, a pesar del alto contenido

en catequinas y actividad antioxidante. La diferente actividad entre los extractos de té probablemente se deba a la propia composición química de cada variedad puesto que todos los extractos se prepararon del mismo modo.

A la vista de estos resultados, es difícil extraer conclusiones de cual es el mejor extracto como antioxidante o antimicrobiano. Es posible que determinados componentes de los extractos tengan alguna actividad sobre otros, que puede incidir en las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que manifiestan.

Con el objeto de comparar la actividad de las seis variedades de té (en términos de composición y actividad biológica) y establecer las diferencias entre ellas, se realizó un análisis por componentes principales (CP). Dado el gran número de variables y para evitar que se solaparan en la representación de los nuevos componentes, las variables se agruparon de acuerdo a tres combinaciones: flavonoides (Figura 4), aminoácidos (Figura 5) y minerales (Figura 6), manteniéndose el resto constante (los té se superponen en las Figuras para mejor comprensión).

El análisis multivariante con flavonoides (incluye todas las variables excepto aminoácidos y minerales) mostró que los nuevos componentes explican el 38.4% y 30.9% de la varianza, respectivamente (Figura 4)¹. Las catequinas totales, ECG y EGCG se agrupan en el primer componente, mientras que el peso de C, EC y EGC se distribuye entre el primer y segundo componente. Los flavonoles se reúnen en la segunda dimensión, a excepción del hiperósido que se sitúa en la primera. Los microorganismos que distribuyen su peso en ambas dimensiones se correlacionan negativamente con los anteriores a excepción de *P. fluorescens*, con mayor peso en el CP1. Las medidas de la actividad antioxidante se sitúan juntas y mantienen una fuerte relación con las catequinas totales, pero no con los flavonoles.

Los extractos de té se diferencian claramente con la distribución de variables (por ej. flavonoles y catequinas) de acuerdo a las dos nuevas dimensiones (Figura 4). El té 3 (*Canela Té Verde*) se asocia con un alto contenido de flavonoles, el té 5 (*China White Hair*) fue el más activo frente a *P. fluorescens*, el té 2 (*Japan Gyokuro Asahi*) lo fue frente a los microorganismos

¹ Los números dentro del recuadro indican el tipo de extracto y se corresponden con la numeración marcada en la tabla D1.

cercanos a él en la representación gráfica (ej. *V. parahaemolyticus*) y el té 6 (*Wu Lu Mountain*) se caracterizó por un alto contenido en EGCG y catequinas totales.

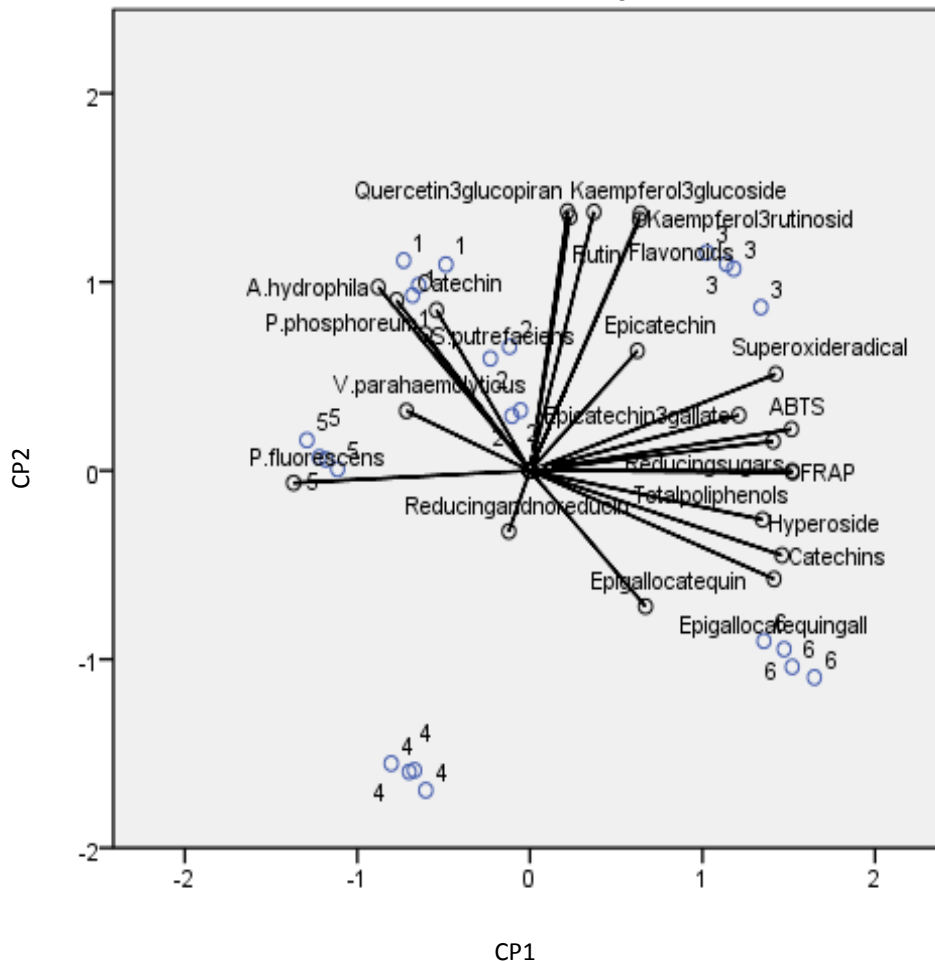


Figura 4. Análisis de los componentes principales. Grupo de análisis multivariante (con flavonoides) sin tener en cuenta los aminoácidos y minerales.

La Figura 5 representa los CP de las variables estudiadas a excepción de los flavonoides individuales y minerales. Los dos primeros componentes explican el 77.2% y 9.5% de la varianza, respectivamente. La mayoría de los aminoácidos se agrupan en el primer componente, presentando alta correlación y positiva con las catequinas totales y negativa con los microorganismos. Los flavonoles tienen mayor peso en el CP2, que también se correlacionan con microorganismos como *S. putrefaciens*. Las actividades antioxidantes se correlacionan de forma positiva en ambos componentes, con mayor peso en el CP1.

La representación de las variables indica de nuevo que existen diferencias entre distintos té verdes en cuanto a su composición y actividad biológica. El té 3 (*Canela té Verde*) y el té 6

(*Wu Lu Mountain*) obtuvieron altos niveles de aminoácidos y polifenoles (tanto de catequinas totales como de flavonoles) y alta capacidad antioxidante (Figura 5). Estos datos sugieren que la actividad antioxidante no disminuye por la presencia de aminoácidos, o bien que no existe una interacción entre ambos (aminoácidos y polifenoles).

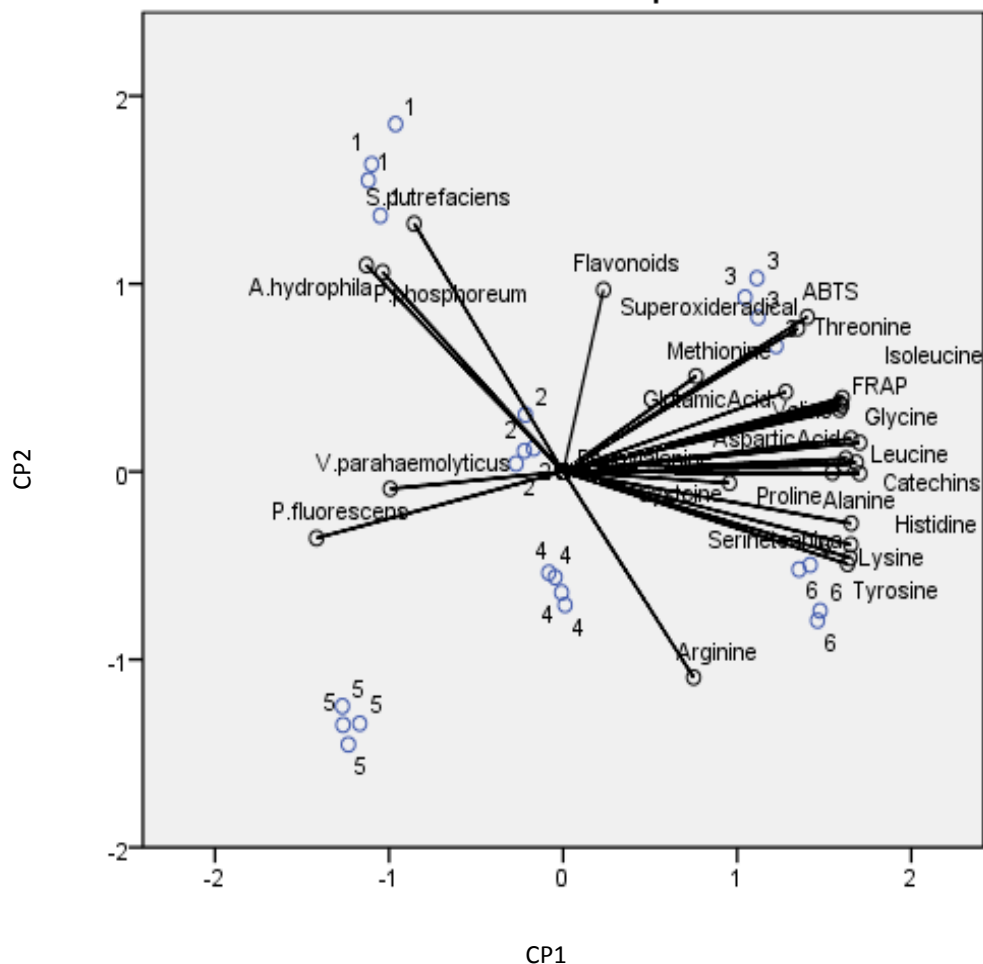


Figura 5. Análisis de los componentes principales. Grupo de análisis multivariante (con aminoácidos) sin tener en cuenta los flavonoides por separado y los minerales.

El análisis de componentes principales de las variables investigadas, excepto para los flavonoides individuales y aminoácidos, se muestra en la Figura 6. Los CPs representan el 38.8% y 30.2% de la varianza explicada, respectivamente. El contenido de catequinas se relaciona en gran medida y positivamente con la actividad antioxidante en el PC1, pero de forma negativa con los minerales. En general los minerales están más asociados con la inhibición de los microorganismos, indicando que los minerales pudieran promover, de algún modo, la inhibición de los microorganismos (ej. *S. putrefaciens* en presencia de sodio y calcio).

Así también se observa que los té son también muy diferentes entre sí, y los valores más bajos de minerales correspondieron a los extractos de *Canela Té Verde* (té 3) y *Wu Lu Mountain* (6).

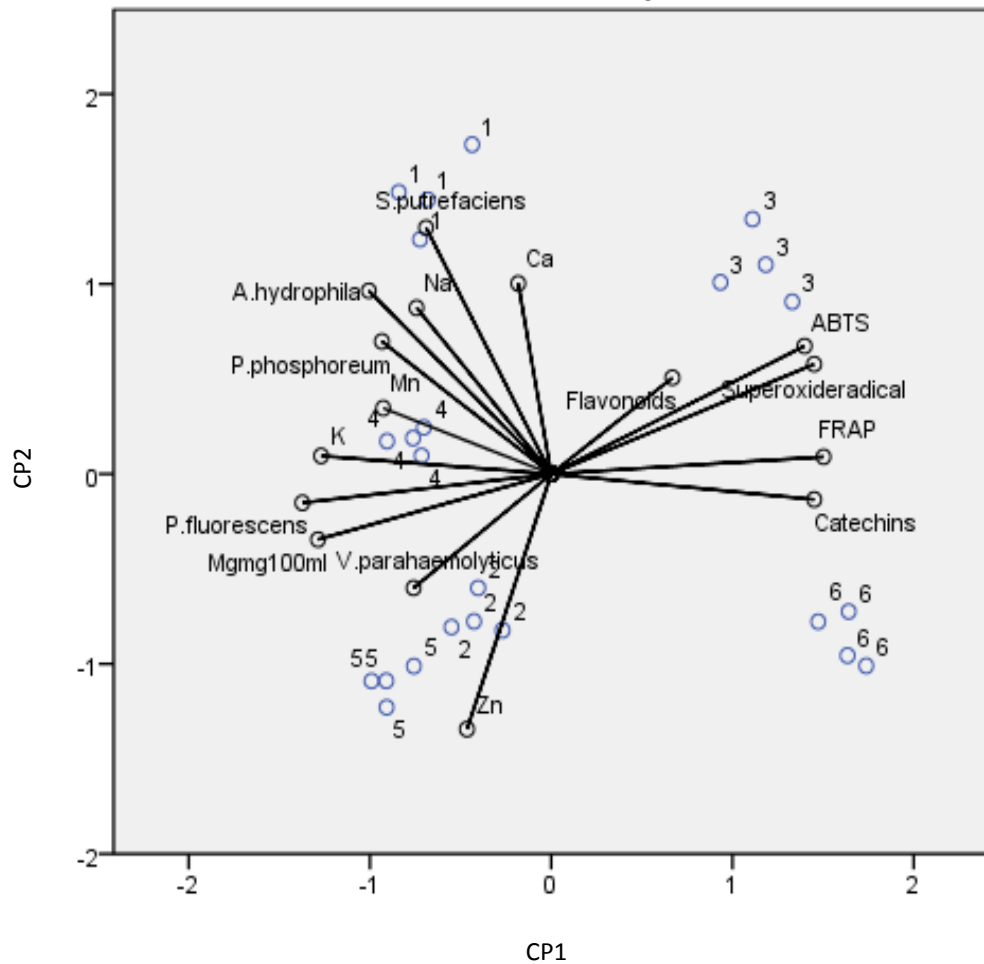


Figura 6. Análisis de los componentes principales. Grupo de análisis multivariante (con minerales) sin tener en cuenta los flavonoides por separado y aminoácidos.

En resumen, estos resultados muestran que las distintas variedades presentan diferente composición y las propiedades de los extractos bioactivos no guardan relación entre sí, siendo el conjunto de componentes lo que definen las propiedades biológicas de cada extracto. Aquellos con niveles más altos de catequinas totales, flavonoles y aminácidos (*Canela Té Verde* y *Wu Lu Mountain*) también tienen la más elevada actividad antioxidante. Sin embargo, estas variedades no presentan una diferencia muy marcada, comparada con las otras, en cuanto a actividad antimicrobiana.

Por otro lado, *China White Hair*, fue la variedad que mostró la menor actividad antioxidante, coincidiendo con el hecho de que posee el menor contenido en catequinas y aminoácidos, valores intermedios de flavonoles, y bajo contenido en carbohidratos y minerales. En paralelo, esta variedad mostró una actividad antimicrobiana frente a *Vibrio parahaemolyticus* y *Pseudomonas fluorescens*, muy superior a los extractos de las otras variedades de té verde, que poseían mayor contenido en fenoles totales. *Japan Sencha Makinohara* exhibió la mayor actividad antimicrobiana, mientras se apreciaron pocas diferencias con el resto de variedades estudiadas.

El hecho de que microorganismos del deterioro sean sensibles a la presencia de extractos acuosos de té verde resulta prometedor por su aplicación en la conservación de alimentos. Según las necesidades, puede ser más interesante la selección de una u otra variedad, y más aún si se pretende inhibir una cepa en concreto. En la presente memoria se pretende utilizar el extracto para la conservación de productos pesqueros y, por tanto, es de interés que muestren ambas propiedades (antioxidante y antimicrobiana) de manera simultánea. Por este motivo se seleccionó la variedad *Wu Lu Mountain*, ya que presenta excelentes propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana.

2.2. Caracterización, evaluación de propiedades activas y liberación de compuestos activos de películas con extracto de té verde

Una vez seleccionado el extracto acuoso con propiedades antimicrobianas y antioxidantes, se procedió a la búsqueda del biopolímero o mezclas de los mismos que sirviera como matriz filmogénica para formar el envase. Dado que los extractos acuosos poseen una actividad moderada, comparada con los aceites esenciales, es importante que mantenga sus propiedades dentro del envase. En general, los extractos activos, una vez incorporados al envase, presentan menor actividad, ya que interactúan con el resto de componentes de la matriz filmogénica, mostrándose menos activos como antioxidantes y antimicrobianos (Gómez-Estaca, Bravo y cols., 2009; Gómez-Estaca, Giménez, Montero y Gómez-Guillén, 2009; Gómez-Estaca y cols., 2007). Es frecuente que las películas cuya matriz polimérica presenta carga neta elevada mantengan una interacción más fuerte, como es el caso de las proteínas. Numerosos estudios citan la interacción entre proteínas y polifenoles (tanto en sistema acuoso como formando parte de películas), aunque la interacción es diferente dependiendo de la proteína. Gómez-Estaca, Giménez y cols. (2009) observaron que la gelatina de vacuno está más agregada (e interacciona más consigo misma), por lo que la interacción que muestra con los polifenoles es inferior a la de gelatina de pescado, que tiene disponibles sus cargas. La

liberación de los compuestos activos, por tanto, depende de las propiedades del biopolímero y del componente activo, así como de las características del alimento (López De Dicastillo y cols., 2011).

En este experimento uno de los objetivos fue la búsqueda de un biopolímero notablemente menos cargado que interaccionara en menor medida con los componentes del extracto y ejercer así su actividad funcional. Entre los polisacáridos hay múltiples estructuras que pueden formar películas, confiriendo una amplia gama de propiedades. Una de las posibilidades es el agar, polisacárido extraído de algas marinas como *Gelidium sp.* y *Gracilaria sp.*, y que consiste en una mezcla de agarosa y agarpectina, escasamente ramificadas y sulfatadas, por lo que se considera con poca carga (Rhim, Lee y Hong, 2011).

Para llevar a cabo este estudio se prepararon películas comestibles simples de agar y complejas agar-gelatina, con el fin de estudiar el efecto de la incorporación de la gelatina de pescado y del extracto de té sobre las propiedades físicas y biológicas de las películas. Asimismo se evaluó la liberación de compuestos activos (antioxidantes y antimicrobianos) del té en los dos tipos de matrices, simples y complejas ("*Release of active compounds from agar and agar gelatin films with green tea extract*").

Las cuatro películas preparadas en este trabajo: agar (A), agar-gelatina (B), agar-extracto de té verde *Wu Lu Mountain* (C) y agar-gelatina-extracto de té verde (D) se exponen en la Figura 7. Las películas de agar son más opacas que las que contienen agar-gelatina (Figura 2B). Al añadir el extracto de té verde se produce un cambio de color en la película. Estos cambios de color y transparencia también se han detectado en otros trabajos de películas con extracto de té verde (Kim y cols., 2006).

2.2.1. Propiedades mecánicas y físicas de las películas

La tensión (T) y elongación hasta rotura (E) de las películas de agar fueron 18.48 MPa y 62.35%, respectivamente. Sin embargo la sustitución de un 33% del agar por gelatina de pescado provocó una ligera disminución en los valores de T y un aumento en la elongación. Este hecho se atribuye a que las propiedades mecánicas de las películas formadas por mezclas de biopolímeros están relacionadas con la naturaleza de los materiales, así como las interacciones entre ellos y el método de procesado (Tian, Xu, Yang y Guo, 2011). Las películas basadas en gelatina, especialmente si son de pescado, son más débiles pero mucho más deformables que las formadas a partir de agar (Giménez y cols., 2012). Por otro lado, la adición de extracto de té verde en las películas con agar y agar-gelatina reducen los valores de T y E.

Esta disminución se debe a las interacciones entre los compuestos fenólicos y la matriz polimérica (Hong y cols., 2009; Siripatrawan y Harte, 2010; Sivarooban, Hettiarachchy y Johnson, 2008a).

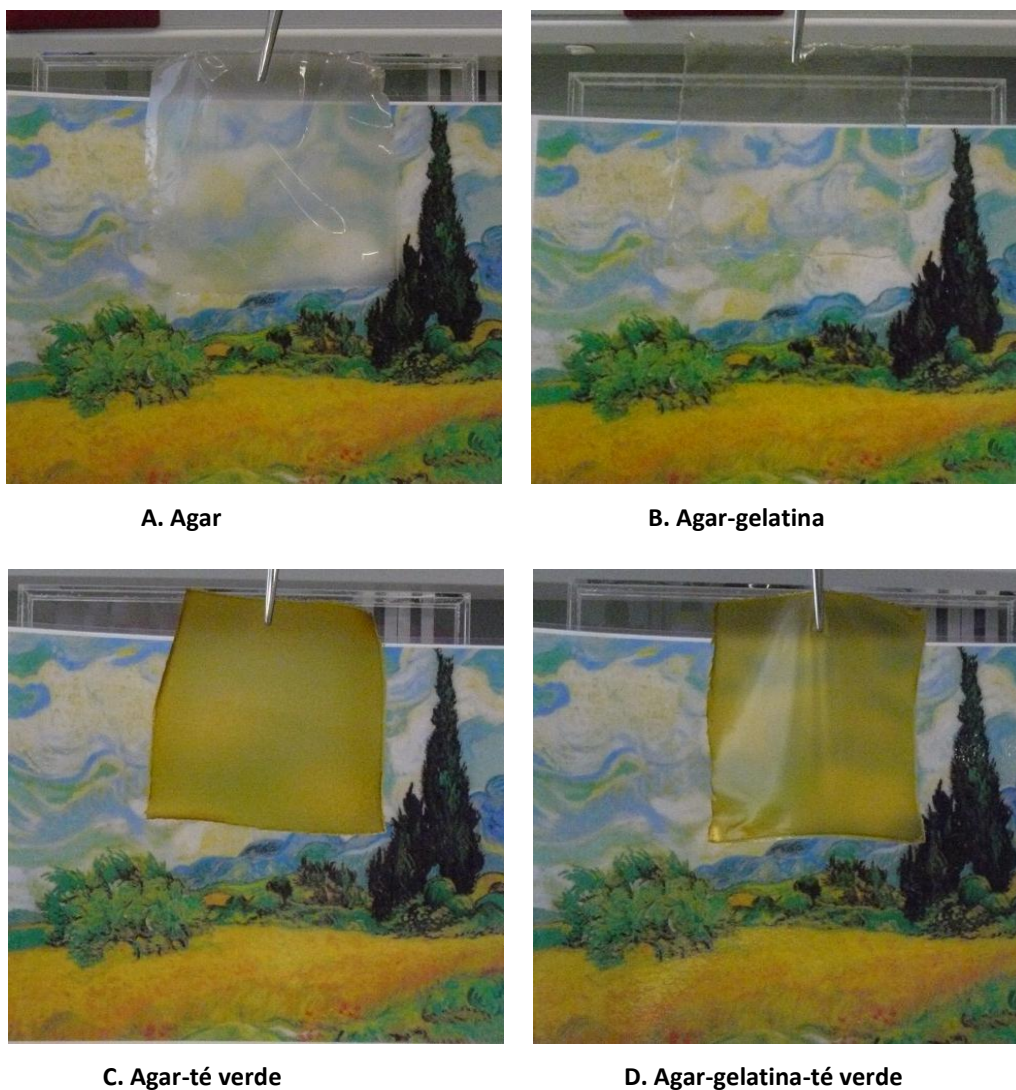


Figura 7. Películas preparadas a base de agar (A), agar y gelatina (B), agar y té verde (C) y agar gelatina y té verde (D).

La permeabilidad al vapor de agua de las películas no se modificó cuando se sustituyó una parte del agar por gelatina, y tampoco se observaron cambios significativos en las películas con extracto de té verde. Sin embargo, otros trabajos describen que la incorporación de extracto de té verde y catequinas en películas basadas en agar de alga roja (*Gelidium corenum*) aumenta los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas (Hong y cols., 2009; Ku y cols., 2008). Esto se atribuyó a la formación de una red compacta y menos permeable.

La solubilidad en agua es una medida de la materia soluble en agua de la película y se utiliza habitualmente como un indicador de la resistencia al agua de la película. En la Figura 8 se muestran las películas de agar con extracto de té después de estar un tiempo sumergidas en agua. Las películas de agar se vuelven gomosas después de estar en contacto con el agua pero mantienen su integridad.



Figura 8. Aspecto de las películas de agar y extracto de té verde después de estar en contacto con el agua.

La solubilidad de las películas de agar después de 16 h sumergidas en agua fue de $24,1 \pm 1,4\%$, mostrando menos resistencia al agua que las elaboradas por Rhim (2011) y Rhim y cols. (2011), cuyos valores de solubilidad fueron 17.9 and 14.7%, respectivamente. No obstante, las películas de agar son bastantes insolubles si se comparan con otro tipo de películas basadas en otros biopolímeros, como metilcelulosa o gelatina de pescado, en especial de aguas frías, las cuales son extremadamente solubles (Carvalho y cols., 2008; García, Pinotti, Martino y Zaritzky, 2004; Pérez-Mateos, Montero y Gómez-Guillén, 2009). La sustitución de un 33% de

agar por gelatina en la película no induce ninguna modificación significativa en la solubilidad. Sin embargo, la adición del extracto de té verde favoreció drásticamente la solubilización de ambos tipos de película (agar y agar/gelatina), atribuyendo este efecto a su naturaleza hidrofílica. En las cinéticas de solubilización se aprecia un plateau a los 15 min, no evidenciándose más allá ningún efecto a tener en cuenta.

Todas las muestras registraron valores similares de resistencia al agua durante los 15 días de estudio, a pesar de las diferencias encontradas en solubilidad en agua entre las películas con y sin extracto de té verde. En la literatura apenas hay trabajos en los que se utilice una técnica similar; no obstante se considera de gran importancia, ya que a pesar de su simplicidad ofrecen gran información sobre el potencial de la película a la hora de aplicarla a diversos alimentos, especialmente en aquellos que contienen alto contenido en agua y no posean piel u otro recubrimiento natural. La filtración de agua se inició después de las 14 h de exposición en todas las películas y persistió durante todo el tiempo que se registró. Ninguna de las películas se deforma o rompe durante este tiempo, lo que les confiere una buena aptitud para ser utilizadas en diversos alimentos.

2.2.2. Liberación de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante en agua

La liberación de compuestos fenólicos de las películas con extracto de té en agua se midió a 22 °C y en varios tiempos durante 16 h. Esto nos permite evaluar, por un lado la liberación de compuestos y, por otro, la difusión de los mismos hacia los alimentos de carácter hidrofílico, ya que según la legislación Europea el agua se considera un simulador de alimento acuoso.

La liberación de componentes activos desde las matrices poliméricas depende tanto de las propiedades de los polímeros, de los compuestos activos, como del producto alimenticio (López De Dicastillo y cols., 2011). Durante los primeros 15 min se produce la máxima liberación de compuestos fenólicos en ambos tipos de películas, y alcanzan cifras similares (~ 50 mg equivalentes de ácido gálico/g película; $p > 0.05$). A partir de este momento ambas películas evolucionan de forma diferente: las de agar continúa liberando polifenoles transcurridos 90 min; cuando hay gelatina presente apenas hay más liberación hasta los 90 min, y solo con el tiempo se liberan paulatinamente de nuevo más componentes del extracto, alcanzando valores de ~60 mg equivalentes de ácido gálico/g película después de 16 h. Por tanto, la presencia de gelatina en la película dificulta la liberación de los compuestos polifenólicos. Es conocida la alta capacidad que tiene la gelatina de interaccionar con los

polifenoles de la película y durante la solubilización de la misma en agua, dando lugar a la liberación de complejos proteína-polifenol o bien formándose complejos una vez que los polifenoles se han liberado de la matriz (Giménez y cols., 2012). Estas interacciones puede ser muy diversas, aunque frecuentemente son interacciones débiles, principalmente hidrofóbicas, las cuales dependen del pH, temperatura, naturaleza, y concentración de la proteína y del polifenol (Papadopoulou y cols., 2005; von Staszewski y cols., 2011).

Además de la liberación de los polifenoles totales, se examinó la liberación de las catequinas y flavonoles mayoritarios del extracto de té incluido en la película. Las catequinas más abundantes del té, epigallocatequina-3-galato y epigallocatequina, fueron las que más se liberaron en ambos tipos de matrices, con valores dos órdenes de magnitud superiores al del resto de catequinas y flavonoides. Tal y como se ha comentado en la liberación del contenido en fenoles totales, las catequinas y flavonoles se liberan de igual manera a partir de las películas, principalmente en los primeros 15 min. Después de 16 h en agua, todos los polifenoles estudiados se liberaron en mayor cantidad en las películas basadas en agar con extracto de té, con la excepción de epicatequina y epicatequina-3-galato.

En cuanto a las catequinas, hubo un aumento significativo en la liberación de epigallocatequina, epicatequina-3-galato y epigallocatequina-3-galato a partir de las películas de agar-extracto de té con el tiempo ($p \leq 0.05$), aunque un 69, 46 y 68% de cada compuesto se liberó durante los primeros 15 minutos. En cambio, no se detectaron concentraciones crecientes de epicatequina después de los 15 minutos ($p > 0.05$), y sólo se observó un ligero aumento en la concentración de catequina entre los 90 minutos y las 16 h ($p \leq 0.05$). La liberación de catequinas en las películas de agar/gelatina-extracto de té se produjo en menor grado y varió en función del polifenol. También se produjo un aumento leve, pero significativo ($p \leq 0.05$), en el caso de epigallocatequina y epigallocatequina-3-galato (de 15 a 90 min), así como epicatequina-3-galato (de 15 min a 16 h).

En el caso de las películas basadas en agar con extracto de té, aproximadamente el 50% de los flavonoles cuantificados en agua después de las 16 h se liberaron durante los primeros 15 minutos. Además, la liberación de todos los flavonoles aumentó de forma significativa a mayor tiempo de contacto ($p \leq 0.05$). Así, hubo subidas entre 30 y 45%, dependiendo del compuesto, de los 15 min a los 90 min, mientras que se observó un aumento de 40 a 50% en el intervalo de tiempo de 90 minutos-16 horas. En cuanto a las películas de agar/gelatina con extracto de té, ninguno de los flavonoles analizados se liberó de manera significativa en el agua entre los 15 min y las 16 h ($p > 0.05$), probablemente debido a las interacciones establecidas entre los polifenoles del té y la gelatina en la matriz polimérica.

2.2.3. Capacidad antioxidante liberada por las películas

Los datos obtenidos (FRAP y ABTS) de este estudio se reflejan en la Figura 9. En las películas con agar y extracto de té, aproximadamente el 60% de la capacidad antioxidante (medida por FRAP y ABTS) se liberó después de 16 h en agua durante los primeros 15 minutos. La capacidad reductora liberada por las películas de agar/gelatina con extracto de té fue significativamente menor que la de las películas sin gelatina a partir de los 15 min ($p \leq 0.05$), mientras que la capacidad secuestradora fue menor en las primeras durante todo el tiempo evaluado ($p \leq 0.05$). El aumento significativo de la actividad antioxidante en las películas complejas de agar/gelatina solo se observó entre los 90 min y las 16 h. Esto pone de nuevo de manifiesto como la presencia de gelatina en la matriz obstaculiza la liberación de los compuestos polifenólicos, probablemente por la interacción proteína-polifenol ya comentada. El grado de enmascaramiento de la actividad antioxidante depende de la composición de polifenoles y del tipo de proteína (Arts y cols., 2002; von Staszewski y cols., 2011). Sin embargo, estos complejos de proteínas-polifenoles pueden retener parte de la actividad antioxidante, puesto que algunos grupos hidroxilo de la molécula quedan libres, lo que permite que estos compuestos mantengan sus propiedades antioxidantes (Almajano, Delgado y Gordon, 2007).

La liberación de los compuestos fenólicos de las dos películas mostró una correlación positiva con la actividad antioxidante medida por FRAP ($r = 0,939$ y $r = 0,951$ para la película simple de agar y extracto de té y la compuesta por agar/gelatina y extracto de té, respectivamente, $p \leq 0,01$) y ABTS ($r = 0,955$ y $r = 0,923$ para la simple y compleja, respectivamente, $p \leq 0,01$). Por otra parte, la epicatequina y epigallocatequina-3-galato son dos de las catequinas que más contribuyen a la eficacia antioxidante del té verde (Komes y cols., 2010; Toschi y cols., 2000), debido a la presencia de un grupo galato en la posición 3' del anillo C (epigallocatequina-3-galato) y un grupo hidroxilo en la posición 5' del anillo B (ambos compuestos) (Guo y cols., 1999). La liberación de estos dos compuestos en el agua a partir de las películas simples de agar y extracto de té mostraron correlación altamente significativa con el FRAP ($r = 0,985$ y $r = 0,979$, respectivamente, $p \leq 0.01$), y en menor medida con el ABTS ($r = 0,871$ y $r = 0,872$, respectivamente, $p \leq 0.05$). Sin embargo, en el caso de la película compleja no se observó una correlación significativa entre la actividad antioxidante ($p > 0.05$) y la liberación de epigallocatequina y galato de epigallocatequina.

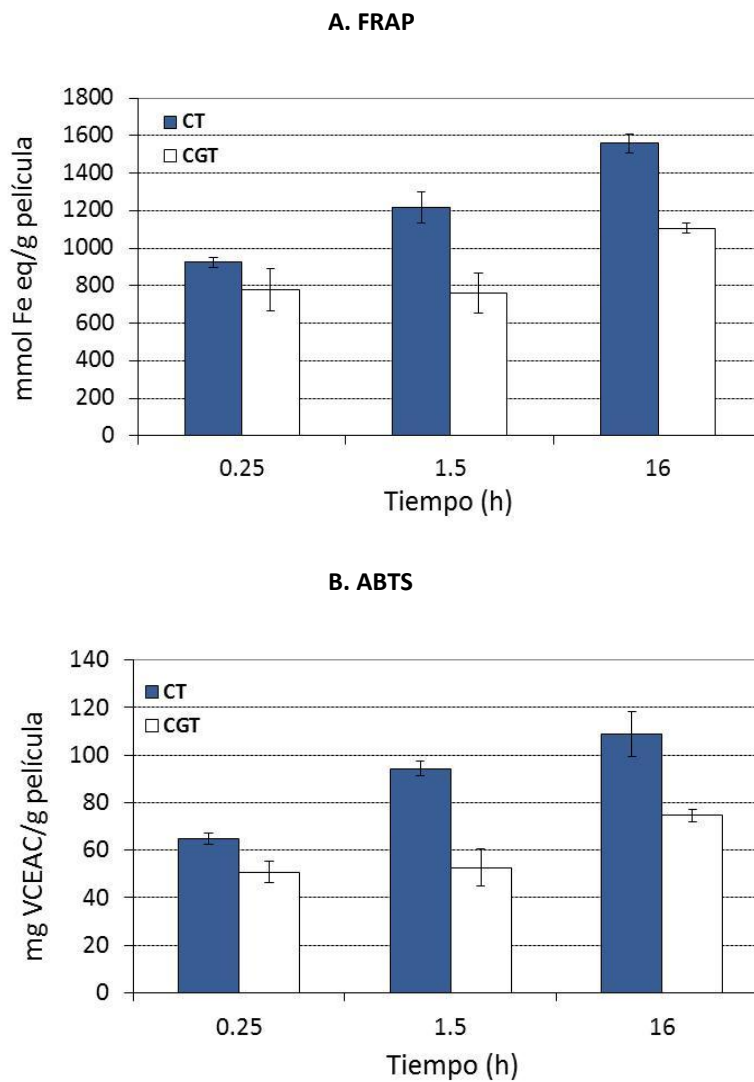


Figura 9. Capacidad antioxidante liberada por FRAP (A) y ABTS (B) a partir de las películas de agar/té verde (CT) y de agar-gelatina/té verde (CGT) (Gimenez, López de Lacey, Pérez-Santín, López-Caballero y Montero, P., 2012).

2.2.4. Propiedades antimicrobianas de las películas

Tal y como se describe al comienzo del apartado el extracto acuoso del té verde *Wu Lu Mountain* inhibe a *Vibrio parahaemolyticus*, *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas hydrophila*. Los resultados revelaron además que la actividad antimicrobiana del extracto de té se mantuvo en la película, a excepción de *A. hydrophila*. Sin embargo, las películas de agar y/o gelatina con extracto de té, también inhibieron ligeramente el crecimiento de *P. aeruginosa*. Por otro lado, las películas

simples y compuestas sin extracto de té no mostraron actividad antimicrobiana, como cabía esperar. Las películas de agar permiten la difusión de té verde para que ejerza su actividad antimicrobiana. En este caso, la presencia de gelatina en las películas no modificó la actividad del extracto de té en la mayoría de los casos ($p > 0.05$), por lo que la interacción proteína-polifenol no pareció afectar a esta capacidad. Von Staszewski y cols. (2011) observaron que la actividad antimicrobiana de los polifenoles del té verde en presencia de proteínas del suero aumentaba al disminuir la concentración de estas proteínas. En este experimento no se observó este cambio, ya que la actividad antimicrobiana de las películas con y sin gelatina fue similar, a pesar del retraso y menor liberación de polifenoles y actividad antioxidante en los recubrimientos que contienen gelatina. Las películas de agar con extracto de té inhibieron el crecimiento de *P. phosphoreum*, *S. putrefaciens*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus* y *P. fluorescens* (tal como se describe en el trabajo “*Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (Camellia sinensis L.) as an expression of its chemical composition*”. En el presente estudio se demuestra que el extracto de té no pierde sus cualidades como antimicrobiano cuando forma parte de la formulación de la película. Este hecho es prometedor en términos de conservación de los alimentos, ya que es poco frecuente que las películas con extractos acuosos de plantas muestren su actividad una vez incorporados a las películas. Por lo tanto, es posible obtener películas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas a partir de películas simples en base a agar y de películas complejas en base a agar/gelatina con la incorporación de extracto acuoso de té verde. Si se comparan los resultados de actividad antimicrobiana del extracto de té con los obtenidos en el aceite esencial de clavo, el aceite esencial de clavo tiene un mayor espectro de acción porque actúa frente a un mayor número de cepas (Gómez-Estaca, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén y Montero, 2010), y su inhibición es mayor solo o incorporado en las películas. En la Figura 10 se muestran los halos de inhibición producidos por el aceite esencial de clavo y el extracto de té frente a las cepas *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*, y la inhibición es mayor en las películas con aceite esencial de clavo. No obstante, a pesar de que el aceite esencial es más potente frente al crecimiento de estas cepas tiene la desventaja de aportar un olor y un sabor más intenso a los alimentos, como ya se mencionó.

Otra desventaja que tiene el aceite esencial de clavo es que inhibe ligeramente el crecimiento de bacterias que son beneficiosas, como las bacterias lácticas (ej. *L. acidophilus*), a diferencia de los extractos de té verde que no producen ningún efecto inhibitorio en este tipo de bacterias. Por lo tanto, hay que valorar las ventajas e inconvenientes de utilizar un extracto u otro, y la elección en cada caso dependerá de la finalidad última del envase. En este

caso el extracto de té verde *Wu Lu Mountain* se considera un candidato ideal para el desarrollo y aplicación de envases comestibles potencialmente bioactivos.

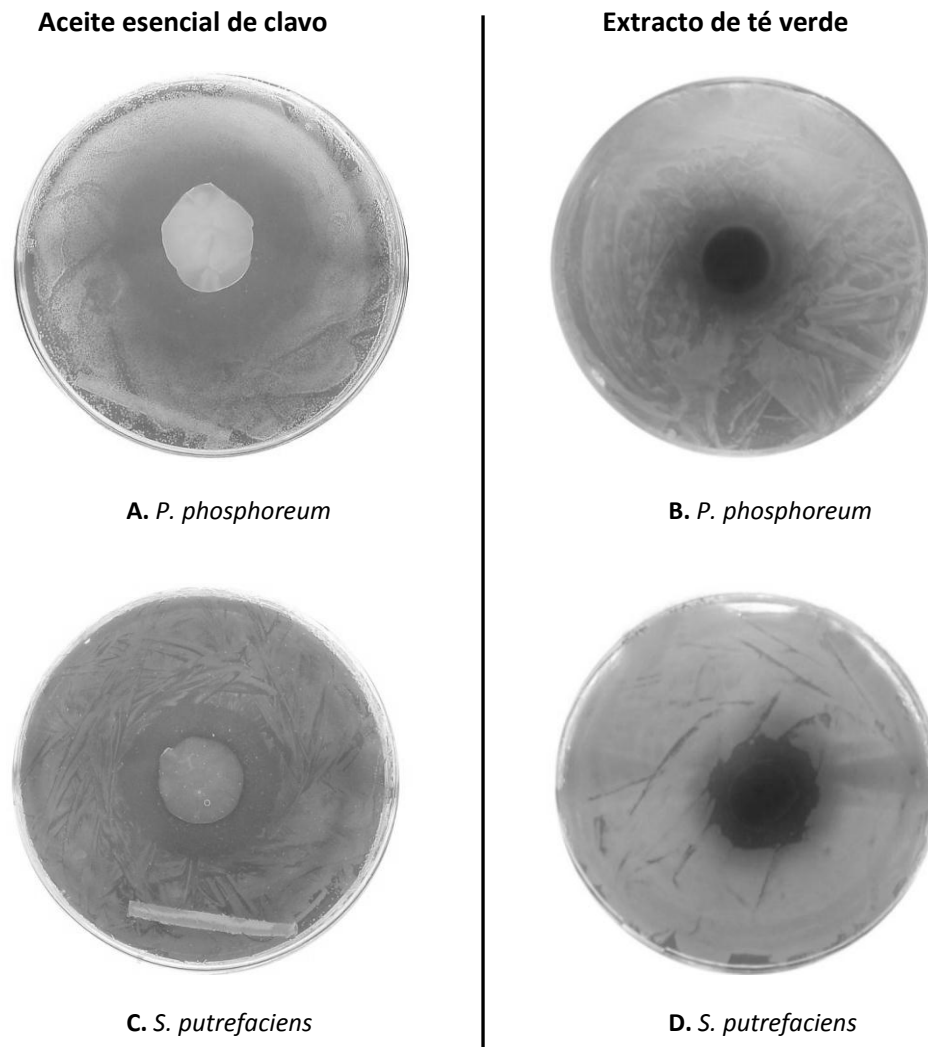


Figura 10. Halos de inhibición producidos por las películas con aceite esencial de clavo (A y C) y extracto de té verde (B y D) frente a *P. phosphoreum* y *S. putrefaciens*.

3. INCORPORACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN ENVASES COMESTIBLES Y ESTUDIO DE SU VIABILIDAD DURANTE LA CONSERVACIÓN DE FILETE DE MERLUZA

3.1. Funcionalidad de bacterias lácticas incorporadas a coberturas y películas comestibles

El desarrollo de envases comestibles a los que se incorporan aceites esenciales procedentes de plantas o extractos acuosos como el té verde confieren estabilidad y garantizan la seguridad a los productos a los que se aplican, contribuyendo en parte a cubrir la demanda del consumidor por alimentos mínimamente procesados, con pocos aditivos y sin apenas cambios a nivel sensorial. Cuando los compuestos incorporados a los envases mantienen la calidad y seguridad del alimento se constituye un *envasado activo*; además, los compuestos añadidos al envase pueden producir un efecto potencialmente beneficioso en el consumidor, constituyendo así un *envasado bioactivo*. La incorporación de bacterias lácticas o probióticos a envases comestibles es de gran interés, ya que los envases pueden actuar como vehículos para las bacterias. Los envases comestibles con bacterias se encuadran en el concepto de bioconservación, como extensión de la vida útil y el aumento de la seguridad de un alimento a través del uso de una microflora natural o controlada y de sus productos antimicrobianos (Stiles, 1996).

Uno de los objetivos de la presente memoria consistió en el diseño y la formulación de envases (películas y recubrimientos) a los que se incorporaron bacterias lácticas: *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, y en el estudio de su efecto durante la conservación de merluza refrigerada. Como obstáculo adicional se aplicó un tratamiento de alta presión, ya que estudios previos revelan que la combinación de tratamientos -envases comestibles y alta presión- es un método eficaz para aumentar la vida del pescado.

La Figura 11 muestra los datos obtenidos de supervivencia de las bacterias estudiadas (*L. acidophilus* y *B. bifidum*), tanto en las películas como en los recubrimientos. Los resultados indican que los envases (películas y recubrimientos) comestibles de gelatina pueden vehicular bacterias lácticas, y tanto *L. acidophilus* como *B. bifidum* permanecen viables incluso hasta 13 días (Figura 11 B). Las bacterias fueron capaces de crecer en los medios de cultivo, aunque se espera un descenso en los recuentos debido a la adaptación de las bacterias al nuevo sustrato y a las temperaturas utilizadas para la conservación (2 ± 1 °C).

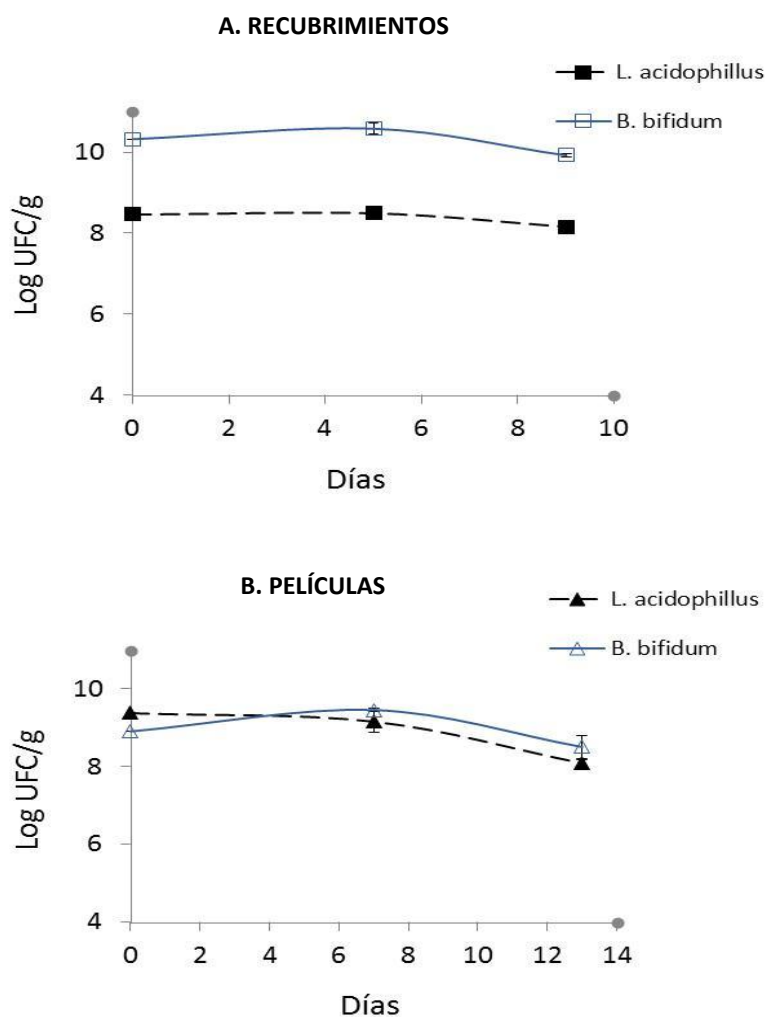


Figura 11. Supervivencia de las bacterias *L. acidophilus* y *B. bifidum* (recuentos microbianos expresados en UFC/mL) en recubrimiento de gelatina (A) y película de gelatina (B), conservadas a 2 ± 1 °C (López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Guillén y Montero, 2012).

En esta línea, Tapia y cols. (2007) describen que la concentración de *B. lactis* Bb-12 incorporado a coberturas de alginato o *gellan* (10^9 UFC/g) disminuyó cuando se aplicó a trozos de papaya y manzanas (aproximadamente en 2 unidades logarítmicas), hecho que se atribuye a fenómenos de dilución, si bien esta población de bifidobacterias permanece viable y constante durante 10 días a 2 °C. Por otro lado, la composición del envase es importante para la supervivencia de las bacterias. Así, los envases del presente ensayo (películas y recubrimientos) contenían sorbitol en su composición. El sorbitol y poli-oles actúan como agentes protectores de los microorganismos en situaciones de descenso de actividad de agua, como son la congelación-deshidratación de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*

(Carvalho y cols., 2004). El mecanismo por el cual el sorbitol ejerce su efecto protector puede estar relacionado con la interacción entre los azúcares y los fosfolípidos de membrana, ayudándoles a mantener su fluidez (Santivarangkna, Kulozik, Kienberger y Foerst, 2009). Gialamas y cols. (2010) incorporaron *Lactobacillus sakei* (10^6 UFC/cm², directamente antes del moldeo o por *spray*) en películas comestibles de caseinato sódico y las mantuvieron a 4 y 15 °C; cuando las películas no contenían sorbitol se observó un incremento en la viabilidad de las bacterias a 4 °C, que se atribuyó a un descenso en el metabolismo experimentado por los organismos debido a las bajas temperaturas.

El desarrollo de envases comestibles con bacterias y su aplicación al pescado constituye un reto desde el punto de vista tecnológico, no sólo por mantener las bacterias viables en un medio que ofrece menores y limitadas posibilidades como sustrato para crecer, sino también por la temperatura de refrigeración utilizada, lejos de la óptima de incubación de estas bacterias. La formulación debe permitir, además, que el envase comestible mantenga la integridad, a la vez que permita la difusión de las bacterias al músculo. En el caso de tratamientos combinados con alta presión, las condiciones de tratamiento (nivel de presión/ temperatura/ tiempo) deberán ser tales que cumplan con el objetivo para el cual se aplica (en este caso reducción de la flora total del pescado, especialmente flora psicotrofa Gram-negativa y mantener el aspecto crudo del producto), minimizando el efecto sobre la flora láctica incorporada en el envase. Es importante señalar que no se han encontrado referencias anteriores en la literatura sobre el papel de estos envases durante la conservación del pescado en refrigeración.

Durante la conservación en refrigeración (2 ± 1 °C), la aplicación de recubrimientos comestibles de gelatina a filetes de merluza con *B. bifidum* redujo la flora total en 1 unidad logarítmica respecto al control. Sin embargo, lo más llamativo fue la inhibición observada en la merluza con recubrimiento (con o sin bacterias) en los microorganismos productores de H₂S, presuntamente considerados como *Shewanella putrefaciens*, organismo involucrado en el deterioro del pescado (López-Caballero, Martínez-Alvarez, Gómez-Guillén y Montero, 2007). Es importante tener en cuenta la supervivencia de las bifidobacterias durante la conservación, con el descenso de 1 unidad logarítmica comparado con la concentración inicial. Los recuentos de bacterias lácticas (en medio MRS) fueron similares en todos los lotes, alcanzando 4 log UFC/g al final del periodo estudiado. Las diferencias entre los recuentos de bacterias lácticas y los de bifidobacterias (8 log UFC/g) se atribuyeron a la dificultad que tiene la cepa *B. bifidum* de crecer en medios de cultivo sin la adición de cisteína. Algunos de los datos más relevantes

de este estudio de conservación (recuentos de microorganismos productores de H₂S y bifidobacterias) se reflejan en la Figura 12.

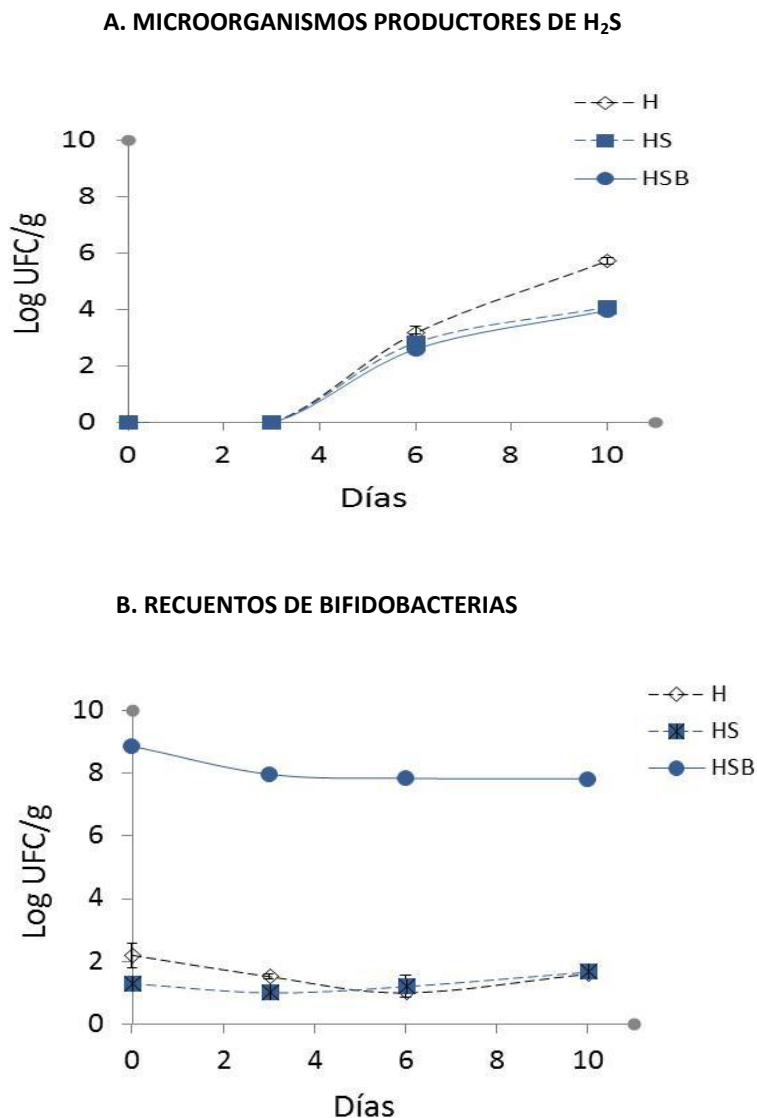


Figura 12. Recuentos microbianos en merluza cubierta con la solución filmogénica de gelatina (recubrimiento comestible) durante su conservación a 2 ± 1 °C. (H): merluza control; (HS); merluza bañada en la solución filmogénica; (HSB): merluza bañada en la solución filmogénica con *B. bifidum* (López de Lacey y cols., 2012).

Las bacterias lácticas pueden mejorar la salud del consumidor tras la ingesta, pero además protegen de la acción de los microorganismos patógenos, compitiendo con ellos por los nutrientes mediante la producción de metabolitos como ácidos orgánicos, bacteriocinas, etc. (García, Martín, Sanz, Hernández, 1995; Rydlo, Miltz y Mor, 2006). La utilización de bacterias

lácticas frente a microorganismos patógenos se ha descrito en la literatura para diversos alimentos. Así, la incorporación de *Lactobacillus plantarum* LKE5 a gambas contaminadas con *Listeria monocytogenes* inhibió incluso 3 ciclos logarítmicos el crecimiento del patógeno (Huss, Jeppesen, Johansen y Gram, 1995), siendo este efecto mayor en condiciones experimentales cercanas al límite de crecimiento del patógeno (en términos de pH, temperatura, etc.). En otro experimento se realizó un baño con *Lactobacillus rhamnosus* GG (10^8 UFC/ml) en manzana fresca cortada. Los resultados mostraron que, si bien los recuentos de *Salmonella* no se afectaron al inocular el patógeno conjuntamente con *L. rhamnosus* GG, *L. monocytogenes*, se redujo 1 unidad logarítmica en presencia del lactobacilo (Alegre, Viñas, Usall, Anguera y Abadias, 2011). Además, la calidad de la manzana no se vio afectada por la incorporación del *L. rhamnosus* GG, y la población de probióticos se mantuvo sobre 10^7 UFC/g durante 28 días de conservación a 5 y 10 °C.

La incorporación de bacterias a envases comestibles (películas y recubrimientos) puede ser de gran interés y ofrecer, por tanto, nuevas posibilidades. Según nuestro conocimiento sólo hay dos referencias en la literatura al respecto (Gialamas y cols., 2010; Tapia y cols., 2007), además del trabajo desarrollado en la presente memoria ("*Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films*", López de Lacey y cols., 2012).

La ventaja de incorporar bacterias a un envase frente a la de incorporar las bacterias directamente al alimento, por ejemplo mediante baño, guarda relación con la distribución y concentración de bacterias en el envase. Kristo, Koutsoumanis y Biliaderis (2008) describieron que el efecto de metabolitos microbianos como la nisina, contra patógenos como *L. monocytogenes*, es mayor cuando la nisina forma parte de un recubrimiento (caseinato sódico) que cuando se aplica directamente en el medio de cultivo. Este hecho se puede atribuir al descenso en la tasa de difusión del envase al producto, manteniéndose así concentraciones altas del compuesto activo en la superficie (Gialamas y cols., 2010). Estos autores señalan que *Lactobacillus sakei* incorporado a películas de caseinato sódico inhibe efectivamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (hasta 4 ciclos logarítmicos), tanto en medio de cultivo como en filetes de ternera (a 5 y 15 °C), incrementando así la seguridad de los alimentos.

Los tratamientos combinados con alta presión se aplicaron a 200 MPa para evitar la modificación de las características sensoriales del pescado. Con este tratamiento también se eliminó, en parte, la flora tipo Gram-negativa, mientras que la Gram-positiva (endógena y la incorporada al envase comestible) se afectó en menor medida por ser más resistente a la alta presión (López-Caballero, Pérez-Mateos, Montero y Borderías, 2000). Este ensayo se realizó en películas y no en recubrimientos por la potencial resistencia adquirida por las bacterias, debido

al manejo y estrés sufrido en la preparación del envase (deshidratación, exposición a temperaturas moderadas, etc.), fomentando así su viabilidad. En relación a este hecho, Gialamas y cols. (2010) indicaron que cuando las bacterias se incorporan a la solución filmogénica (que posteriormente da lugar a la película) se exponen al secado, lo que podría explicar el incremento de viabilidad de bacterias incorporadas por este método en comparación con las incorporadas a la película mediante spray (ya que este método apenas aporta estrés a las bacterias).

El tratamiento aplicado en este experimento (200 MPa/20 °C/10 min) redujo en 1 unidad logarítmica los recuentos de bacterias totales, y los microorganismos productores de H₂S permanecieron por debajo del límite de detección. La sensibilidad de *S. putrefaciens* a la alta presión se ha referido con anterioridad (López-Caballero y cols., 2000). Tanto la flora láctica como las bifidobacterias no se afectaron por el tratamiento. Asimismo no se detectó daño subletal ni estrés reversible. Estos resultados son de gran interés porque el tratamiento aplicado permite la eliminación de parte de los bacilos psicrotrofos Gram-negativos que producen la alteración del pescado en beneficio de la flora láctica, cuyo metabolismo es generalmente más lento e implica una menor producción de metabolitos responsables de la producción de olores desagradables. Las colonias luminiscentes, presuntos *P. phosphoreum* (López-Caballero, Álvarez Torres, Sánchez-Fernández y Moral, 2002) inicialmente estuvieron por debajo del límite de detección. Aunque la resistencia de este género a tratamientos de alta presión se ha descrito (Paarup, Sánchez, Peláez y Moral, 2002), la aplicación de (300 Mpa/10 min / 5 y 40 °C) a salmón recubierto con películas de gelatina-lignina reduce significativamente los recuentos de *P. phosphoreum* (Ojagh, Núñez-Flores, López-Caballero, Montero y Gómez-Guillén, 2011). Durante la conservación, el lote control (merluza sin tratamiento) evolucionó de forma similar al lote cubierto con película + *B. bifidum*. Por el contrario, la tasa de crecimiento exponencial fue menor en el lote con película presurizado, en especial para los microorganismos productores de H₂S. Al final de la conservación (9 días), la flora total en el lote presurizado fue 2 unidades logarítmicas inferior a la del resto de los lotes; en este lote, los recuentos de totales fueron similares a los de microorganismos productores de H₂S. La aplicación de envases comestibles con bacterias (sometidos o no a tratamiento de alta presión) inhibió el crecimiento de *P. phosphoreum*, microorganismo alterante activo implicado en el deterioro del pescado, ya que sólo se detectó en el lote sin tratamiento. En relación a las bacterias lácticas no se encontraron diferencias entre lotes y las bifidobacterias permanecieron viables en ambos lotes (presurizado o no) durante el tiempo de conservación.

En cuanto a los índices físico-químicos (Figura 13), la presencia de bacterias y su paso al músculo en los lotes con películas de gelatina originó un pequeño descenso en los niveles de pH durante la conservación. Asimismo, la concentración de nitrógeno básico volátil total permaneció por debajo de 20 mg N-TVB/100 g músculo en el lote recubierto con película y presurizado, mientras que el resto registraron valores 60 mg-NBVT/100 g músculo. Estos niveles estuvieron en consonancia con los recuentos de microorganismos (bacterias totales y productores de H₂S) obtenidos por estos lotes, si bien el pH alcanzado en los lotes cubiertos con películas de gelatina no reflejaron los niveles de compuestos volátiles de cada uno de ellos. La combinación de tratamientos (alta presión) y envases comestible con bacterias, presentaron cierto efecto aditivo en la inhibición de las bases volátiles, ya que la merluza presurizada en idénticas condiciones a la utilizada en el presente ensayo y con una carga microbiana similar, alcanzó valores de 35-40 mg N-TVB/100 g músculo aproximadamente a los 10 días de conservación. Es más, la aplicación de las películas con *B. bifidum* no confirió olores extraños al pescado. Quizás la presencia de bifidobacterias interfiera de algún modo en la producción de compuestos básicos volátiles (por ejemplo, compitiendo por nutrientes, etc.), con microorganismos tales como *S. putrefaciens*, disminuyendo así los niveles registrados en cierta medida. Está previsto en el futuro establecer la tasa de difusión de las bacterias al músculo y estudiar cómo se afecta la calidad sensorial del pescado en presencia de la flora láctica.

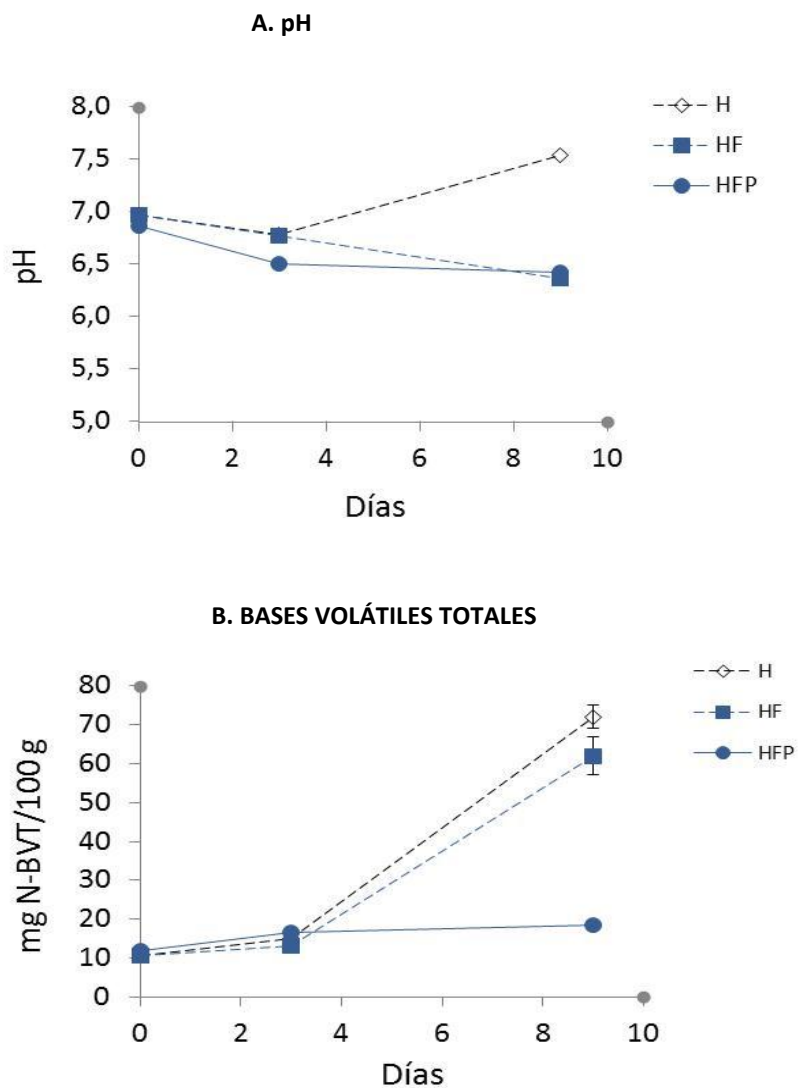


Figura 13. A) pH y B) bases volátiles totales de la merluza cubierta con la película de gelatina y sometida a alta presión (200 MPa/20 °C/10 min) durante su conservación a 2±1 °C. (H): merluza control; (HS); merluza película + *B. bifidum*; (HSB): merluza presurizada película + *B. bifidum* (López de Lacey y cols., 2012).

4. DESARROLLO DE PELÍCULAS COMPLEJAS PARA LA BIOCONSERVACIÓN DE PRODUCTOS PESQUEROS

4.1. Viabilidad de los probióticos en presencia de los polifenoles mayoritarios del té verde y extracto de té verde/4.2. Biotransformación de los compuestos polifenólicos mayoritarios del té verde y extracto de té verde

En apartados anteriores han quedado patente las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las películas de té verde (*"Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract"*) y la utilización de envases comestibles como vehículo de bacterias lácticas (*"Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films"*). Por ello se planteó la posibilidad de combinar el extracto de té verde con bacterias probióticas con la incertidumbre de si los polifenoles del té podrían inhibir a estas bacterias, ser incapaces de crecer en estos sustratos o bien que las bacterias fueran capaces de transformar los polifenoles en otros productos con diferente actividad biológica.

La actividad biológica del té verde se ha asociado principalmente a su contenido rico en polifenoles ya que éstos presentan interesantes propiedades. Sin embargo, los efectos beneficiosos de los polifenoles sobre el organismo humano dependen de su biodisponibilidad en el mismo (Walle, 2004). En este sentido, el reciente interés por añadir probióticos a los alimentos ricos en polifenoles (Marotti, Bonetti, Biavati, Catizone y Dinelli, 2007; Otieno, Ashton y Shah, 2006) se debe a que éstos poseen determinadas actividades enzimáticas [deglicosilación, dehidroxilación, demetilación o decarboxilación, etc. (Aura, 2008)] que permiten transformar los polifenoles en formas más biodisponibles o activas que el compuesto fenólico de origen (Donkor y Shah, 2008; Tsangalis, Ashton, McGill y Shah, 2002; Uskova, Kravchenko, Avrenjeva y Tutelyan, 2010). En esta línea, se han publicado algunos trabajos sobre la biotransformación de flavonoides producidas por *Bifidobacterium* sp. o *Lactobacillus* sp. (Ávila y cols., 2009; Donkor y Shah, 2008; Marotti y cols., 2007). Sin embargo, no hay mucha información en la literatura sobre el efecto de las bacterias probióticas en la actividad antioxidante del flavonol. La fermentación de las catequinas con bacterias probióticas ha sido incluso menos estudiada que la de los flavonoles.

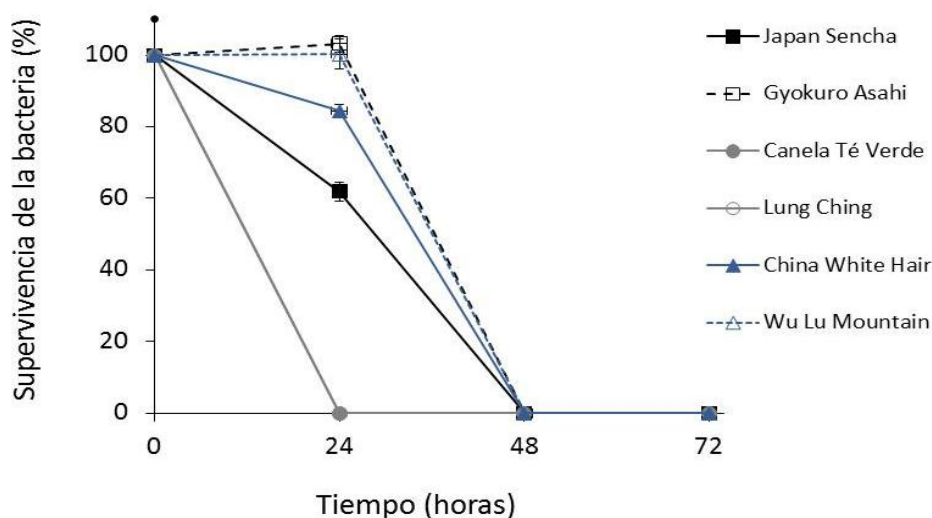
Los objetivos de este estudio se centraron en evaluar la viabilidad de tres cepas probióticas comerciales (*Lactobacillus paracasei* LAFTI@L26, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI@L10 y *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* LAFTI@B94) en los polifenoles mayoritarios o más característicos del té (5 tipos de catequinas y 5 flavonoles), la transformación de estos

compuestos y la actividad antimicrobiana, antioxidante (FRAP, ABTS) y antihipertensiva resultante de la incubación de los compuestos con la bacteria probiótica. Este mismo estudio se realizó en el extracto de té verde *Wu Lu Mountain*.

Como primer paso se determinó la actividad enzimática β -glucosidasa, β -galactosidasa y α -ramnosidasa de los tres probióticos. Estas enzimas realizan la deglicosilación de los polifenoles, considerada como el primer paso del metabolismo de los flavonoides glicosilados (Aura, 2008; Braune y Blaut, 2011; Serra y cols., 2012). Las tres bacterias probióticas mostraron actividad β -glucosidasa, β -galactosidasa y α -ramnosidasa, siendo esta última actividad la que presentó los niveles más bajos. Esta actividad α -ramnosidasa está sólo presente en la flora microbiana intestinal (Scalbert y Williamson, 2000) y su producción se ha descrito en algunas especies bacterianas como, por ejemplo, *Bacteroides* y *Lactobacillus* (Avila y cols., 2009; Beekwilder y cols., 2009; Bokkenheuser, Shackleton y Winter, 1987). En la literatura no se ha encontrado información acerca de esta actividad en especies como *Bifidobacterium*. De entre todas las cepas estudiadas, *L. acidophilus* L10 exhibió los valores más altos de actividad enzimática, excepto para α -ramnosidasa, que registró los menores. Donkor y Shah (2008) y Otieno y cols. (2006) encontraron también que *L. acidophilus* L10 presentó los niveles más altos de actividad β -glucosidasa, en comparación con *B. animalis* B94 y *L. paracasei* L26, entre las 24-36 h de incubación; y de *Bifidobacterium* spp. y *L. paracasei* L26 a las 24 h de la fermentación de la leche de soja. *L. paracasei* L26 y *B. animalis* B94 tuvieron un comportamiento similar y apenas se observaron diferencias entre ellas, excepto en la actividad β -galactosidasa (más alta en *L. paracasei* L26). De acuerdo con Donkor y Shah (2008) y Otieno, Ashton y Shah (2005) las diferencias entre las actividades β -glucosidasa de diversas bacterias se atribuyen a la especificidad de cada especie.

Este trabajo se diseñó con el objetivo final de utilizar las bacterias probióticas en combinación con el extracto de té verde, por lo que se consideró de gran importancia determinar la supervivencia de las tres bacterias lácticas en los 6 extractos de té verde ya estudiados (apartado 2.1): *Japan Sencha Makinohara*, *Japan Gyokuro Asahi*, *Canela Té Verde*, *Lung Ching*, *China White Hair* y *Wu Lu Mountain*. La supervivencia de las tres cepas en las seis variedades se muestra en la Figura 14 y 15. Los extractos de té verde, a excepción del té verde de canela, permitieron la supervivencia de las tres cepas probióticas investigadas durante más tiempo que en la solución control que contenía sólo 0.9% de NaCl.

A. SUPERVIVENCIA DE *L. acidophilus* L10 EN LOS 6 TÉS



B. SUPERVIVENCIA DE *L. paracasei* L26 EN LOS 6 TÉS

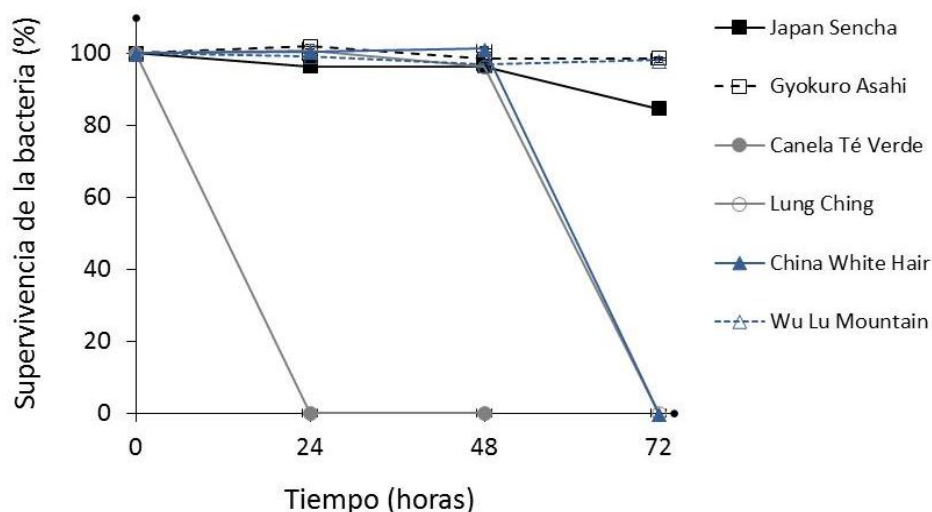


Figura 14. Supervivencia de la bacteria *L. acidophilus* L10 (A) y *L. paracasei* L26 (B) en los 6 extractos de té verde a 37 °C. Los datos están expresados en porcentaje de supervivencia (%) (López de Lacey, Pérez Santín y cols., 2012b).

La supervivencia fue menor en el té verde con canela quizás porque los componentes de la canela son tóxicos para estas bacterias probióticas. En este sentido, las infusiones acuosas de canela y aceites tienen actividad antimicrobiana frente a varias especies, incluyendo *Lactobacillus* sp. (Ceylan y Fung, 2004). *L. acidophilus* L10 fue la especie con más requerimientos para sobrevivir porque su número descendió a las 24 h de incubación (<20%) y murió a las 48 h (independientemente de la variedad de té). En especial, *L. paracasei* L26 y *B.*

animalis B94 sobrevivieron más tiempo en *Japan Sencha Makinohara*, *Asahi Gyokuro* y *Wu Lu Mountain*, seguido por *China White Hair* y de *Lung Ching*. *L. acidophilus* L10 probablemente requiere energía de otras fuentes presentes en el té como es, por ejemplo, la obtención de glucosa a partir de los flavonoides glicosilados mediante la producción de enzimas con actividad glucosidasa (Schneider, Schwiertz, Collins y Blaut, 1999). A pesar de que ésta cepa presentó los niveles más altos de actividad glucolítica, su supervivencia fue menor con respecto a las otras bacterias. Tal vez este hecho se deba a que los azúcares procedentes de los flavonoides glicosilados se toman más rápidamente que en las otras especies. Asimismo, *L. acidophilus* mostró una menor actividad α -ramnosidasa.

SUPERVIVENCIA DE *B. animalis* B94 EN LOS 6 TÉS

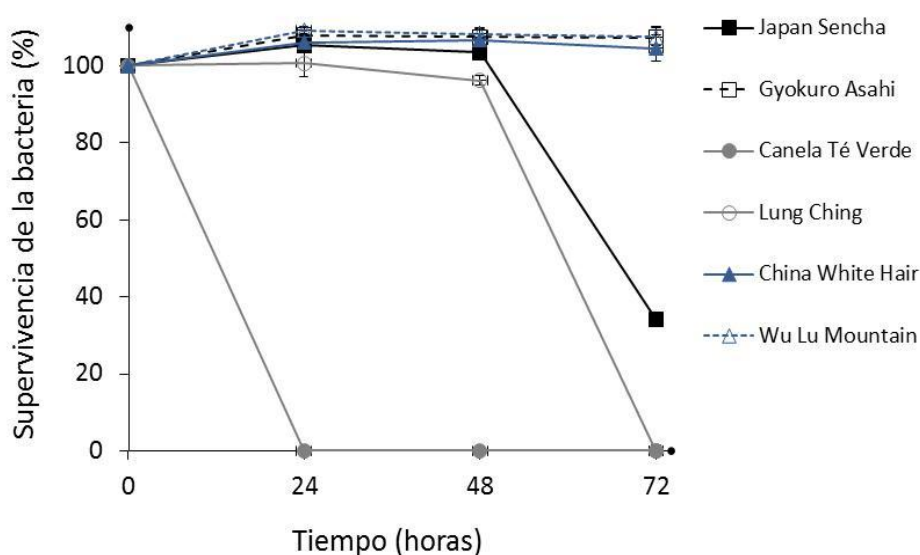


Figura 15. Supervivencia de la bacteria *B. animalis* B94 en los 6 extractos de té verde a 37 °C y en anaerobiosis. Los datos están expresados en porcentaje de supervivencia (%) (López de Lacey, Pérez Santín, López-Caballero y Montero, 2012b).

Por el contrario, *B. animalis* B94 fue la cepa que exhibió un mayor número de células viables (alrededor de 6 unidades logarítmicas) al final de las 72h de incubación en todas las variedades de té excepto en *Japan Sencha Makinohara* (dónde sus recuentos disminuyeron en 3 unidades). No se ha encontrado información acerca de la supervivencia de bacterias probióticas en extractos acuosos de té verde ya que la mayoría de las publicaciones están enfocadas a estudiar el crecimiento en alimentos que son fermentados principalmente por

bacterias probióticas, como son el yogurt, leche fermentada o soja (Champagne, 2009). Sin embargo, recientemente se han realizado estudios de supervivencia de bacterias probióticas en otros productos, como el zumo con té verde como antioxidante (Shah, Ding, Fallourd y Leyer, 2010), dónde se observó que el té verde crea un ambiente anaeróbico favorable para las bacterias probióticas debido a sus propiedades antioxidantes.

Después de evaluar la supervivencia de los probióticos, se consideró importante determinar qué polifenoles del té permiten una mayor supervivencia de estas cepas. Para la realización de este estudio se seleccionó a *B. animalis B94*, ya que es la que mejor sobrevive en el té. Para ello se incubó la bacteria probiótica a 37 °C durante 72 h en 10 soluciones salinas, las cuales contenían como única fuente de energía cada uno de los 10 tipos de polifenoles estándares seleccionados para el estudio (5 catequinas y 5 flavonoles mayoritarios del extracto de té verde). Durante la incubación de la cepa probiótica en el control (solución salina) y en los diferentes estándares de polifenoles se detectó una disminución de los recuentos a las 24 h de incubación. Tras este tiempo, los recuentos disminuyeron por debajo del control (88.73%) en todas las muestras, excepto en la catequina (98.49%), epigallocatequina (91.97%) y quercetina-3-O-galactosido (91.96%). El hecho más destacado fue que los flavonoides glicosilados prolongaron la supervivencia de las bacterias hasta pasadas las 48 h de incubación. Las enzimas β -glucosidasa, β -galactosidasa y α -ramnosidasa rompen los enlaces O-glucosídicos, galactosídicos y rhamnosídicos, respectivamente, presentes en los flavonoides glicosilados. *B. animalis B94* es capaz de producir estas enzimas durante la incubación y obtener los azúcares unidos a estos flavonoides (Schneider y cols., 1999). Por esta razón posiblemente la bacteria consigue sobrevivir más tiempo. En general, la reducción más baja en el número de células viables se detectó a las 48 h en la solución con quercetina 3-O-galactosido y kaempferol-3-O-glucosido. Por otro lado, la disminución más acusada se observó en la solución con kaempferol-3-O-rutinosido, que posee en su estructura la ramnosa. Estos resultados están en consonancia con los valores de actividad de *B. animalis B94*, ya que esta bacteria hidroliza más fácilmente los enlaces glucosídicos y galactosídicos que los ramnosídicos.

Por otro lado, las catequinas con o sin bacteria sufrieron cambios en su concentración a lo largo de la incubación a 37 °C. Los cambios observados en la concentración de la catequinas incubadas sin la bacteria se deben seguramente a la inestabilidad de estos compuestos durante las condiciones de experimentación. Algunos estudios han demostrado que las catequinas pueden sufrir cambios en su concentración debidos a su oxidación y epimerización en condiciones de pH superiores a 6 (Ananingsih, Sharma y Zhou; Neilson y cols., 2007; Roginsky y Alegria, 2005). A pesar de esto, la desaparición de las catequinas fue mayor en las

soluciones incubadas con la bacteria. La presencia de la bacteria afectó más a la concentración de las catequinas que a la de los flavonoides glicosilados. Los cambios más notables fueron en el galato de epigalocatequina (EGCG) y en epigalocatequina (EGC) (en la Figura 16).

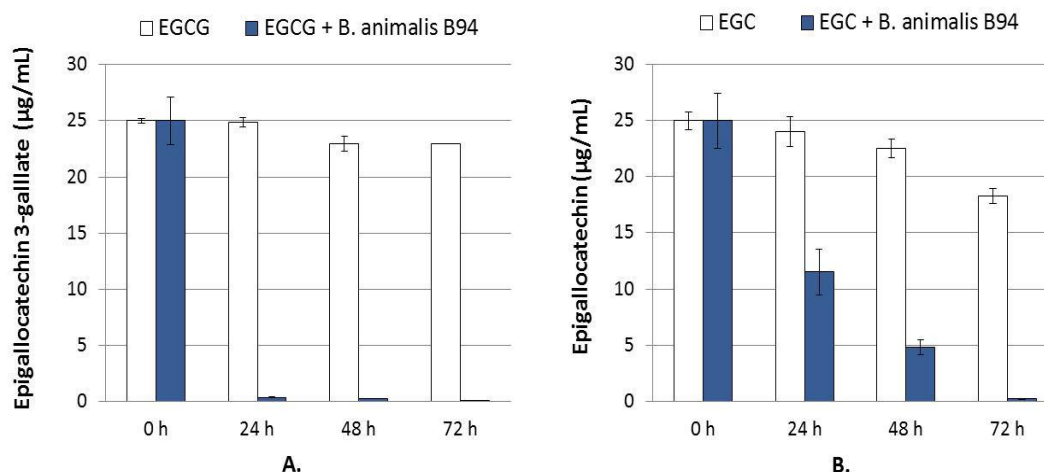


Figura 16. Comparación de la desaparición de EGCG (A) y EGC (B) en las soluciones preparadas independientemente: a) muestra control (sin bacteria) y b) en la presencia de *B. animalis* B94 (López de Lacey, Pérez Santín, López-Caballero y Montero, 2012a).

El galato de epigalocatequina desapareció después de 24 h de incubación con la bacteria, mientras que la epigalocatequina disminuyó progresivamente a lo largo de la incubación de la bacteria, y desapareció a las 72h. El resto de las catequinas analizadas no tuvieron un descenso tan drástico y se mantuvieron más o menos constante (alrededor del 50%) después de las 72 h de incubación con la bacteria. Los niveles de flavonoides glicosilados se mantuvieron a lo largo de todo el periodo y apenas se observaron cambios en la concentración (~2-5%). Este hecho indica que los flavonoides glicosilados fueron más estables que las catequinas en las condiciones de experimentación ensayadas. Sin embargo, cuando estos flavonoides se incubaron con la bacteria se detectó una bajada en la concentración, aunque en menor proporción que en las catequinas. El mayor descenso se encontró en la solución con rutina y quercetina-3-O-galactoside, lo que puede significar que *B. animalis* B94 tiene menor afinidad por estos compuestos y los transforma en menor medida.

No se encuentra una relación directa entre la desaparición de polifenoles y el número de células viables visto en el estudio de supervivencia. Donkor y Shah (2008) estudiaron la hidrólisis de los isoflavonas por *B. animalis* B94 y observó que la máxima concentración de agliconas se produjo cuando la población de células era alta.

Este mismo estudio se realizó también con el té verde (variedad *Wu Lu Mountain*) con el objeto de comprobar los cambios ocasionados por la misma bacteria probiótica en el propio extracto, con la diversidad y cantidad de polifenoles que hay en él. La concentración de los flavonoides disminuyó en todas las muestras (con o sin bacteria), pero la reducción en la concentración de los flavonoides glicosilados en el té fue mayor cuando se incubó con la bacteria *B. animalis B94*. Por otra parte, las diferencias de concentración entre los flavan-3-ol tratadas o no con la bacteria fueron menos pronunciadas, excepto en el 3-gallato de epigallocatequina. Además se encontró que los polifenoles incubados sin la bacteria fueron más inestables en el té (pH~ 5.7) que en las soluciones puras (pH >6). Suzuki y cols. (2003) observaron que la epimerización de las catequinas del té en agua destilada es menor que en la infusión de té o en soluciones buffer de pH 6.0. Posiblemente los flavan-3-ols en el té verde se transforman por la bacteria y se degradan al mismo tiempo, pero a diferente velocidad, y por eso no se detectaron tantas diferencias como en los estándares individuales. Puede ser que la velocidad de degradación de las catequinas sea mayor que la velocidad de transformación por la bacteria, por lo que la transformación de las catequinas por *B. animalis B94* está afectada por la matriz en la que está incluida. Los flavonoides glicosilados se transformaron por la bacteria *B. animalis B94*, a pesar de su baja concentración en comparación con las catequinas. En este caso, parece ser que la velocidad de degradación pudo haber sido inferior a la velocidad de transformación por la bacteria a 37 °C.

El flavonol quercetina 3-O-galactosido fue el más afectado por la presencia de la bacteria, seguido de la rutina. En cambio el kaempferol 3-O-rutinoside fue el que menos se transformó por el probiótico en comparación a los otros flavonoles. Estos resultados se deben posiblemente a la actividad enzimática de la bacteria, puesto que *B. animalis B94* posee una mayor actividad β -glucosidasa que β -galactosidasa y α -ramnosidasa.

En este trabajo también se evaluó la capacidad antioxidante (ABTS, FRAP), antihipertensiva y antimicrobiana de las soluciones estándares y del té, antes y después de ser incubada con *B. animalis B94*. La actividad antimicrobiana sólo se determinó en el extracto de té verde ya que para realizar esta medida se requerían de concentraciones de polifenoles estándares muy superiores a las utilizadas en este experimento.

A pesar de los cambios producidos en la concentración de las distintas soluciones de catequinas incubadas sin la bacteria, no se detectaron modificaciones en la actividad antioxidante medida por ABTS. Los productos formados a partir de la degradación de las catequinas presentaron en conjunto la misma actividad antioxidante que los polifenoles iniciales. La actividad antioxidante (ABTS) de las catequinas aumentó considerablemente tras

la incubación con la bacteria. En la mayoría de los casos la actividad antioxidante se incrementó a excepción del ECG, que alcanzó un 42%. Este incremento en la actividad se mantuvo constante después de 24 h de incubación. El aumento de actividad antioxidante por ABTS confirma que la bacteria transformó las catequinas en otros compuestos, ya que existe una relación directa entre la desaparición de catequinas durante la incubación con la bacteria y el incremento en la actividad antioxidante. Por otra parte, la capacidad antioxidante por ABTS de los flavonoides glicosilados fue significativamente menor que en los flavan-3-ols. Con respecto a este grupo de polifenoles, parece existir una relación entre los cambios producidos en el contenido de polifenoles y las pequeñas variaciones detectadas en la capacidad secuestradora de radicales a lo largo de las 72 h de incubación. Asimismo, la desaparición de polifenoles está más relacionada con la transformación de las formas no glicosiladas en otros metabolitos con diferente actividad antioxidante (Serra y cols., 2012). Teóricamente, la actividad de la bacteria puede transformar los flavonoides glicosilados en sus correspondientes aglicones que normalmente poseen más actividad antioxidante. De hecho, el aglicón quercetina exhibe una mayor actividad antioxidante (ABTS) que la rutina (Cai, Mei, Jie, Luo y Corke, 2006). Por lo tanto, posiblemente los aglicones se han formado previamente por la bacteria y después se han transformado en otros metabolitos, como ácidos fenilacéticos o hidroxifenilacéticos, con actividad antioxidante diferente (Aura y cols., 2002; Serra y cols., 2012).

La capacidad antioxidante medida por FRAP de las catequinas disminuyó considerablemente a lo largo de la incubación. Sin embargo, al igual que en el ABTS, la presencia de la bacteria originó un incremento en la capacidad para reducir el hierro (FRAP), (aunque algo menor si comparamos con el análisis ABTS), principalmente durante las primeras 24-48 h, lo que coincide con la concentración celular más alta. Sin embargo, el comportamiento de los flavonoles con respecto a la capacidad reductora fue un poco más heterogéneo que en el ABTS. Se detectó un aumento en la actividad antioxidante por FRAP en las soluciones incubadas con la bacteria. Este pequeño incremento demuestra que los flavonoles glicosilados se transformaron en otros metabolitos con mayor poder reductor. De hecho, algunos metabolitos como el ácido acético 2-(3,4-dihidroxifenil) producido por la degradación colónica de los flavonoides pueden exhibir una mayor capacidad reductora que la quercetina y una menor capacidad secuestradora de radicales libres (ABTS) (Dueñas, Surco-Laos, González-Manzano, González-Paramás y Santos-Buelga, 2011). En la Figura 17 se muestran los cambios producidos en la actividad antioxidante por FRAP y ABTS del EGCG y de

la rutina durante su incubación con la cepa, como ejemplos más destacados de este experimento.

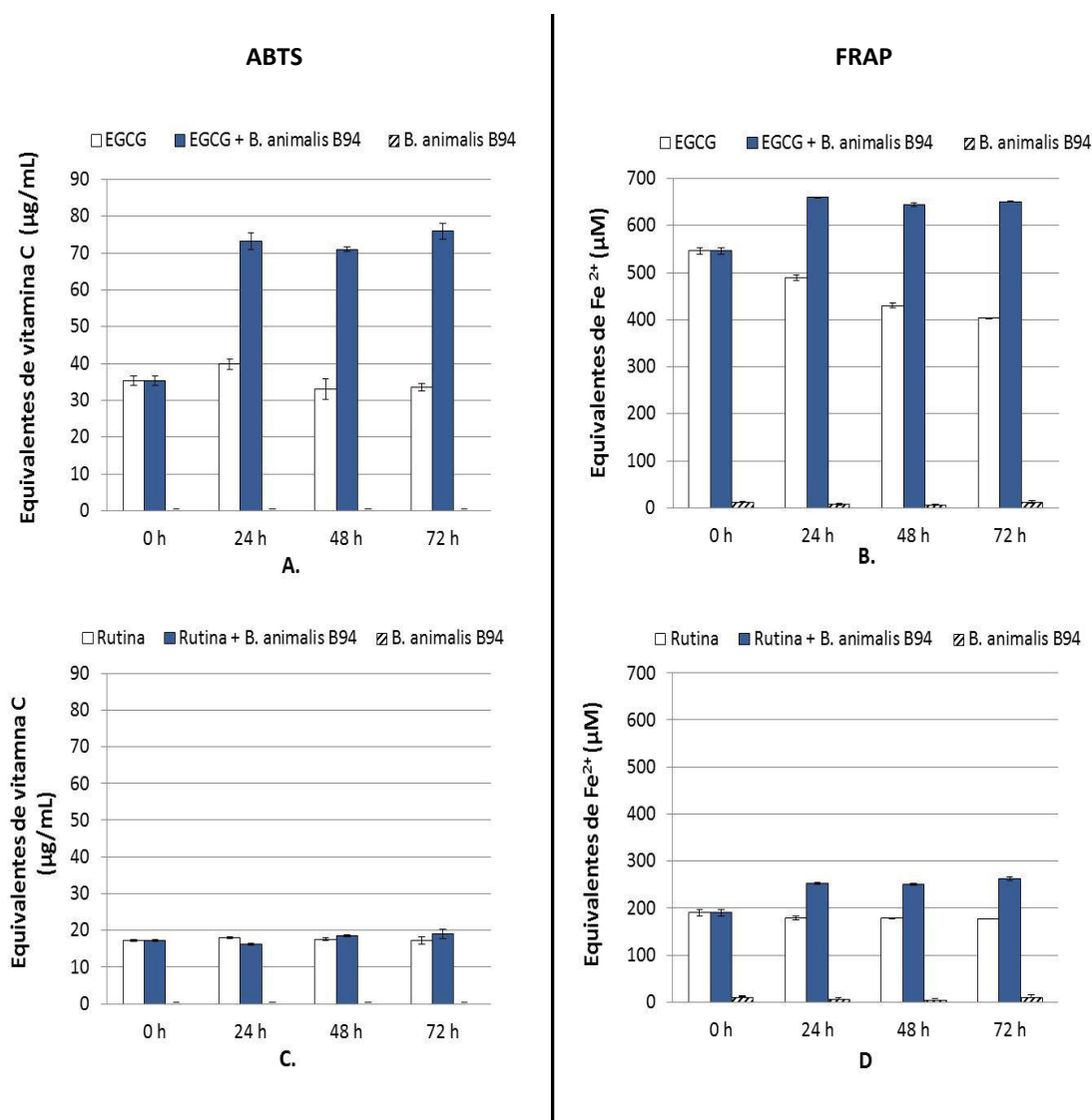


Figura 17. Comparación de los equivalentes de vitamina C (ABTS) y equivalentes de Fe²⁺ (FRAP) de las soluciones de EGCG (A y B) y rutina (C y D) preparadas independientemente: a) muestra control (sin bacteria) y b) en la presencia de *B. animalis* B94 (López de Lacey y cols., 2012b).

Este mismo estudio, pero en el extracto acuoso de té verde *Wu Lu Mountain*, dio resultados un tanto diferentes a los esperados porque la capacidad antioxidante del té, medida tanto por ABTS y FRAP, descendió en mayor proporción en las muestras que contenían la bacteria *B. animalis* B94. Posiblemente, la presencia de otros compuestos del extracto de té como metales, proteínas, carbohidratos, etc. o incluso los compuestos formados por la

actividad de la bacteria no favorecen a la actividad antioxidante de los polifenoles contenidos en el té. En este sentido, no se ha encontrado información acerca de las modificaciones producidas en la actividad antioxidante por bacterias probióticas. Sin embargo, en una publicación reciente se analizó el efecto de una enzima bacteriana sobre la actividad antioxidante de los polifenoles (Macedo, Battestin, Ribeiro y Macedo, 2011). Estos autores demostraron que el extracto de té verde tratado con tanasa (una enzima producida por *Paecilomyces variotti*) mostró una capacidad antioxidante considerablemente mayor que el extracto de té sin tratar. Esta enzima es capaz de hidrolizar el sustrato contenido en el té verde, y los productos de la hidrólisis pueden aumentar significativamente las propiedades antioxidantes del té verde.

En cuanto a la actividad antihipertensiva de los polifenoles estándares, se encontraron marcadas diferencias entre las muestras incubadas con o sin bacteria. Así, los porcentajes de inhibición de la ACE de las catequinas se incrementaron (10-27%) tras ser incubada con la cepa probiótica. La epigalocatequina y la catequina mostraron sus valores más altos entre las 48 h y las 72 h, siendo la epigalocatequina muy estable a lo largo del periodo. El dato más sorprendente fue el de la catequina, ya que este compuesto no presentó actividad antihipertensiva hasta que no se incubó con *B. animalis B94*. Los flavonoles incrementaron sus valores de inhibición en presencia de la bacteria, aunque no fue superior al de las catequinas, salvo en la rutina. Quercetina 3-O-galactoside exhibió una inhibición a las 24 h, aunque ésta fue bastante inestable y su valor disminuyó entre un 12-15% a las 48-72 h de incubación. De todos los flavonoles, el efecto antihipertensivo más alto se encontró en el kaempferol-3-O-rutinoside y en la rutina incubados con la bacteria. En este último caso se produjo un efecto similar al de la catequina ya que la rutina no mostró actividad antihipertensiva en ausencia de la bacteria. En la Figura 18 se exponen los resultados obtenidos en estos dos polifenoles, como ejemplos más llamativos de este estudio.

La transformación realizada por la bacteria *B. animalis B94* en los polifenoles del té no mejoró la capacidad inhibitoria del extracto de té dado que no hubo un aparente incremento de inhibición de la ACE en esta muestra. Sin embargo es importante destacar que esta actividad se mantuvo en la muestra con la bacteria y no se perdió, al igual que en la muestra incubada sin la bacteria.

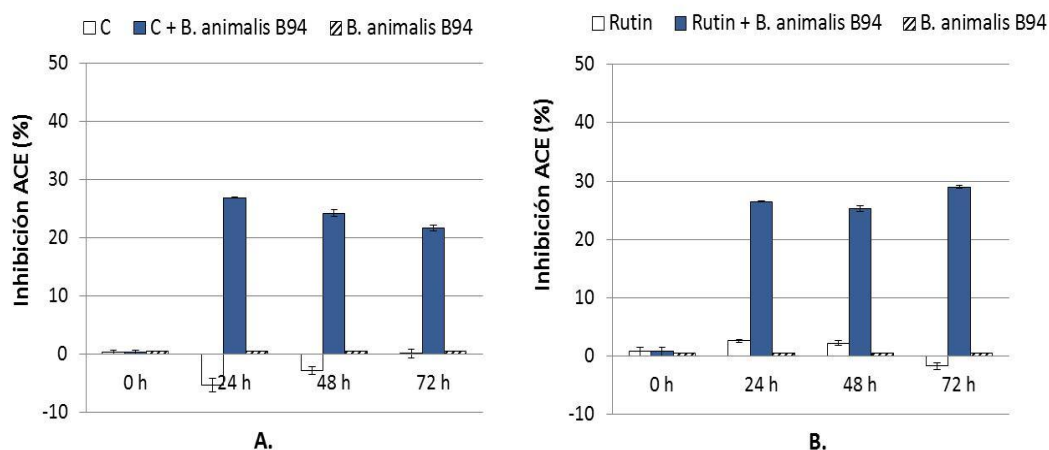


Figura 18. Comparación de la inhibición de la ACE de las soluciones de catequina (A) y rutina (B) preparados independientemente: a) muestra control (sin bacteria) y b) en la presencia de *B. animalis* B94 (López de Lacey, Pérez Santín y cols., 2012a).

La actividad antimicrobiana del extracto de té Wu Lu Mountain (incubado con o sin la bacteria) se midió frente a *V. parahaemolyticus*, *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*. La presencia de *B. animalis* B94 originó algunos cambios en la actividad antimicrobiana del extracto de té, evidenciados por un aumento en la zona de inhibición del té verde frente a *S. putrefaciens* después de las 72 h de incubación. En cambio, si se comparan las zonas de inhibición formadas para una misma cepa, se observan pocas diferencias significativas entre las muestras incubadas con o sin bacteria probiótica, con excepción de *V. parahaemolyticus* y de *S. putrefaciens*. Parece que los pequeños cambios detectados se deben a la técnica; y tal vez una técnica más precisa podría revelar más diferencias entre el extracto de té verde incubado sólo y el extracto de té verde incubado con la bacteria *B. animalis* B94. Así, por ejemplo, en el trabajo realizado por Su, Henriksson, Nilsson y Mitchell (2008) se observó un efecto sinérgico entre *L. acidophilus* L10, *B. animalis* B94 y *L. casei* L26 y un extracto de té verde ("TEAVIGO™") con respecto a la inhibición de crecimiento *in vitro* de *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Esta diferencia en los resultados se puede deber a muchos factores: la zona de inhibición varía con el té, la técnica utilizada para determinar la actividad antimicrobiana y la cepa (concentración de inóculo, el tipo, etc.).

En resumen, el té verde procedente de diferentes variedades puede ser una matriz potencial para la incorporación de bacterias probióticas. *B. animalis* B94 sobrevivió mejor en los extractos acuosos de tés verdes que en las soluciones de polifenoles estándares,

probablemente porque contienen menor cantidad de polifenoles que el té verde, además el extracto de té contiene otra serie de compuestos de los que carece la solución de polifenol estándar. La bacteria fue capaz de sobrevivir más tiempo en las soluciones con flavonoides glicosilados (24 h más que en la solución de catequinas). Las transformaciones producidas por las bacterias en las soluciones estándar dieron lugar a un aumento de las propiedades antioxidantes e inhibición de la ACE, mientras que en el extracto de té verde *Wu Lu Mountain* sólo se observó una pequeña reducción o ningún cambio en las actividades biológicas ensayadas. Son necesarios más estudios en los que se investigue sobre los metabolitos formados por las bacterias a partir de los polifenoles estándares del té para determinar la causa del incremento observado en las actividades biológicas.

4.3. BIOCONSERVACIÓN DE PRODUCTOS PESQUEROS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE PELÍCULAS COMPLEJAS CONSTITUIDAS POR PROBIÓTICOS Y EXTRACTOS DE TÉ VERDE

4.3.1. Películas complejas comestibles de agar con extracto de té verde y bacterias probióticas para aumentar la vida útil del pescado

Los resultados obtenidos en los trabajos anteriores, tales como la supervivencia de las cepas prebióticas (*Lactobacillus paracasei* LAFTI@L26 y *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* LAFTI@B94) incubadas en extracto acuoso de té verde *Wu Lu Mountain* (“*Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea*”, López de Lacey y cols., 2012) y en los flavonoides mayoritarios del té (“*Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols produced by probiotic bacteria*”, López de Lacey y cols., 2012), el aumento de la actividad antioxidante en ambos casos tras la incubación de las bacterias y la supervivencia de las bacterias lácticas en los recubrimientos y las películas durante la conservación en refrigeración (incluso tras un tratamiento de alta presión), (“*Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films*”, López de Lacey y cols., 2012), abrieron la posibilidad a un nuevo estudio combinando extractos polifenólicos de té verde con probióticos en un envase comestible.

Así pues, el objetivo de este nuevo experimento fue investigar el papel de las películas comestibles a las que se incorporó el extracto de té verde y las bacterias probióticas, y su aplicación a filetes de merluza durante la conservación en refrigeración. Previamente el pescado se inoculó con *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum* para simular el proceso de deterioro. En este ensayo se dedicó especial atención a los cambios producidos en la microbiota natural, con énfasis en la flora alterante, así como a los cambios bioquímicos acaecidos en el músculo.

Es importante señalar que es la primera vez que se diseña un envase comestible que contenga de forma conjunta bacterias probióticas y compuestos polifenólicos, del que no existen referencias previas en la literatura. Para la realización de este experimento se utilizó como matriz polimérica el agar, que permite la liberación de los compuestos fenólicos del extracto (“*Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life*”, López de Lacey y cols., 2012). Las interacciones polifenol-proteína se han referido en la literatura y también han sido objeto de estudio en la presente memoria (“*Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract*”, Giménez y cols., 2012). Si bien nuestros resultados mostraron que la presencia de gelatina en películas de agar con té verde no influye en la actividad antimicrobiana del envase ($p \leq 0.05$), la interacción entre películas de gelatina y extractos de naturaleza polifenólica procedentes de plantas ya se ha descrito anteriormente (“*Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil*”, Gómez-Estaca y cols., 2009; “*Biodegradable gelatin-chitosan film incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation*”, Gómez-Estaca y cols., 2010).

El pescado refrigerado es altamente perecedero, debido principalmente al rápido crecimiento de microorganismos presentes de forma natural en el pescado o adquirido por contaminación, lo que ocasionalmente puede suponer pérdidas económicas o incluso producir problemas de salud (Gómez-Estaca y cols., 2010). *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum* son organismos específicos del deterioro que causan, entre otros, olores desagradables en el pescado como la producción de trimetilamina a partir del óxido de trimetilamina (Dalgaard, 1995; Gram y cols., 2002). Por esta razón se han desarrollado estrategias con el fin de inhibir los microorganismos patógenos y del deterioro, entre las que se encuentran la aplicación de envases complejos a los que se incorporan compuestos polifenólicos y probióticos.

En este estudio se elaboraron 4 tipos de películas basadas en a) agar, b) agar al que se incorporó los probióticos (*L. paracasei* L26 y *B. animalis* B94), c) agar con el extracto de té verde y d) agar con el extracto de té y las bacterias probióticas ya mencionadas. Estas películas se aplicaron en merluza previamente inoculada con las bacterias *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*, y se estudió el efecto de éstas sobre los recuentos microbianos y parámetros bioquímicos de la merluza conservada en refrigeración.

Los recuentos de microorganismos en el lote control (sin película) aumentaron durante la conservación en refrigeración, con la excepción de las bacterias lácticas. Los recuentos de este grupo gradualmente disminuyeron hasta alcanzar valores muy bajos, probablemente debido a

la temperatura de refrigeración (2 ± 1 °C). Al final del periodo estudiado (15 días), los microorganismos productores de H_2S , considerados como presuntas *S. putrefaciens* (López-Caballero y cols., 2001) fueron el grupo mayoritario en la merluza control, constituyendo un porcentaje mayoritario en la flora total a 15 °C (Figura 19). La prevalencia de *S. putrefaciens* también se ha descrito con anterioridad durante la conservación de la merluza mediterránea (Baixas-Nogueras, Bover-Cid, Veciana-Nogués y Vidal-Carou, 2003).

La aplicación de películas durante la conservación de merluza, en especial aquellas que contienen té, redujeron la mayor parte de los microorganismos estudiados. Este efecto fue menor o incluso insignificante en los envases sin té (con o sin bacterias), cuyos recuentos fueron similares a los del lote control. La merluza recubierta con película y probióticos (L26 y B94) mostró un incremento en la flora láctica a los 2 días de conservación, lo que se corresponde con un incremento en la flora total (30 °C) y que se atribuyó al paso de los probióticos del envase al músculo. La reducción en los recuentos de *Enterobacteriaceae* y productores de H_2S no fue muy acusada en las primeras etapas, si bien el efecto de los probióticos frente a las mencionadas bacterias se perdió según progresa la conservación. Por el contrario, otros autores describen una importante mejora en la producción y seguridad del salami húngaro utilizando cultivos de bacterias probióticas, las mismas utilizadas en el presente trabajo (Pidcock, Heard y Henriksson, 2002). Es ese caso el salami se fermentó con los probióticos a 25 °C, seguido de maduración a 15 °C. Sin embargo, en nuestro estudio la conservación del pescado se realizó a 4 °C; las bajas temperaturas no favorecen el crecimiento de los probióticos y el desarrollo de su actividad, y por consiguiente las bacterias pudieran no estar en condiciones óptimas para ejercer su efecto sobre la flora del pescado.

Las películas con té (con o sin probióticos) redujeron o incluso inhibieron a los microorganismos estudiados. Los más sensibles fueron las colonias luminiscentes (presuntos *P. phosphoreum* (López-Caballero y cols., 2002), ya que el extracto de té verde inhibió por completo su crecimiento. Sin embargo, la flora láctica permaneció más o menos constante durante la conservación. El descenso más acusado fue el de los microorganismos productores de H_2S y la flora total a 15 °C, con reducciones de incluso 4 ciclos logarítmicos. Es interesante resaltar que en ocasiones el efecto inhibitor del extracto de té verde se pierde con el tiempo.

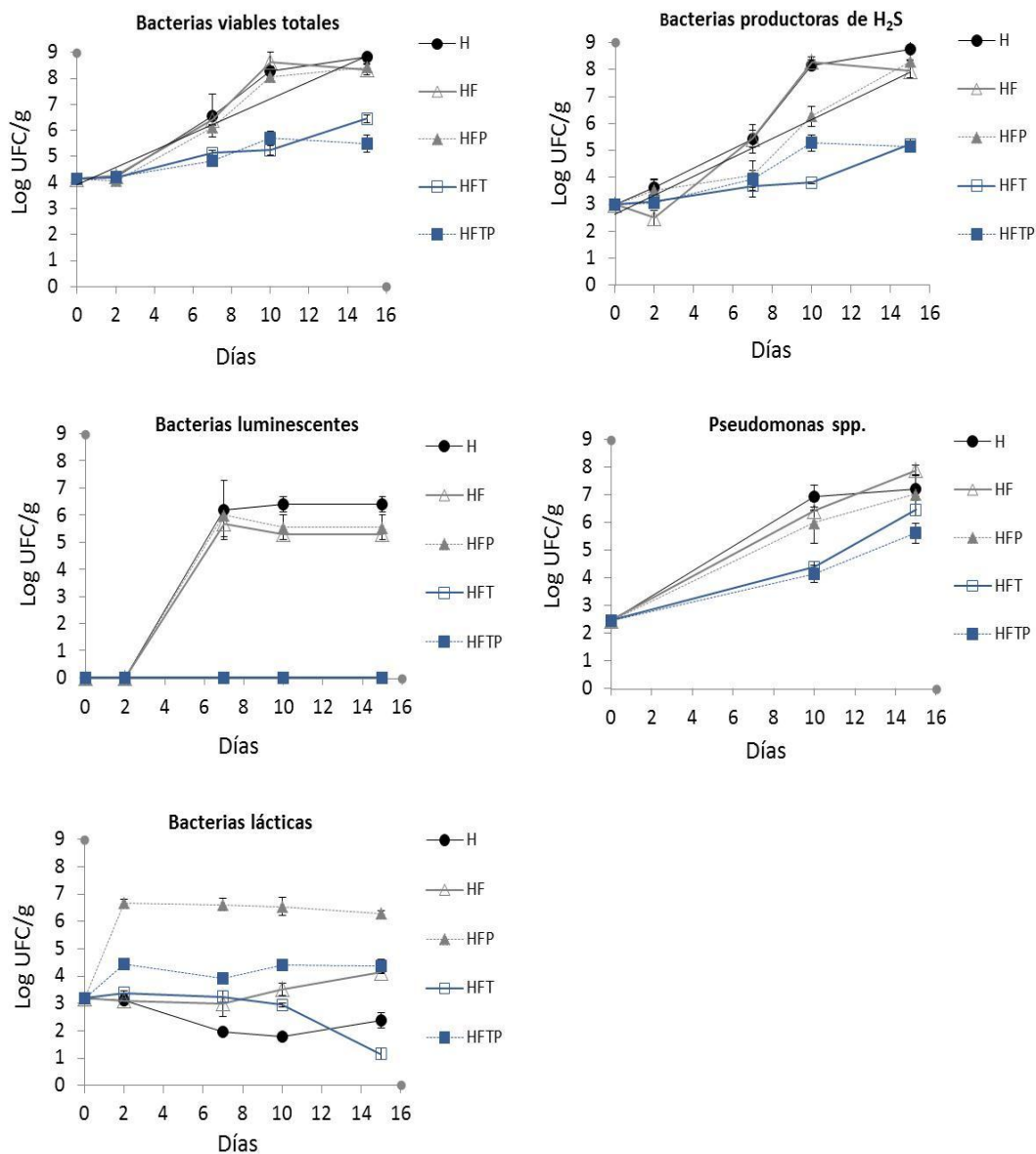


Figura 19. Recuentos microbianos (Log UFC/mL) de la merluza (H), merluza-película (HF), merluza-película + probióticos (HFP), merluza-película con extracto de té verde (HFT) y merluza-película con extracto de té verde + probióticos (HFTP) durante su conservación a 4 °C (López de Lacey, López-Caballero y Montero, 2012).

Así, la reducción en los recuentos de *Enterobacteriaceae* es mayor a los 10 días que a los 15. Este hecho puede atribuirse a que el extracto de té verde pierde actividad, si bien puede ocurrir que las cepas se adapten a los compuestos antimicrobianos del extracto de té verde y que desarrollen resistencia. Además, también pudiera suceder que las películas con extracto de té verde no inhiban a los microorganismos por encima de un nivel de crecimiento por efecto de la proliferación antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de extracto de té verde

(*Wu Lu Mountain*) incorporado a las películas de agar y/o gelatina se ha demostrado frente a bacterias Gram-negativas como *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio parahaemolyticus* (“*Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (Camellia sinensis L.) as an expression of its chemical composition*”, López de Lacey y cols., 2012). En relación a este hecho, los extractos de té verde (tanto acuosos como etanólicos) inhibieron algunos organismos Gram-positivos (incluyendo *S. aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*), pero no a los microorganismos Gram-negativos como *E. coli* o *Salmonella enterica*, (Chiu y Lai, 2010). Estos autores sostienen que cuando el extracto de té verde se incorpora a una cobertura comestible (basada en almidón de tapioca/goma de hoja *hsian-tsoa* decolorada) se aprecia una clara actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram-positivas, ya que los compuestos activos pueden migrar desde la cobertura, incrementando así el área de inhibición.

Los estudios realizados en la presente memoria demuestran que el extracto de té verde no afecta el crecimiento de *Bifidobacterium* B94 y *Lactobacillus* L26 (“*Survival and metabolic activity of probiotic in green tea*”, López de Lacey y cols., 2012). Por esa razón, los recuentos de bacterias lácticas en los lotes que contienen bacterias (con o sin extracto de té verde), deberían ser similares. Sin embargo, existen diferencias superiores a 2 unidades logarítmicas entre ellos. Podría especularse que el extracto de té verde de las películas afecta de algún modo al crecimiento de la flora láctica nativa de la merluza, pero no a los probióticos incorporados. Excepto por este hecho, la merluza cubierta con película que contiene té y probióticos presenta los menores recuentos microbianos al final de la conservación. Si bien el extracto de té verde es el principal responsable de la inhibición, la presencia conjunta de té y probióticos pudieran tener cierto efecto inhibitorio aditivo sobre el crecimiento microbiano. En la misma línea, Su, Henriksson, Nilsson y Mitchell (2008) observaron un efecto sinérgico claro entre *L. acidophilus* L10, *B. animalis* B94 and *L. casei* L26 y un extracto de té verde (“*TEAVIGO™*”), en relación a la inhibición del crecimiento *in vitro* de *S. aureus* y *S. pyogenes*. Aunque no se conocen referencias previas sobre la incorporación conjunta de extracto de té verde y probióticos en una película comestible, la relación entre probióticos y otros polifenoles está establecida. En este contexto se ha descrito que los flavonoides tienen efecto sobre la microflora intestinal, traducándose en un incremento de los recuentos de bacterias beneficiosas (*Lactobacillus rhamnosus*), aumento en la adherencia de esta bacteria en la pared intestinal e inhibición de la proliferación de enteropatógenos como *Staphylococcus aureus* o *Salmonella thyphimurium* (Parkar, Stevenson y Skinner, 2008).

En relación con los índices bioquímicos indicados en la Figura 20, los cambios en el pH no son muy evidentes durante la primera semana de conservación. A partir de ese momento, los lotes cubiertos con películas con té (con o sin bacterias) mantienen sus niveles de pH constantes (finalizando la conservación con valores cercanos a la neutralidad), mientras que el resto de los lotes sufren un aumento exponencial en los valores. Los pocos cambios acontecidos en el pH son consecuencia de los bajos recuentos observados en estas muestras, ya que la actividad microbiana se reduce por efecto del té y produciendo menor cantidad de algunos compuestos básicos que provocan un incremento en el pH (Reddy, Villanueva y Kautter, 1995). En cuanto a los compuestos volátiles básicos, la concentración se incrementó gradualmente durante la conservación en todas las muestras, excepto en la merluza cubierta con película de té (con o sin bacterias). La producción de esta fracción nitrogenada se reduce entre el 62-75% en ambos lotes comparado con el lote control a los 15 días de conservación. Estos resultados guardan relación con la capacidad antimicrobiana de estas películas. Es interesante tener en cuenta que las películas con extracto de té verde mantienen los niveles de N-BVT en merluza, por debajo del límite de aceptabilidad establecido por la Unión Europea (EEC, 1995). En relación a otro índice del deterioro, la trimetilamina, inicialmente los recuentos son < 10 mg N-TMA/100 g músculo. El mayor descenso corresponde a los lotes que contienen té en su formulación, con una reducción del 80% comparado con el lote control al final de la conservación. Para ambos índices N-TMA y N-BVT, el comportamiento de los lotes es similar hasta los 10 días, momento a partir del cual los lotes que no contienen extracto de té verde en su formulación presentaron un aumento exponencial de la concentración de aminas volátiles. Este hecho es consistente con la disminución de las bacterias productoras de H_2S y colonias luminiscentes en los lotes con té. Por lo tanto, la película de té verde parece ser la causa de la disminución en la producción de bases volátiles totales y trimetilamina causados principalmente por la inhibición o la reducción del crecimiento de bacterias como *S. putrefaciens* y *P. phosphoreum*, principales productores de estos compuestos básicos durante el deterioro del pescado (Dalgaard, 1995; López-Caballero y cols., 2005).

En cuanto al color, las muestras mantuvieron estable los valores de luminosidad (L^*) durante la conservación, y en el caso de detectarse diferencias no superaron el 10%. Los valores bajos registrados para el rojo (a^*) fueron acordes a la falta de pigmentos hemáticos, etc., característicos de la merluza. Sin embargo, cabe destacar que la aplicación de películas de té verde produjo un ligero tono amarillento/dorado apenas perceptible (b^*) en el pescado, atribuido a los polifenoles presentes en el té verde y que fue estable durante la conservación.

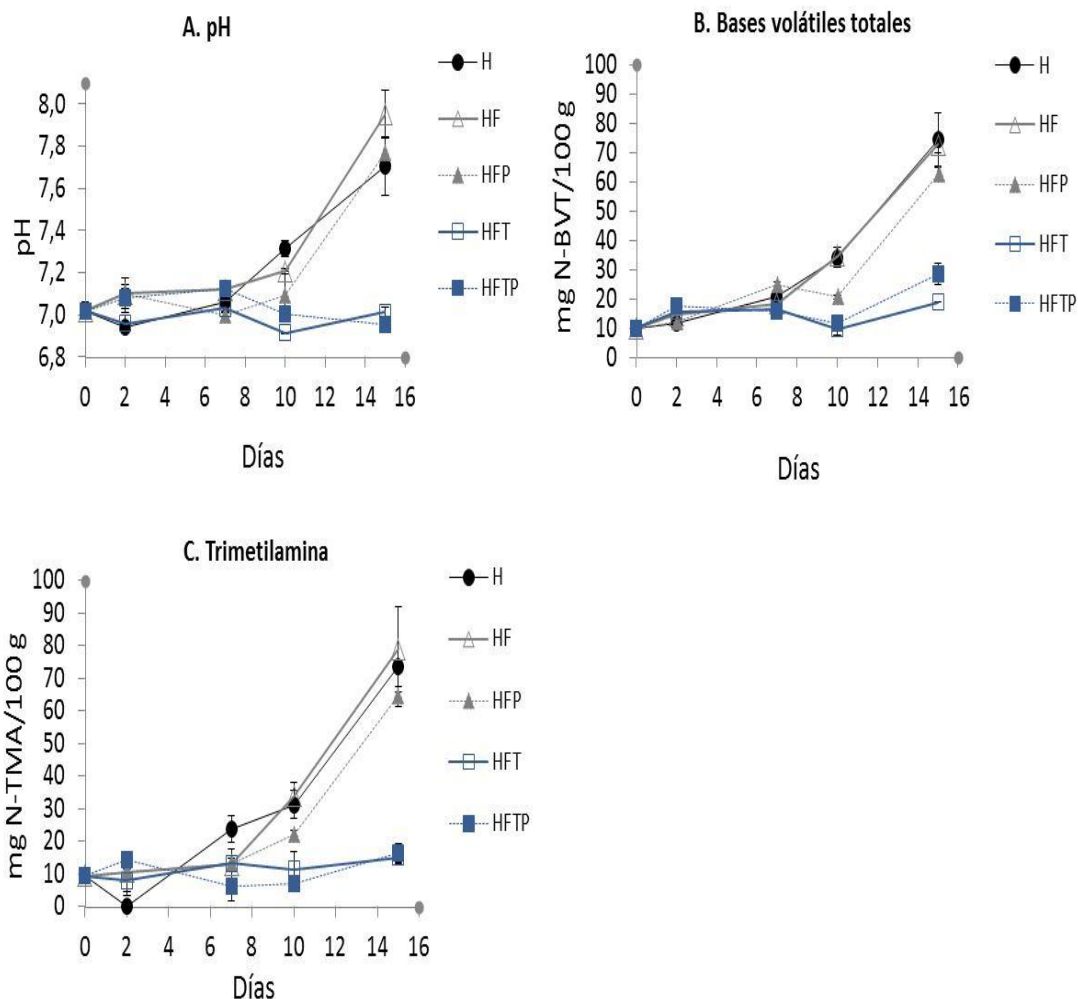


Figura 20. pH, nitrógeno básico volátil total (N-BVT) y trimetilamina (N-TMA) de la merluza (H), merluza-película (HF), merluza-película + probióticos (HFP), merluza-película con extracto de té verde (HFT) y merluza-película con extracto de té verde + probióticos (HFTP) durante su conservación a 4 °C (López de Lacey, López-Caballero y cols., 2012).

Es interesante destacar que las películas no perdieron su integridad durante todo el periodo de conservación, sirvieron como absorbedores de humedad, engrosando y, por tanto, modificando su aspecto y fueron perfectamente manipulables. A modo de ejemplo, en la Figura 21 se muestra una serie de fotografías dónde se aprecia el aspecto que tiene el pescado (atún) envuelto con las películas de agar y extracto de té verde.



Figura 21. Película de agar con extracto de té verde envuelto en pescado (atún).

En resumen, se puede concluir que la aplicación de películas con té verde retrasó o incluso previno el crecimiento de microorganismos y, consecuentemente, el de los niveles de pH, bases volátiles y trimetilamina. Las bacterias probióticas difundieron del envase al músculo, produciendo un incremento de la flora láctica incluso en presencia del extracto de té verde, si bien tuvieron poco efecto sobre los indicadores químicos del deterioro. Por ello, las películas comestibles con té verde aumentan la vida útil de la merluza y, al mismo tiempo, puede ser un vehículo para incorporar bacterias probióticas al pescado.

5. BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS PROCEDENTES DE PELÍCULAS COMESTIBLES MEDIANTE MODELOS DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL IN VITRO

Las películas comestibles se elaboran con el fin de proteger el alimento durante la conservación pero, además, pueden constituir un alimento en sí mismas por su propio diseño y características sensoriales. Las películas comestibles frecuentemente incorporan compuestos activos con diversas propiedades de protección, sensoriales, etc., y que en ocasiones ofrecen potenciales beneficios para la salud. El uso de estas películas comestibles como un vehículo para transportar y difundir estos compuestos potencialmente bioactivos no ha sido investigado hasta el momento.

En la literatura apenas se encuentran estudios sobre la digestión simulada de películas comestibles y/o sobre la liberación de compuestos activos. Sin embargo, con el fin de conservar los beneficios potenciales para la salud de los componentes bioactivos incorporados en películas comestibles es esencial conocer si se liberan durante la digestión. Sólo aquellos polifenoles que se liberan de matrices sólidas se pueden considerar bioaccesibles y potencialmente disponibles para la absorción por el tracto gastro-intestinal y, por tanto, capaz de ejercer sus efectos beneficiosos en el organismos (Tagliazucchi y cols., 2010). Otros factores de importancia que intervienen en la bioaccesibilidad de los polifenoles son todas aquellas transformaciones que pueden sufrir una vez liberados: degradación, epimerización, hidrólisis y oxidación sufridas por los polifenoles en las condiciones gastrointestinales, así como la interacción entre estos compuestos y los componentes de los alimentos, que también pueden modificar la actividad biológica de los compuestos fenólicos.

Las interacciones entre los polifenoles y algunos componentes de la dieta, por ejemplo, algunas proteínas y hierro, puede alterar las propiedades biológicas de los polifenoles y su bioaccesibilidad (Argyri, Proestos, Komaitis y Kapsokefalou, 2005). Las proteínas se pueden unir a los polifenoles y formar complejos polifenoles-proteínas por múltiples interacciones débiles (sobre todo hidrofóbica) o fuertes (enlaces covalentes) (Ishii y cols., 2008; von Staszewski y cols., 2011). Estas interacciones se ven afectadas por la naturaleza de la proteína, la temperatura del sistema y la presencia de otros componentes (von Staszewski y cols., 2011).

Para llevar a cabo este objetivo se escogió extracto acuoso de té verde (*Camellia sinensis* L, variedad *Wu Lu Mountain*), como extracto polifenólico con manifiesta actividad antioxidante y antimicrobiana. En cuanto al biopolímero, se seleccionó el agar para constituir la matriz formadora de la película. El agar constituye una matriz débilmente unida a los componentes

del té, por lo que facilita la liberación de los mismos (Objetivo 2). Además posee otra característica de gran interés, y es que no se degrada en el tracto gastrointestinal, por lo que resulta especialmente beneficioso a la hora de evaluar la liberación y accesibilidad de los compuestos activos.

El modelo gastrointestinal seleccionado posee gran parte de los factores a tener en cuenta en complejidad de enzimas, tampones, condiciones de pH, etc. También se consideró la adición de un alimento proteico, ya que en las dietas no solo se ingiere el compuesto a estudiar, sino formando parte de una ingesta, y durante la digestión pueden darse una serie de interacciones que modifiquen la accesibilidad de los compuestos a evaluar.

Como se describe en el trabajo *“Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible films during simulated human digestion”* el extracto de té verde y las películas comestibles de agar con extracto de este té se sometieron a una simulación de la digestión humana en su fase gastrointestinal (GI).

5.1. Recuperación acumulada de compuestos en el Simulador Gastro Intestinal (SGI)

5.1.1. Fenoles totales

El contenido inicial de polifenoles en la película fue de 187 mg de equivalentes de ácido gálico. Esta cantidad se consideró como el 100% de compuestos polifenoles que contiene el extracto para calcular la recuperación acumulativa en el proceso.

Durante la digestión gástrica del extracto de té se observó un incremento lineal en la recuperación de los equivalentes de ácido gálico, independientemente de la presencia de gelatina (T y TG). Sin embargo, en el caso de la digestión gástrica de las películas, en presencia o no de proteína (FTG, FT), la recuperación fue más rápida en los primeros minutos, con tendencia a disminuir significativamente a medida que avanza la digestión, especialmente en la que contiene gelatina. Es importante destacar que durante la digestión duodenal apenas se recupera nada; en esta fase de la digestión probablemente se dé un equilibrio entre la liberación y la transformación de los polifenoles una vez se han liberado, junto con la ausencia de una mayor liberación en la fase de simulación intestinal.

El porcentaje de ácido gálico recuperado durante la digestión simulada osciló entre 40 a 60%, mayor en el extracto de té ((T, TG) que en la película (FT, FTG). La presencia de gelatina no repercute en la recuperación de los polifenoles del extracto de té verde (TG); sin embargo disminuye la recuperación de fenoles totales de las películas (FTG) en aproximadamente 33%

después de 18 min, por lo que la gelatina favorece el secuestro de algunos compuestos fenólicos o al menos dificulta la liberación de estos compuestos de la película.

5.1.2. Catequinas y ácido gálico

La recuperación acumulativa de los polifenoles (catequinas, ácido gálico y flavonoles glicosilados más abundantes en el té verde) durante la digestión gastrointestinal, disminuyó significativamente, a excepción de catequina, que se recuperó en un porcentaje superior al 100%. La mayor parte de la liberación de los polifenoles de extracto de té o de la película, con o sin la gelatina (TG, T, FTG, FT), se produjo en la fase gástrica de la digestión, y prácticamente no se observó en la fase duodenal.

En contraste con el patrón descrito para la recuperación de polifenoles totales durante la digestión gástrica, las tasas de recuperación de ácido gálico y catequinas mostraron un comportamiento aleatorio, tanto en el extracto de té como en la película, independientemente de la presencia de gelatina durante la digestión. Los porcentajes de recuperación acumulada de EGC después de la digestión gastrointestinal fueron significativamente menores que los de EGCG en todas las muestras. La escasa recuperación de EGC, en comparación con EGCG, se atribuye a una mayor degradación, junto con una menor liberación del compuesto de la película. El EGC fue el compuesto que más se recuperó en todas las muestras con gelatina, aunque los valores no alcanzaron el 40%.

La recuperación tanto de EGC y EGCG fue especialmente baja en las muestras de películas con té (FT), con porcentajes de alrededor del 5% y 25% para EGC y EGCG, respectivamente.

En el caso del ácido gálico, la recuperación acumulada a partir de muestras de película fue notablemente más baja, independientemente de la presencia de gelatina (30 y 20% para FTG y FT, respectivamente). El ECG se muestra de modo diferente, ya que las infusiones y las películas recuperaron un porcentaje diferente de ECG cuando la digestión simulada se realizó en presencia de gelatina (70-80% de recuperación), si bien no sobrepasó el 40% en ausencia de gelatina. En cuanto a EC, todas las muestras presentaron una tendencia similar (80-90% de recuperación).

La recuperación de las catequinas y ácido gálico prácticamente se detiene después de la digestión gástrica simulada, al pasar las muestras a condiciones duodenales simuladas. Este hecho se atribuye a una falta de liberación adicional de la película en esa fase, o a un equilibrio entre la liberación y la transformación de los polifenoles liberados. Es bien conocida la inestabilidad de los polifenoles causada por un cambio de pH, neutro o alcalino como ocurre

después de la digestión gástrica. Los estudios de estabilidad han demostrado que catequinas del té verde pueden sufrir muchos cambios químicos, como la oxidación y la epimerización en soluciones con $\text{pH} > 6$ (Ananingsih, Sharma y Zhou, 2011; Green, Murphy, Schulz, Watkins y Ferruzzi, 2007; Neilson y cols., 2007; Roginsky y Alegria, 2005). Tagliazucchi y cols. (2010) observaron una pérdida de la bioaccesibilidad de los polifenoles totales, flavonoides y antocianinas de la uva durante un ensayo de digestión *in vitro*, que atribuyeron a la transición de condiciones desde un medio ácido en la etapa gástrica a un ambiente intestinal levemente alcalino. Por otro lado, la interacción de los polifenoles del té con las enzimas digestivas contribuyen a las pérdidas observadas en la recuperación (He, Lv y Yao, 2006). Sin embargo, otros autores afirman que las enzimas digestivas no están involucrados en la disminución de la recuperación de polifenoles (Bermúdez-Soto, Tomás-Barberán y García-Conesa, 2007; Green y cols., 2007; Neilson y cols., 2007).

La recuperación acumulada del ECG y la EC fue mayor que la de EGC y EGCG. Así, la recuperación de EGC, EGCG, ECG y EC de la película (FT) fue inferior a 5, 20, 40 y 80%, respectivamente. Este resultado está de acuerdo con la estabilidad de polifenoles en condiciones de diferentes búferes. Sang, Lee, Hou, Ho y Yang (2005) observaron que EGC y EGCG son más inestables que el ECG y la EC debido a la oxidación de la estructura tri-hidroxi en el anillo-B.

La presencia de gelatina, al parecer, permite una mayor liberación de EGC, EGCG, ácido gálico y el ECG, tanto para extracto de té (TG) como para películas con té (FTG). Ya se ha comentado la capacidad de los polifenoles para interactuar con las proteínas. Estas interacciones pueden ser a través de enlaces covalentes (Chen, Wang, Zhang, Ren y Zeng, 2011; Ishii y cols., 2008) o por enlaces hidrofóbicos e hidrógeno (von Staszewski y cols., 2011). Sin embargo, las interacciones que se establece entre los polifenoles y gelatina en este estudio parecen ser débiles, permitiendo, por tanto, una fácil liberación de polifenoles. En este sentido, otros autores han observado que cuando la proteína está muy agregada (por ejemplo, gelatina bovina), la capacidad de interactuar con polifenoles es menor que cuando la proteína está menos agregada (por ejemplo, gelatina de origen marino), permitiendo la matriz proteica una mayor liberación de compuestos fenólicos (Gómez-Estaca, Montero, Fernández-Martín y Gómez-Guillén, 2009).

Otra de las razones de la importancia de la recuperación de compuestos es que el EGC y EGCG forman complejos con la gelatina, protegiéndolos de este modo de la degradación, a pesar de que los complejos formados pueden ser débiles. Este mecanismo de protección de EGC y EGCG durante la digestión también se observó por Green y cols. (2007), cuando las

catequinas del té verde se formularon con la leche. Por otra parte, Roginsky y Alegria (2005) encontraron que la adición de leche a los extractos de té verde reduce la oxidación de los polifenoles, ya que los polifenoles enlazados a proteínas de la leche son menos accesibles para la oxidación. Por el contrario, Argyri y cols. (2005) observaron una disminución en la concentración de los compuestos fenólicos en el vino tinto después de la digestión *in vitro* con la proteína (de carne y caseína). Estas discrepancias podrían atribuirse a la distinta afinidad de ciertos polifenoles a las diferentes proteínas.

En cuanto a la catequina, el porcentaje de recuperación superó la cantidad inicial (100-140%) en todas las muestras después de la digestión. Se ha descrito que la catequina se deriva de otros compuestos fenólicos, ya sea mediante epimerización de la EC y de la hidrólisis del ECG, así como de su epímero catequina galato (CG) (R. Ito y cols., 2003). Sin embargo, de acuerdo con los porcentajes de recuperación de EC y ECG obtenidos en este estudio, este mecanismo parece poco probable.

5.1.3. Flavonoles

La recuperación de flavonoles después de la digestión simulada fue de 30 a > 70% para el extracto de té y la película. Tavares y cols. (2012) observaron recuperaciones similares de los derivados de quercetina a partir de extracto de mora después de la digestión gastrointestinal (40 -> 80%), mientras que las recuperaciones de los flavonoles después de la digestión gástrica y pancreática de jugo de frutos del bosque fue mayor (70-85%) (Bermúdez-Soto y cols., 2007).

La rutina parece ser el más estable de los flavonoles en las condiciones experimentales ensayadas, con el mayor porcentaje de recuperación (45 a 75%), mientras que la quercetina 3-glucósido presentó la menor recuperación (alrededor del 30%), especialmente en presencia de gelatina, tanto en los extractos de té como de películas (TG y FTG).

En general, la gelatina tiene un efecto negativo en la recuperación de todos los flavonoles, probablemente debido a las interacciones de proteínas y polifenoles. Por lo tanto, los extractos de té y las películas (T y FT) presentaron mayores porcentajes de recuperación, después de la digestión gástrica y duodenal, que las muestras correspondientes con gelatina: TG y FTG, respectivamente. Además, se observó un aumento lineal en la recuperación de todos los flavonoles del extracto de té, con y sin gelatina presente (T y TG), durante la digestión gástrica, mientras que la recuperación de flavonoles de las muestras de película (FTG, FT) fue más rápida al principio de la digestión, con tendencia a disminuir

significativamente con el avance de la digestión gástrica, especialmente en el caso de la película con gelatina (FTG).

Como en el caso de las catequinas, los flavonoles son altamente estable a la digestión gástrica *in vitro*, si bien se produce una degradación parcial en condiciones intestinales debido al pH neutro o ligeramente alcalino (Bermúdez-Soto y cols., 2007). La transformación de glucósidos flavonoides en agliconas durante la digestión simulada también puede contribuir a la pérdida de estos compuestos. Tarko, Duda-Chodak, Sroka, Satora y Michalik (2009) encontraron que los polifenoles de frutas seleccionadas se hidrolizaron a agliconas durante el proceso de digestión simulada, en especial la quercetina y los glucósidos cianogénicos.

5.2. Actividad antioxidante y antimicrobiana recuperada acumulativa

La capacidad antioxidante inicial del té medida por FRAP y por ABTS se expresa por la cantidad total de extracto de te verde añadido en la película: 3.77 mmol equivalentes de Fe^{2+} para FRAP y 319,5mg equivalentes de vitamina C para ABTS. Estos valores se consideraron como el 100% de FRAP y ABTS para calcular la recuperación acumulativa durante la digestión.

Los perfiles de equivalentes de Fe^{2+} y vitamina C que se recuperaron de las muestras están en consonancia con los compuestos fenólicos totales recuperados, con valores más altos en el extracto (T y TG) que en la película (FT y FTG). Hay que tener en cuenta que los tres métodos son ensayos de transferencia de electrón y miden el poder reductor de las muestras (Huang y cols., 2005). Si bien el ensayo de *Folin-Ciocalteu* o fenoles totales se ha utilizado durante muchos años como medida de los fenoles totales en productos naturales, el método en la actualidad mide la capacidad reductora de las muestras y, por tanto, puede considerarse como un ensayo de la capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante del extracto y de la película después de la digestión gastrointestinal fue inferior al 40% (siendo superior en FRAP: 25-37,5% que en ABTS: 7-17%). Esta marcada disminución de las propiedades antioxidantes de todas las muestras puede indicar la escasa liberación de los polifenoles de la matriz. La transformación (ya sea degradación, epimerización, hidrólisis o/y oxidación) durante la digestión simulada puede afectar por tanto a su actividad. Se ha sido descrito que EGCG, EGC y ECG se degradan en condiciones de pH cercanos a la neutralidad o condiciones ligeramente alcalinas, tal y como ocurre en las condiciones de digestión intestinal. Los homodímeros y heterodímeros de anillo-B son productos de oxidación formados a partir de catequinas en condiciones de digestión simulada, tal y como describe (Neilson y cols., 2007). Algunos de estos productos de oxidación

(anillos-B) muestran actividades antioxidantes igual o superior que sus catequinas precursoras (Yoshino, Suzuki, Sasaki, Miyase y Sano, 1999), lo que puede contribuir a la actividad antioxidante valorada en el digerido.

La interacción de los polifenoles con proteínas también favorece la disminución del potencial antioxidante. Arts y cols. (2002) indicaron que la actividad antioxidante de algunos componentes del té verde se enmascara debido a las interacciones con caseína y albúmina. En el presente trabajo, las propiedades antioxidantes del extracto de té verde (T) y película (FT) se afectan en presencia de gelatina durante la digestión. En el extracto de té, cuando se adiciona gelatina se aumenta la recuperación de catequinas y la actividad antioxidante. En el caso de la película con la gelatina, a pesar de una liberación importante de catequinas, no se detectó incremento de la capacidad antioxidante. A este respecto, a veces la interacción de gelatina y polifenol no necesariamente afecta de manera negativa a su capacidad de actuar como un antioxidante. De acuerdo con Almajano, Delgado y Gordon (2006) los complejos de proteínas y polifenoles aún conservan cierta actividad antioxidante cuando los grupos hidroxilo en el anillo aromático de la molécula de polifenoles, responsables de la capacidad antioxidante, no están involucrados en la interacción.

Durante la digestión de las películas se recupera mayor porcentaje de catequinas que cuando estaba presente la gelatina (FTG). Además, los polifenoles de la película, en estas condiciones (FTG), se liberan a mayor velocidad al principio de la digestión gástrica, formando complejos con la gelatina o incluso sufren modificaciones por estar expuestos durante más tiempo a la digestión. Estos complejos pueden ser reversibles o irreversibles y con una afinidad mayor o menor, dependiendo de flavonoides y la concentración de proteínas, el pH, temperatura, tipo de proteínas y polifenoles, etc. (Luck y cols., 1994; Papadopoulou y cols., 2005; von Staszewski y cols., 2011). Por lo tanto, las discrepancias entre las muestras pueden atribuirse al gran número de factores que pueden influir en los complejos con proteínas. Otro factor a tener en cuenta es la adición de proteasas (pepsina, tripsina y quimotripsina) que hidrolizan la proteína en péptidos y aminoácidos, los cuales pueden unirse a los polifenoles dando lugar a complejos menos agregados que los que se forman con la proteína no hidrolizada.

En cuanto a la **actividad antimicrobiana**, tanto del extracto de té como de la película, no se evidenció después del proceso de digestión simulada en ninguna de las etapas. El té verde *Wu Lu Mountain* mostró actividad antimicrobiana en los estudios anteriores, tanto en el extracto como en la películas de agar y agar/gelatina, sobre todo frente a *P. phosphoreum* y *S. putrefaciens* (Giménez, 2012; López de Lacey, Pérez Santín, López-Caballero y Montero, 2012),

tal como se refiere en capítulos anteriores. Los factores ya mencionados, así como la baja estabilidad de los polifenoles en el pH intestinal, junto con las interacciones proteínas-polifenoles, podrían explicar la falta de actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos del té.

Al final de la digestión gastrointestinal quedan algunos compuestos indigeribles, especialmente la matriz polimérica de agar y una cierta cantidad de material retenido del extracto de té en la película, que se evidencian por el color que conserva la película digerida.

Este residuo colónico indigerible representa los polifenoles potencialmente disponibles después de la digestión gastrointestinal, los cuales podrían ejercer algún efecto beneficioso en el colon. Okello, McDougall, Kumar y Seal (2011) observaron efectos protectores de los extracto de té verde disponibles en el colon frente a la citotoxicidad inducida en las células PC12 (utilizados como un modelo de células neuronales) del peróxido de hidrógeno y de la beta-amiloide. Según estos autores, la parte del extracto de té verde disponible en el colon resultaba escaso en compuestos flavan-3-ol y relativamente enriquecido en flavonoles, ciertos hidroxycinamatos, cafeína, teobromina y una gama de componentes fenólicos no identificados.

Durante la digestión gástrica se observó un incremento lineal de recuperación de polifenoles, tanto en el extracto de té como en la película de agar con té, si bien la pendiente e intensidad fue diferente para cada uno de los compuestos evaluados. Prácticamente no se observó variación en la simulación de la fase duodenal. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los polifenoles de té verde contenidos en las películas de agar son bioaccesibles y, por tanto, susceptibles de absorción durante la digestión humana. La actividad antioxidante que se recuperó de las películas de agar-té verde (FT) fue del 25% (potencial reductor) y 15% (capacidad de secuestrar radicales libres), probablemente debido a que no todos los polifenoles se liberan de la matriz del polímero y/o que se modifican durante el proceso de digestión. La presencia de gelatina durante la digestión de las películas de agar-té verde (FTG) puede afectar, tanto a la bioaccesibilidad, como a la eficacia de polifenoles. El extracto de té verde (con o sin gelatina) mostró una mayor actividad antioxidante que las películas. Sin embargo, las películas de agar-té verde puede tener otras propiedades y aplicaciones adicionales, como un material de envase comestible activo en contacto con los alimentos, la mejora de su calidad, vida útil y la seguridad, o incluso ser vehículo para arrastrar ciertos compuestos del extracto de té hasta el colon.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. Las películas de gelatina-quitosano con aceite esencial de clavo muestran actividad antioxidante y antimicrobiana. La interacción de estas dos matrices poliméricas mejora la integridad de la película y facilita la difusión de los compuestos activos al alimento.
2. La conservación de filetes de bacalao y salmón con películas de gelatina-quitosano redujo drásticamente la microbiota, en especial la flora Gram-negativa asociada al deterioro, con la consecuente disminución de los índices bioquímicos y aumento de vida útil.
3. Las seis variedades de té verde (*Camellia sinensis* L.) estudiadas mostraron actividades antioxidantes y antimicrobianas muy diferentes, como expresión de su composición química. La interacción de sus componentes condiciona dichas actividades y es distinta para cada variedad.
4. Las películas de agar y agar-gelatina con extracto acuoso de té verde mostraron efecto antioxidante y antimicrobiano, difundiendo los compuestos activos al alimento.
5. Los envases comestibles de gelatina son matrices adecuadas para vehiculizar bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*), las cuales permanecen viables en coberturas y películas a temperaturas de refrigeración.
6. La incorporación de bacterias lácticas a coberturas y películas comestibles de gelatina y posterior aplicación a filetes de merluza confiere estabilidad y retrasa su deterioro durante la conservación en refrigeración del pescado, en especial en tratamientos combinados con alta presión.
7. La bacteria probiótica *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis LAFTI@B94* transforma los compuestos polifenólicos del extracto del té verde, aumentando su supervivencia en presencia de flavonoles, mientras que aumenta la actividad antioxidante e hipotensora con la transformación de catequinas. Sin embargo, la incubación del extracto acuoso de té con bacterias probióticas no mejoró las propiedades biológicas del extracto.

8. La bioconservación de filetes de merluza recubiertos con películas con té verde y probióticos aumenta su vida útil por prevenir o inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes implicados en el deterioro, como *P. phosphoreum* y *S. putrefaciens* y su actividad metabólica, así como reduce la flora potencialmente patógena. Si bien este efecto inhibitor del crecimiento microbiano se atribuye principalmente al extracto de té, la incorporación de bacterias al envase produjo un efecto aditivo.

9. La bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos del extracto de té verde tras la digestión de recubrimiento de agar con extracto de té fue patente, obteniéndose un perfil de polifenoles diferentes, que manifiestan propiedades antioxidantes pero no antimicrobianas.

CONCLUSIÓN GENERAL

Es posible obtener recubrimientos comestibles con propiedades antioxidantes y antimicrobianas que aplicados a productos pesqueros estabilizan y alargan la vida útil de los mismos.

VII. CONCLUSIONS

1. The films based on gelatin-chitosan with essential oils of clove show antioxidant and antimicrobial activity. The interaction of these two polymeric matrix maintain higher integrity of the films and provide the diffusion of the active compounds to the food.
2. The preservation of cod and salmon fillets with films of gelatin-chitosan reduced drastically the spoilage, especially in the Gram negative bacteria associated to the deterioration, with the consistent decrease of the biochemist index.
3. The six varieties of green tea (*Camellia sinensis L.*) studied showed very different antioxidant and antimicrobial activity, as an expression of their different chemical composition. The interaction of their components conditions the afore-mentioned activities and is different for each one.
4. The agar and agar-gelatin films with aqueous extract of green tea showed antioxidant and antimicrobial effect, diffusing the active compounds to the food.
5. The edible packaging of gelatin is an appropriate matrix for carrying lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) that remains viable in films and coatings at refrigeration temperatures.
6. The incorporation of lactic acid bacteria to edible films and coatings based on gelatin and subsequent application to hake fillets contribute to give stability during the preservation in refrigeration of the fish, especially in combined treatments with High Pressure.
7. The probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* LAFTI@B94 transform the polyphenolic compounds of the green tea extract, increasing their survival with the greater presence of flavonols, whereas the antioxidant activity (FRAP and ABTS) and the inhibition of ACE increase, with the transformation of catequins. However, the incubation of aqueous extract of tea with probiotic bacteria does not improve the biological properties of the extract.

8. The biopreservation of hake fillets with films incorporated with green tea and probiotics increase the shelf life because it prevents or inhibits the growth of spoilage bacteria such as *P. phosphoreum* and *S. putrefaciens* and their metabolism activity. Although this effect is mainly attributed to the tea extract, the incorporation of probiotic bacteria to the packing produced an additive effect.

9. The bioaccessibility of the phenolic compounds of the green tea extract, after the digestion of tea agar-extract, was evident, obtaining a profile of different polyphenols, which show antioxidant properties but not antimicrobial properties.

GENERAL CONCLUSION

It is possible to obtain edible films and coatings with antioxidant and antimicrobial properties which applied to fishing products stabilize and extend the shelf life of them.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, K., Mustapha, A., Grün, I. U. y Fernando, L. (2000). Viability of Microencapsulated Bifidobacteria in Set Yogurt During Refrigerated Storage. *Journal of dairy science*, 83(9), 1946-1951.
- Adorjan, B. y Buchbauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: An updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407-426.
- Alcázar, A., Ballesteros, O., Jurado, J. M., Pablos, F., Martín, M. J., Vilches, J. L. y Navalón, A. (2007). Differentiation of green, white, black, Oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 5960-5965.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. y Abadias, M. (2011). Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology*, 28(1), 59-66.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P. y Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. [Article]. *Lwt-Food Science and Technology*, 44(2), 407-413. doi: 10.1016/j.lwt.2010.09.003.
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L. y Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55-63.
- Almajano, M. P., Delgado, M. E. y Gordon, M. H. (2006). Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chemistry*, 101(1), 126-130.
- Almajano, M. P., Delgado, M. E. y Gordon, M. H. (2007). Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 102(4), 1375-1382.
- Ananingsih, V. K., Sharma, A. y Zhou, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*(0). doi: 10.1016/j.foodres.2011.03.004.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. y Valdivia, E. (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. En A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp. 475-486).
- Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S. y Shimamura, T. (2004). Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(3), 277-281.
- Argyri, K., Proestos, C., Komaitis, M. y Kapsokefalou, M. (2005). Phenolic compounds in red wine digested in vitro in the presence of iron and other dietary factors. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(3), 213-222.
- Arrieta, M. P., Garrigós Selva, M. C., Jiménez Migallón, A. y Peltzer, M. A. (2011). Envases alimentarios sostenibles. *Seguridad y medio ambiente 2011* (pp. 46-56). Dep. Química Analítica Nutrición Bromatología Univ. Alicante, Alicante, España.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G. M., Voss, H. P. y Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1184-1187.
- Arvanitoyannis, I. S., Nakayama, A. y Aiba, S. (1998). Chitosan and gelatin based edible films: State diagrams, mechanical and

- permeation properties. *Carbohydrate Polymers*, 37(4), 371-382.
- Aura, A.-M. (2005). In vitro digestion models for dietary phenolic compounds. Tesis doctoral, Department of Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Espoo, Finland.
- Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 407-429.
- Aura, A. M., O'Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimiä, R., Poutanen, K. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1725-1730.
- Ávila, M., Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., Peláez, C., Requena, T. y Pascual-Teresa, S. d. (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus. *Food Research International*, 42(10), 1453-1461.
- Avila, M., Jaquet, M., Moine, D., Requena, T., Peláez, C., Arigoni, F. y Jankovic, I. (2009). Physiological and biochemical characterization of the two alpha-L-rhamnosidases of Lactobacillus plantarum NCC245. [Article]. *Microbiology-Sgm*, 155, 2739-2749. doi: 10.1099/mic.0.027789-0.
- Ayres, J. C. (1959). Use of coating materials or film impregnated with chlortetracycline to enhance color and storage life of fiesh beef. *Food Technology*, 13, 512-515.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T. y Vidal-Carou, M. C. (2003). Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean hake spoilage. *European Food Research and Technology*, 217(2), 164-167.
- Baker, R. A., Baldwin, E. A., y Nisperos-Carriedo, M. O. 1994. Edible coatings and films for processed foods. En Krochta, J.M., Balwin, E. A. and Nisperos-Carriedo M.O. (Eds.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, p. 89-104. Lancaster, Basel: Technomic Publishing.
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O. y Baker, R. A. (1995). Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 509-524.
- Banerjee, R. y Chen, H. (1995). Functional Properties of Edible Films Using Whey Protein Concentrate. *Journal of dairy science*, 78(8), 1673-1683. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76792-3.
- Banker, G. S., Gore, A. Y. y Swarbrick, J. (1966). Water vapour transmission properties of free polymer films. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 18(7), 457-466.
- Beekwilder, J., Marcozzi, D., Vecchi, S., de Vos, R., Janssen, P., Francke, C. y Hall, R. D. (2009). Characterization of Rhamnosidases from Lactobacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(11), 3447-3454. doi: 10.1128/aem.02675-08.
- Ben, A. y Kurth, L. B. (1995). Edible film coatings for meat cuts and primal meat 95.The Australian Meat Industry Research Conference, CSIRO, 10-12 September.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. y Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149-154.
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A. y García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865-874.

- Bertan, L. C., Tanada-Palmu, P. S., Siani, A. C. y Grosso, C. R. F. (2005). Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 73-82.
- Beuchat, L. R. y Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43(1), 134-142.
- Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H. L. y Winter, J. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochemical Journal*, 248(3), 953-956.
- Bolling, B. W., Chen, C. Y. O. y Blumberg, J. B. (2009). Tea and health: Preventive and therapeutic usefulness in the elderly? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12(1), 42-48.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 11.
- Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawat, P. y Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of plasticizer type and concentration on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *Food Science and Technology International*, 12(2), 119-126.
- Brandenburg, A. H., Weller, C. L. y Testin, R. F. (1993). Edible Films and Coatings from Soy Protein. *Journal of Food Science*, 58(5), 1086-1089. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb06120.x
- Braune, A. y Blaut, M. (2011). Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium. *Environmental Microbiology*, 13(2), 482-494.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- Cabrera, C., Artacho, R. y Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea - A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- Cai, Y. Z., Mei, S., Jie, X., Luo, Q. y Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872-2888.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N. y Flores, S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875. doi: 10.1007/s11947-010-0434-1.
- Canillac, N. y Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261-268.
- Carson, C. F., Mee, B. J. y Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920. doi:10.1128/aac.46.6.1914-1920.2002.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. y Gibbs, P. (2004). Effects of Various Sugars Added to Growth and Drying Media upon Thermotolerance and Survival throughout Storage of Freeze-Dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 20(1), 248-254.
- Carvalho, R. A., Sobral, P. J. A., Thomazine, M., Habitante, A. M. Q. B., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C. y Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 22(6), 1117-1123.
- Catherine, C. y Susan, S. (2002). Application Of Edible Coatings On Muscle Foods *Protein-Based Films and Coatings*: CRC Press.

- Catherine Nettles, C. (2006). Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*, 74(1), 131-142. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.04.023
- Cervato, G., Cazzola, R. y Cestaro, B. (1999). Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(4), 291-296.
- Ceylan, E. y Fung, D. Y. C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12(1), 1-55.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. y Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2), 130-135.
- Costa, L. M., Gouveia, S. T. y Nobrega, J. A. (2002). Comparison of heating extraction procedures for Al, Ca, Mg, and Mn in tea samples. *Analytical Sciences*, 18(3), 313-318. doi: 10.2116/analsci.18.313.
- Coupland, J. N., Shaw, N. B., Monahan, F. J., Dolores O'Riordan, E. y O'Sullivan, M. (2000). Modeling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *Journal of Food Engineering*, 43(1), 25-30.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L. y Guilbert, S. (1997). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 622-626.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L. y Guilbert, S. (1998). Packaging films based on myofibrillar proteins: Fabrication, properties and applications. *Nahrung - Food*, 42(3-4), 260-263.
- Cushnie, T. P. T. y Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99-107. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014.
- Cha, D. S. y Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 223-237. doi: 10.1080/10408690490464276.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. y Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzgium aromaticum L. Myrtaceae): A short review. *Phytotherapy Research*, 21(6), 501-506.
- Champagne, C. P. (2009). Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Foods. In D. Charalampopoulos & R. A. Rastall (Eds.), *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (pp. 761-804): Springer New York.
- Chapman, S., Potter, L. (2004). Edible films and coatings: a review. *Campdem & Chorleywood. Food Research Asociation Group. Review Nº 45*.
- Chen, C. S., Liao, W. Y. y Tsai, G. J. (1998). Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection*, 61(9), 1124-1128.
- Chen, R., Wang, J.-B., Zhang, X.-Q., Ren, J. y Zeng, C.-M. (2011). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) induced intermolecular cross-linking of membrane proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(2), 343-349. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.033.
- Chi, S., Zivanovic, S. y Penfield, M. P. (2006). Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on Bologna - Active compounds and sensory attributes. *Food Science and Technology International*, 12(2), 111-117. doi: 10.1177/1082013206063845.

- Chick, J. y Ustunol, Z. (1998). Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*, 63(6), 1024-1027.
- Chinnam, N., Dadi, P. K., Sabri, S. A., Ahmad, M., Kabir, M. A. y Ahmad, Z. (2010). Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(5), 478-486. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.03.009.
- Chiu, P. E. y Lai, L. S. (2010). Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), 23-30. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.010.
- Cho, S. Y. y Rhee, C. (2002). Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *LWT - Food Science and Technology*, 35(2), 151-157.
- Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. I., Wu, J. C. G. y Lin, J. G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936.
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan van den Beuken, E. y Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19(Suppl. 1), S99-S108. doi: 10.1016/j.tifs.2008.09.011.
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 319-333.
- Dallan, P. R. M., Moreira, P. D. L., Petinari, L., Malmonge, S. M., Beppu, M. M., Genari, S. C. y Moraes, A. M. (2007). Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan membrane properties. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 80(2), 394-405.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M. y Qi, P. (2009). Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 25-56): Springer New York.
- Davidson, P. M., Post, L. S., Bramen, A. L., & McCurdy, A. R. (1983). Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In A. L. Branen & P. M. Davidson (Eds.), *Antimicrobials in Foods*, (pp. 371-419). New York: Marcel Dekker Inc.
- Davis, D. H., Elson, C. M. y Hayes, E. R. (1989). N,O-Carboxymethyl chitosan, a new water soluble chitin derivative. In T. A. G. Skjak-Braek, and P. Sandford (Ed.), *Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. (pp. 467-472.). New York.: Elsevier.
- Deans, S. G. y Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165-180. doi: 10.1016/0168-1605(87)90034-1.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A. y Voilley, A. (1998). Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 299-313. doi: 10.1080/10408699891274219.
- Debeaufort, F. y Voilley, A. (2009). Lipid-Based Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 135-168): Springer New York.
- Del Campo, J., Amiot, M. J. y Nguyen-The, C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63(10), 1359-1368.
- Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E. J., Brighenti, F. y Crozier, A.

- (2004). HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2807-2815. doi: 10.1021/jf0354848.
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N. y Gómez-Guillén, M. C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2094-2101. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.03.007.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. y Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.07.002
- Donkor, O. N. y Shah, N. P. (2008). Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Science*, 73(1), M15-M20.
- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Duan, J., Cherian, G. y Zhao, Y. (2010). Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chemistry*, 119(2), 524-532.
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M. y Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology*, 232(1), 103-111.
- Dufresne, C. J. y Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(7), 404-421. doi: 10.1016/s0955-2863(01)00155-3.
- Durango, A. M., Soares, N. F. F. y Andrade, N. J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17(5), 336-341. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.10.024.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F. y Nabavi, S. M. (2009). Essential oil composition and antioxidant activity of *Pterocarya fraxinifolia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(13), 957-963.
- EEC (1995). European Economic Commission. Determinación de la conetración de bases nitrogenadas volátiles (NBVT) en pescados y productos de la pesca procedimiento de referencia. Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° L 97:84-7.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. y Boulet, M. (1991a). Chitosan Coating Effect on Storability and Quality of Fresh Strawberries. *Journal of Food Science*, 56(6), 1618-1620. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb08655.x.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. y Boulet, M. (1991b). USE of CHITOSAN COATING to REDUCE WATER LOSS and MAINTAIN QUALITY of CUCUMBER and BELL PEPPER FRUITS. *Journal of Food Processing and Preservation*, 15(5), 359-368. doi: 10.1111/j.1745-4549.1991.tb00178.x.
- Emiroglu, Z. K., Yemis, G. P., Coskun, B. K. y Candogan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283-288. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.04.016.
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S. y Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 58-65. doi: 10.1016/j.lwt.2005.07.010.

- Fernández-Cáceres, P. L., Martín, M. J., Pablos, F. y González, A. G. (2001). Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4775-4779.
- Fernández Pan, I. y Maté Caballero, J. I. (2011). Películas y recubrimientos comestibles como herramienta emergente para la industria alimentaria *Los retos actuales de la Industria alimentaria* (pp. 27-50). Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz.
- Fernández, P. L., Pablos, F., Martín, M. J. y González, A. G. (2002). Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 76(4), 483-489.
- Ferreira, C. O., Nunes, C. A., Delgado, I. y Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807-813.
- Franssen, L. R. y Krochta, J. M. (2003). Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. In S. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 250-262): CRC Press.
- Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 116-134.
doi: 10.1002/mnfr.200600173
- Friedman, M. y Juneja, V. K. (2010). Review of Antimicrobial and Antioxidative Activities of Chitosans in Food. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1737-1761.
- Gadang, V. P., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. y Owens, C. (2008). Evaluation of Antibacterial Activity of Whey Protein Isolate Coating Incorporated with Nisin, Grape Seed Extract, Malic Acid, and EDTA on a Turkey Frankfurter System. *Journal of Food Science*, 73(8), M389-M394. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00899.x
- Gallaher, D. D., Gallaher, C. M., Mahrt, G. J., Carr, T. P., Hollingshead, C. H., Hesslink Jr, R. y Wise, J. (2002). A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(5), 428-433.
- Gallaher, R. N., Gallaher, K., Marshall, A. J. y Marshall, A. C. (2006). Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(SUPPL.), S53-S57.
- García-Díaz, G. y Macías-Matos, C. (2008). Temas de Higiene de los alimentos. In A. Caballero (Ed.), *Peligros toxicológicos de los envases plásticos*. (Vol. Capítulo 11, pp. 154). Ciencias médicas La Habana (Cuba).
- García, M. A., Martino, M. N. y Zaritzky, N. E. (1998). Starch-based coatings: Effect on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(3), 411-420.
- García, M. A., Martino, M. N. y Zaritzky, N. E. (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65(6), 941-947.
- García, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N. y Zaritzky, N. E. (2004). Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56(3), 339-345.
- García, T., Martín, R., Sanz, B., Hernández, P-E. (1995). Revisión: Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 35(1), 1-18.
- Gennadios, A., Hanna, M. A. y Kurth, L. B. (1997). Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 30(4), 337-350. doi: 10.1006/fstl.1996.0202

- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L. y Krochta, J. M. (1994). Edible coatings and films based on proteins. In E. A. B. J.M. Krochta, and M. Nisperos-Carriedo (Ed.), *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 207-278). Technomic Publishing, Lancaster, PA.
- Gholivand, M. B., Rahimi-Nasrabadi, M., Batooli, H. y Ebrahimabadi, A. H. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 24-28.
- Gialamas, H., Zinoviadou, K. G., Biliaderis, C. G. y Koutsoumanis, K. P. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10), 2402-2408. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.020.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota - introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P. y Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 83-92.
- Gill, A. O. y Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 170-174.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C. y Montero, M. P. (2009). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 585-592.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J. y Montero, P. (2012). Role of sepiolite in the release of active compounds from gelatin-egg white films. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 475-486.
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., Montero, P. (2012). Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. Aceptado en el *Food Hydrocolloids*.
- Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M. C., Alemán, A. y Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1), 18-25.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P. y Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 78-85.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., Fernández-Martín, F. y Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1461-1469. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.01.007.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2009). Antimicrobial Activity of Composite Edible Films Based on Fish Gelatin and Chitosan Incorporated with Clove Essential Oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 46-52. doi: 10.1080/10498850802581252.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C. y Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F. y Gómez-Guillén, M. C. (2009). Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A

- comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 480-486.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B. y Gómez-Guillén, M. C. (2007). Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105(2), 511-520.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. y Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007.
- Gontard, N., Guilbert, S. y Cuq, J.-L. (1993). Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film. *Journal of Food Science*, 58(1), 206-211. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb03246.x.
- Gontard, N. y Ring, S. (1996). Edible Wheat Gluten Film: Influence of Water Content on Glass Transition Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3474-3478.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B. y Guilbert, S. (1996). Influence of Relative Humidity and Film Composition on Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1064-1069. doi: 10.1021/jf9504327.
- Gounga, M. E., Xu, S.-Y. y Wang, Z. (2010). Film forming mechanism and mechanical and thermal properties of whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan content. *Journal of Food Biochemistry*, 34(3), 501-519. doi: 10.1111/j.1745-4514.2009.00294.x.
- Goze, I., Alim, A., Cetinus, S. A., Çetin, A., Durmus, N., Atas, A. T. y Vural, N. (2010). In vitro antimicrobial, antioxidant, and antispasmodic activities and the composition of the essential oil of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Letswaart. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 705-709.
- Gradišar, H., Pristovšek, P., Plaper, A. y Jerala, R. (2007). Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(2), 264-271.
- Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, 21(3), 334-350.
- Gram, L. y Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121-137.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. y Givskov, M. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2), 79-97.
- Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M. y Korczak, J. (2006). Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 351-362. doi: 10.1002/ejlt.200500330.
- Gramza, A. y Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science and Technology*, 16(8), 351-358.
- Green, R. J., Murphy, A. S., Schulz, B., Watkins, B. A. y Ferruzzi, M. G. (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(9), 1152-1162.
- Guilbert, S., Gontard, N. y Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 29(1-2), 10-17. doi: 10.1006/fstl.1996.0002.

- Guilbert, S. y Gontard, N. (1995). Edible and biodegradable food packaging. In J. M. Ackermann P, Ohlsson T (Ed.), *Foods and Packaging Materials-Chemical Interactions* (pp. 159-168). England: The Royal Society of Chemistry.
- Guilbert, S. y Graille, J. (1994). Biomateriaux et molecules. In G. J. (Ed.), *Valorisations Non-Alimentaires des Grandes Production Agricoles. Les colloques 71* (pp. 195-206). Paris, France: INRA Editions.
- Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391. doi: 10.1007/s00204-011-0774-2.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.
- Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J. y Xin, W. (1999). ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1427(1), 13-23.
- Gutiérrez-Larrazar, M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García-Armesto, M. R. y del Valle, P. (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 26(2), 555-563.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. y Aruoma, O. I. (1995). Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(1-2), 7-20.
- Hamilton-Miller, J. M. T. (1995). Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11), 2375-2377.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. y Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x.
- Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y. y Nakayama, T. (1999). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63(12), 2252-2255. doi: 10.1271/bbb.63.2252.
- He, Q., Lv, Y. y Yao, K. (2006). Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101(3), 1178-1182.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J. y Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 235-244. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00609-2.
- Hernández, E. (1994). Edible coatings from lipids and resins. In B. E. A. Krochta JM, Nisperos-Carriedo M, Editors (Ed.), *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 279-304): Technomic Pub Co. Lancaster Pa.
- Higdon, J. V. y Frei, B. (2003). Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89-143.
- Holst, B. y Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 73-82. doi: 10.1016/j.copbio.2008.03.003.
- Hong, Y. H., Lim, G. O. y Song, K. B. (2009). Physical Properties of Gelidium corneum-Gelatin Blend Films Containing Grapefruit Seed Extract or Green Tea Extract and Its Application in the Packaging of Pork Loins. *Journal of Food Science*, 74(1), C6-C10. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00987.x.
- Hosseini, M. H., Razavi, S. H. y Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food*

- Processing and Preservation*, 33(6), 727-743.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856. doi: 10.1021/jf030723c.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1), 1-12. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.036.
- Huss, H. H., Jeppesen, V. F., Johansen, C. y Gram, L. (1995). Biopreservation of Fish Products—A Review of Recent Approaches and Results. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 5-26. doi: 10.1300/J030v04n02_02.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. y Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012.
- Ioannis, A. (2002). Formation And Properties Of And Gelatin Films And Coatings *Protein-Based Films and Coatings*: CRC Press.
- Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Akagawa, M. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(10), 1384-1394.
- Isigaki, K., Takakuwa, T. y Takeo, T. (1991). Anti-diabetes mellitus effect of water-soluble tea polysaccharide. In Proceedings of international symposium on tea science (1991), Shizuka, Japan: The Organizing Committee of ISTS. pp. 240-241.
- Iten, F., Saller, R., Abel, G. y Reichling, J. (2009). Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of thymus vulgaris - Chemotype carvacrol. *Planta Medica*, 75(11), 1231-1236.
- Ito, M., Murakami, K. y Yoshino, M. (2005). Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 43(3), 461-466. doi: 10.1016/j.fct.2004.11.019.
- Ito, R., Yamamoto, A., Kodama, S., Kato, K., Yoshimura, Y., Matsunaga, A. y Nakazawa, H. (2003). A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chemistry*, 83(4), 563-568.
- Iwami, K., Hattori, M. y Ibuki, F. (1987). Prominent antioxidant effect of wheat gliadin on linoleate peroxidation in powder model systems at high water activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(4), 628-631. doi: 10.1021/jf00076a046.
- Jeon, Y. J., Kamil, J. Y. V. A. y Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5167-5178.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A. y Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6303-6307.
- Jung, H. (2002). Protein- Based Edible Films And Coatings Carrying Antimicrobial Agents *Protein-Based Films and Coatings*: CRC Press.
- Kamper, S. L. y Fennema, O. (1985). Use of an edible film to maintain water-vapor gradients in foods. *Journal of Food Science*, 50(2), 382-384.
- Karori, S. M., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K. y Ngure, R. M. (2007). Antioxidant capacity of different types of tea products. *African Journal of Biotechnology*, 6(19), 2287-2296.
- Kester, J. J. y Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings - a review. *Food Technology*, 40(12), 47-59.
- Ki Myong, K., Jeong Hwa, S., Sung-Koo, K., Weller, C. L. y Hanna, M. A. (2006). Properties of chitosan films as a function of pH and

- solvent type. *Journal of Food Science*, 71(3), E119-E124.
- Kim, K. M., Lee, B.-Y., Kim, Y. T., Choi, S.-G., Lee, J., Cho, S. Y. y Choi, W.-S. (2006). Development of antimicrobial edible film incorporated with green tea extract. *Food Science and Biotechnology*, 15(3), 478-481.
- Kim, K. W. y Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. [Article]. *Food Chemistry*, 101(1), 308-313. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.038.
- Kim, W. S., Tanaka, T., Kumura, H. y Shimazaki, K. (2002). Lactoferrin-binding proteins in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 80(1), 91-94. doi: 10.1139/o01-226.
- Komes, D., Horžić, D., Belščak, A., Ganić, K. K. y Vulić, I. (2010). Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43(1), 167-176.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. y Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
- Kramer, M. E. (2009). Structure and Function of Starch-Based Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 113-134): Springer New York.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K. P. y Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 373-386.
- Krochta, J. M. y De Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. [Review]. *Food Technology*, 51(2), 61-74.
- Krochta, J. M. y Baldwin, E. A. (1994). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*: Lancaster, PA: Technomic Public Company.
- Ku, K. J., Hong, Y. H. y Song, K. B. (2008). Mechanical properties of a Gelidium corneum edible film containing catechin and its application in sausages. *Journal of Food Science*, 73(3), C217-C221. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00700.x.
- Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. y Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104(12), 6017-6084.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
- Lárez Velásquez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1-22.
- Lee, J.-E., Lee, B.-J., Chung, J.-O., Hwang, J.-A., Lee, S.-J., Lee, C.-H. y Hong, Y.-S. (2010). Geographical and Climatic Dependencies of Green Tea (*Camellia sinensis*) Metabolites: A ¹H NMR-Based Metabolomics Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10582-10589. doi: 10.1021/jf102415m.
- Lee, S. Y. y Krochta, J. M. (2002). Accelerated Shelf Life Testing of Whey-Protein-Coated Peanuts Analyzed by Static Headspace Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2022-2028. doi: 10.1021/jf010501j.
- Lee, S. Y., Trezza, T. A., Guinard, J. X. y Krochta, J. M. (2002). Whey-Protein-Coated Peanuts Assessed by Sensory Evaluation and Static Headspace Gas Chromatography. *Journal of Food Science*, 67(3), 1212-

- 1218.doi:10.1111/j.13652621.2002.tb09479.x.
- Leroi, F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27(6), 698-709. doi: 10.1016/j.fm.2010.05.016.
- Leroi, F., Arbey, N., Joffraud, J.-J. y Chevalier, F. (1996). Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *International Journal of Food Science & Technology*, 31(6), 497-504. doi: 10.1046/j.1365-2621.1996.00366.x.
- Lewis, Y. S. (1984). Spices and Herbs for the Food Industry. Food Trade Press, Orpington, 1984.
- Lin, J. K., & Liang, Y. C. (2000). Cancer chemoprevention by tea polyphenols. *Proceedings of National Science Council ROC (B)*, 24(1), 1-13.
- Lin, L. Z., Chen, P. y Harnly, J. M. (2008). New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8130-8140.
- Lis-Balchin, M., Deans, S. G. y Eaglesham, E. (1998). Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2), 98-104.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X. y Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 147-155. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022.
- López-Caballero, M. E., Álvarez Torres, M. D., Sánchez-Fernández, J. A. y Moral, A. (2002). *Photobacterium phosphoreum* isolated as a luminescent colony from spoiled fish, cultured in model system under controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*, 215(5), 390-395.
- López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M. y Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 303-311. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.06.006.
- López-Caballero, M. E., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M. D. C. y Montero, P. (2007). Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9), 1029-1038.
- López-Caballero, M. E., Pérez-Mateos, M., Montero, P. y Borderías, A. J. (2000). Oyster preservation by high-pressure treatment. *Journal of Food Protection*, 63(2), 196-201.
- López-Caballero, M. E., Sánchez-Fernández, J. A. y Moral, A. (2001). Growth and metabolic activity of *Shewanella putrefaciens* maintained under different CO₂ and O₂ concentrations. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 277-287.
- López De Dicastillo, C., Nerín, C., Alfaro, P., Catalá, R., Gavara, R. y Hernández-Muñoz, P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7832-7840.
- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C. y Montero, P. (2012). Functionality of lactic acid bacteria incorporated to edible coatings and films. Enviado al *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2012). Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. Enviado al *Food Microbiology*.
- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of green tea (*Camellia sinensis* L.) as an expression of its chemical composition. Enviado al *LWT-Food Science and Technology*.

- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2012a). Biotransformation and resulting biological properties of green tea polyphenols produced by probiotic bacteria. Enviado al *Journal Agricultural and Food Chemistry*.
- López de Lacey, A. M., Pérez Santín, E., López-Caballero, M. E. y Montero, P. (2012b). Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. Enviado al *LWT-Food Science and Technology*.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. y Nerin, C. (2007). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8814-8824. doi: 10.1021/jf071737b.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37(2), 357-371.
- Macedo, J. A., Battestin, V., Ribeiro, M. L. y Macedo, G. A. (2011). Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 491-497. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.026
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. y Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19. doi: 10.1016/j.aca.2008.02.047.
- Mandalari, G., Tomaino, A., Rich, G. T., Lo Curto, R., Arcoraci, T., Martorana, M., Wickham, M. S. J. (2010). Polyphenol and nutrient release from skin of almonds during simulated human digestion. *Food Chemistry*, 122(4), 1083-1088. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.079.
- Manríquez H., J. A. (1994). La digestibilidad como criterio de evaluación de alimentos-Su aplicación en peces y en la conservación del medio ambiente. *Control de calidad de insumos y dietas acuícolas*.FAO-Italia. Documento de campo nº 16.
- Marotti, I., Bonetti, A., Biavati, B., Catizone, P. y Dinelli, G. (2007). Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by *Bifidobacterium* species from human intestinal origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3913-3919.
- Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M. A. y Soliva-Fortuny, R. (2009). Delivery of Flavor and Active Ingredients Using Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber y M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 295-313): Springer New York.
- Martins, F. T., Doriguetto, A. C., de Souza, T. C., de Souza, K. R. D., dos Santos, M. H., Moreira, M. E. C. y Barbosa, L. C. A. (2008). Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. *Chemistry and Biodiversity*, 5(2), 251-258.
- Mauri, A. N. y Añón, M. C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14(2), 119-125.
- McClements, D. J., Decker, E. A. y Park, Y. (2008). Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 48-67. doi: 10.1080/10408390701764245.
- McHugh, T. H. y Senesi, E. (2000). Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 65(3), 480-485. doi:10.1111/j.1365-2621.2000.tb16032.x.
- Meyer, R., C., Winter, A. R. y Weiser, H. H. (1959). Edible protective coatings for extending the shelf life of poultry. *Food Technology*, 13(2), 146-148.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A

- short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- Mitsumoto, M., O'Grad, M. N., Kerry, J. P. y Buckley, D. J. (2005). Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science*, 69(4), 773-779.
doi: 10.1016/j.meatsci.2004.11.010.
- Mitsuoka, T. (1990). Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 6(4), 263-267. doi: 10.1007/bf01575871.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. y Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26(8), 2231-2234.
- Morros Galvárez, M. M. (2009). Aditivos alimentarios, una garantía de seguridad y salubridad en los alimentos *Seguridad alimentaria e higiene de los alimentos* (pp. 49-83). Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud.
- Musa Özcan, M., Ünver, A., Uçar, T. y Arslan, D. (2008). Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. *Food Chemistry*, 106(3), 1120-1127.
- Naidu, A. y Davidson, P. (2000). *Phyto-phenols Natural Food Antimicrobial Systems*: CRC Press.
- Nakatani, N. (1994). Antioxidant and antimicrobial constituents of herbs and spices. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, Herbs and Edible Fungi* (pp. 251-271). New York: Elsevier.
- Navarro-Martínez, M. D., Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Ruiz-Gómez, J., García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J. N. (2005). Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2914-2920.
- Neilson, A. P., Hopf, A. S., Cooper, B. R., Pereira, M. A., Bomser, J. A. y Ferruzzi, M. G. (2007). Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8941-8949.
- Nerín de la Puerta, C. (Ed.). (2009). *Seguridad alimentaria en materiales en contacto con los alimentos. En: Seguridad alimentaria e higiene de los alimentos* (pp. 127-146). Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud.
- Nieto, M. B. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 57-112): Springer New York.
- Nisperos-Carriedo, M. O. (1994). Edible Coatings and Films Based on Polysaccharides. In E. A. B. John M. Krochta, Myrna O. Nisperos-Carriedo (Ed.), *Edible coatings and films to improve food quality* (pp. 305-335): Lancaster, PA: Technomic Public Company.
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W. y Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science*, 72(5), R87-R100. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x.
- Nussinovitch, A. (2007). *Water-Soluble Polymer Applications in Foods*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H. y Gardiner, G. E. (2010). Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. *Marine Drugs*, 8(7), 2038-2064. doi: 10.3390/md8072038
- Ogata, M., Hoshi, M., Urano, S. y Endo, T. (2000). Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(10), 1467-1469.

- Ojagh, S. M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M. E., Montero, M. P. y Gómez-Guillén, M. C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*, 125(2), 595-606.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. y Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193-198. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.006.
- Ojcius, D. M. y Young, J. D. E. (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends in Biochemical Sciences*, 16(0), 225-229. doi: 10.1016/0968-0004(91)90090-i.
- Okello, E. J., McDougall, G. J., Kumar, S. y Seal, C. J. (2011). In vitro protective effects of colon-available extract of *Camellia sinensis* (tea) against hydrogen peroxide and beta-amyloid (A β (1-42)) induced cytotoxicity in differentiated PC12 cells. *Phytomedicine*, 18(8-9), 691-696.
- Olafsdottir, G., Lauzon, H. L., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J. y Kristbergsson, K. (2006). Evaluation of shelf life of superchilled cod (*Gadus morhua*) fillets and the influence of temperature fluctuations during storage on microbial and chemical quality indicators. *Journal of Food Science*, 71(2), S97-S109.
- Olivas, G. I. I. y Barbosa-Cánovas, G. (2009). Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 211-244): Springer New York.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F. y Shah, N. P. (2005). Stability of β -glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage. *Journal of Food Science*, 70(4), M236-M241.
- Otieno, D. O., Ashton, J. F. y Shah, N. P. (2006). Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 39(4), 394-407.
- Ouattar, B., Simard, R. E., Piett, G., Bégin, A. y Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 139-148.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P. y Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2-3), 155-162.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L. y Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5598-5605.
- Paarup, T., Sánchez, J. A., Peláez, C. y Moral, A. (2002). Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 1-12.
- Papadokostaki, K. G., Amarantos, S. G. y Petropoulos, J. H. (1998). Kinetics of release of particulate solutes incorporated in cellulosic polymer matrices as a function of solute solubility and polymer swellability. II. Highly soluble solute. *Journal of Applied Polymer Science*, 69(7), 1275-1290.
- Papadopoulou, A., Green, R. J. y Frazier, R. A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 158-163.
- Park, P. J., Je, J. Y. y Kim, S. K. (2004). Free radical scavenging activities of differently

- deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers*, 55(1), 17-22.
doi: 10.1016/j.carbpol.2003.05.002
- Park, S. I., Stan, S. D., Daeschel, M. A. y Zhao, Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science*, 70(4), M202-M207.
- Park, S. Y., Marsh, K. S. y Rhim, J. W. (2002). Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. [Article]. *Journal of Food Science*, 67(1), 194-197. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb11382.x.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E. y Skinner, M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 295-298.
- Pavlat, A. E. y Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How?. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 1-23): Springer New York.
- Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P. y Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74(7), M379-M383.
- Pelillo, M., Biguzzi, B., Bendini, A., Gallina Toschi, T., Vanzini, M. y Lercker, G. (2002). Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. *Food Chemistry*, 78(3), 369-374.
- Pérez-Mateos, M., Montero, P. y Gómez-Guillén, M. C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 53-61.
- Perumalla, A. V. S. y Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44(4), 827-839.
doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.022.
- Pidcock, K., Heard, G. M. y Henriksson, A. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 75-81.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K. y Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lwt-Food Science and Technology*, 38(8), 859-865. doi: 10.1016/j.lwt.2004.lwt.2004.09.014.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M. y Rakshit, S. K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38(3), 267-272. doi: 10.1016/j.foodres.2004.04.009.
- Qin, Y. (1993). The chelating properties of chitosan fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 49(4), 727-731. doi: 10.1002/app.1993.070490418.
- Quezada-Gallo, J.-A. (2009). Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), (pp. 315-333): Springer New York.
- Raafat, D., von Barga, K., Haas, A. y Sahl, H.-G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764-3773. doi: 10.1128/aem.00453-08.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G. y Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465. doi: 10.1021/bm034130m.
- Reddy, N. R., Villanueva, M. y Kautter, D. A. (1995). Shelf life of modified-atmosphere-packaged fresh tilapia fillets stored under refrigeration and temperature-abuse conditions.

- Journal of Food Protection*, 58(8), 908-914.
- Requena, T. y Peláez, C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española Ciencia Tecnología Alimentos*, 35(1), 19-44.
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Parisi, O. I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21(11), 1425-1435. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.04.028.
- Reto, M., Figueira, M. E., Filipe, H. M. y Almeida, C. M. M. (2007). Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(4), 139-144.
- Rhim, J.-W., Lee, S.-B. y Hong, S.-I. (2011). Preparation and Characterization of Agar/Clay Nanocomposite Films: The Effect of Clay Type. *Journal of Food Science*, 76(3), N40-N48. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02049.x.
- Rhim, J. W. (2011). Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 691-699.
- Rhim, J. W., Lee, S. B. y Hong, S. I. (2011). Preparation and characterization of Agar/Clay nanocomposite films: The effect of clay type. *Journal of Food Science*, 76(3), N40-N48.
- Rhim, J. W. y Shellhammer, T. H. (2005). 21 - Lipid-based edible films and coatings. In H. H. Jung (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (pp. 362-383). London: Academic Press.
- Rice-Evans, C., Miller, N. y Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159. doi: 10.1016/s1360-1385(97)01018-2.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.
- Rietveld, A. y Wiseman, S. (2003). Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. *Journal of Nutrition*, 133(10), 3285S-3292S.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603-632.
- Rodgers, S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 12(8), 276-284.
- Roginsky, V. y Alegria, A. E. (2005). Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4529-4535.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., McHugh, T. H. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 634-641. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.01.007.
- Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H. y Martín-Belloso, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2), 254-264. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.01.017.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 438-447. doi: 10.1016/j.tifs.2009.05.002.

- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., & Martín Belloso, O. (2007). Empleo de recubrimientos comestibles en frutas frescas cortadas: nuevo enfoque de conservación y desarrollo de productos. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 382, 13.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A. y Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681-687.
- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D. y Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852-858.
- Rydlo, T., Miltz, J. y Mor, A. (2006). Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *Journal of Food Science*, 71(9), R125-R135.
- Boisen, S., & Eggum, B. O. (1991). Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.
- Samona, A. y Robinson, R. K. (1991). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 44(3), 64-66. doi: 10.1111/j.1471-0307.1991.tb00639.x.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A. y González-Martínez, C. (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 277-283.
doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.047.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A. y Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98(4), 443-452.
doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.026.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. y Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57-63.
doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.11.004.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. y Chafer, M. (2011). Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16. doi: 10.1007/s12393-010-9031-3.
- Sang, S., Lee, M. J., Hou, Z., Ho, C. T. y Yang, C. S. (2005). Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9478-9484.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., Kienberger, H. y Foerst, P. (2009). Changes in membrane fatty acids of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying with sorbitol. *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), 516-521.
- Scalbert, A. y Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D. y Blaut, M. (1999). Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology*, 171(2), 81-91.
- Serra, A., Maclà, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N. y Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, 130(2), 383-393.
- Seydim, A. C. y Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano,

- rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644. doi: 10.1016/j.foodres.2006.01.013.
- Shah, N. P., Ding, W. K., Fallourd, M. J. y Leyer, G. (2010). Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. *Journal of Food Science*, 75(5), M278-M282.
- Shahidi, F. y Abuzaytoun, R. (2005) Chitin, Chitosan, and Co-Products: Chemistry, Production, Applications, and Health Effects. Vol. 49 (pp. 93-135).
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. y Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10(2), 37-51.
- Shimamura, T. Z., Wei-Hua; Hu, Zhi-Qing. (2007). Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Antiinfective Agent *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents)*, 6(1), 57-62.
- Simpson, B. K., Gagne, N., Ashie, I. N. A. y Noroozi, E. (1997). Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology*, 11(1), 25-44.
- Singh Arora, D., Jeet Kaur, G. y Kaur, H. (2009). Antibacterial activity of tea and coffee: Their extracts and preparations. *International Journal of Food Properties*, 12(2), 286-294.
- Singh, S. y Singh, R. P. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, 24(4), 392-415.
- Siripatrawan, U. y Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.04.003.
- Siripatrawan, U. y Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102-108. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.08.011.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S. y Johnson, M. G. (2008a). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S. y Johnson, M. G. (2008b). Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *Journal of Food Protection*, 71(10), 2105-2109.
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01467.x.
- Slinkard, K. y Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 49-55.
- Sobral, P. J. D. A., Dos Santos, J. S. y García, F. T. (2005). Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. *Journal of Food Engineering*, 70(1), 93-100.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., De Dea Lindner, J., Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Ruiz, H. A., Martins, J. T., Casariego, A., Teixeira, J. A. y Vicente, A. A. (2010). Effect of Chitosan-Based Coatings on the Shelf Life of Salmon (*Salmo salar*). [Article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11456-11462. doi: 10.1021/jf102366k.

- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*(2), 331-345. doi: 10.1007/bf00395940.
- Su, P., Henriksson, A., Nilsson, C. y Mitchell, H. (2008). Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(9), 1837-1842.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G. y Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, *6*(3), 257-272.
- Suzuki, M., Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T. y Maeda-Yamamoto, M. (2003). Epimerization of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate: Relationship between epimerization and chemical structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(2), 510-514.
- Syu, K.-Y., Lin, C.-L., Huang, H.-C. y Lin, J.-K. (2008). Determination of Theanine, GABA, and Other Amino Acids in Green, Oolong, Black, and Pu-erh Teas with Dabsylation and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(17), 7637-7643. doi: 10.1021/jf801795m.
- Tagliacucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D. y Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, *120*(2), 599-606. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.030.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A. y Martín-Belloso, O. (2007). Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. *Journal of Food Science*, *72*(4), E190-E196. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00318.x.
- Taravel, M. N. y Domard, A. (1995). Collagen and its interaction with chitosan: II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. *Biomaterials*, *16*(11), 865-871.
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P. y Michalik, J. (2009). Transformations of Phenolic Compounds in an in vitro Model Simulating the Human Alimentary Tract. *Food Technology and Biotechnology*, *47*(4), 456-463.
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G. J., Leitao, M. C., Vieira, H. L. A., Stewart, D., Alves, P. M., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *131*, 1443-1452.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, *14*(3), 71-78. doi: 10.1016/s0924-2244(02)00280-7.
- Theivendran, S., Hettiarachchy, N. S. y Johnson, M. G. (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. *Journal of Food Science*, *71*(2), M39-M44. doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb08905.x.
- Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus* *Journal of Food Protection* (Vol. 56, pp. 399-403).
- Tian, H., Xu, G., Yang, B. y Guo, G. (2011). Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering*, *107*(1), 21-26.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. y Cullen, P. J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(14), 5987-6000. doi: 10.1021/jf900668n.
- Todd R, K. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS*

- Microbiology Reviews*, 12(1–3), 39-85. doi: 10.1016/0168-6445(93)90057-g.
- Todorov, S. D. y Dicks, L. M. T. (2005). Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2–3), 318-326. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.09.009
- Toschi, T. G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G. y Biagi, P. L. (2000). The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3973-3978.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J. y Shah, N. P. (2002). Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase-producing bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 67(8), 3104-3113.
- Uskova, M. A., Kravchenko, L. V., Avrenjeva, L. I. y Tutelyan, V. A. (2010). Effect of Lactobacillus casei 114001 Probiotic on Bioactivity of Rutin. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 149(5), 578-582.
- van Vuuren, S. F. y Viljoen, A. M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 540-544.
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J. y Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769. doi: 10.1016/j.foodres.2009.02.026.
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J. y Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.
- Véronique, C. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2), 90-103. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.07.035.
- Vinson, J. A. y Dabbagh, Y. A. (1998). Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, 18(6), 1067-1075. doi: 10.1016/s0271-5317(98)00089-x.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Spices as functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 13-28.
- Viuda-Martos, M., Ruiz Navajas, Y., Sánchez Zapata, E., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1), 13-19.
- von Staszewski, M., Pilosof, A. M. R. y Jagus, R. J. (2011). Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 125(1), 186-192.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 829-837.
- Wang, J. Y., Fujimoto, K., Miyazawa, T. y Endo, Y. (1991). Antioxidative mechanism of maize zein in powder model systems against methyl linoleate: effect of water activity and coexistence of antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 351-355. doi: 10.1021/jf00002a025.
- Wang, K. y Ruan, J. (2009). Analysis of chemical components in green tea in relation with perceived quality, a case study with Longjing teas. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2476-2484. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02040.x.

- Wang, L., Xu, R., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Tu, Y. y Zeng, X. (2010). Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123(4), 1259-1266.
doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.063.
- Wang, R., Zhou, W. y Jiang, X. (2008). Reaction kinetics of degradation and epimerization of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system over a wide temperature range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2694-2701.
- Wei, A. y Shibamoto, T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7218-7225.
- Weisburger, J. H. y Chung, F. L. (2002). Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), 1145-1154.
- Wendakoon, C. N. y Morihiko, S. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of enterobacter aerogenes by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58(3), 280-283.
- Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A. y Nag, D. (2005). Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21(2), 185-192. doi: 10.1016/j.indcrop.2004.03.002.
- Xue, C., Yu, G., Hirata, T., Terao, J. y Lin, H. (1998). Antioxidative Activities of Several Marine Polysaccharides Evaluated in a Phosphatidylcholine-liposomal Suspension and Organic Solvents. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(2), 206-209.
- Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H. y Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. [Article]. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151. doi: 10.1080/14786410802496598.
- Yen, M.-T., Yang, J.-H. y Mau, J.-L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 840-844.
doi: 10.1016/j.carbpol.2008.05.003.
- Yoshino, K., Suzuki, M., Sasaki, K., Miyase, T. y Sano, M. (1999). Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(4), 223-229.
- Zaika, L. (1975). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal Food Safety*, 9, 97-118.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P. y Biliaderis, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338-345. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.02.004.
- Zivanovic, S., Chi, S. y Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), M45-M51.