

## Tesis Doctoral

# Matrices vegetales y subproductos como base para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales

Genevois, Carolina Elizabeth

2017-02-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Genevois, Carolina Elizabeth. (2017-02-23). Matrices vegetales y subproductos como base para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Genevois, Carolina Elizabeth. "Matrices vegetales y subproductos como base para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-02-23.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

## **Matrices vegetales y subproductos como base para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

**Mg. Carolina E. Genevois**

Directores de tesis: Dra. Marina F. de Escalada

Dra. Silvia K. Flores

Consejera de estudios: Dra. Lía N. Gerschenson

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2017

## Matrices vegetales y subproductos como base para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales

### RESUMEN

La calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex-Poiret) fue utilizada para formular un snack fortificado con hierro y *Lactobacillus casei* ATCC-393. Se determinó que el 55% del hierro resultó bioaccesible a nivel intestinal, y que su presencia y el almacenamiento afectaron tanto la viabilidad del probiótico,  $>10^7$  UFC/g de calabaza durante 14 días a 8°C, como su tolerancia a la digestión gastrointestinal *in vitro* (DGI). El producto fortificado obtuvo buena aceptabilidad global y el agregado de hierro no fue percibido.

Los subproductos del proceso anterior, pulpa y cáscara de calabaza, fueron satisfactoriamente utilizados como sustrato-soporte de *Lactobacillus casei* presentando un recuento viable  $>10^8$  UFC/g. La supervivencia del probiótico luego de la estabilización y de la DGI fue  $>74\%$  durante 28 días de almacenamiento a temperatura ambiente. En general, las propiedades físico-químicas y funcionales del polvo de calabaza (PC) no se vieron afectadas por la presencia del probiótico.

El nuevo ingrediente a base de PC conteniendo *L. casei* fue testeado como suplemento dietario en dos bebidas comerciales. Se observó un incremento de la viscosidad y un porcentaje de supervivencia  $>78\%$  del probiótico después de la DGI. Además, se redujo la velocidad de inactivación del probiótico a 63°C respecto del suplemento con células libres. Las bebidas con el PC conteniendo *L. casei* fueron bien calificadas en cuanto a aroma, textura y aceptabilidad global. Por otro lado, el PC conteniendo *L. casei* fue testeado como ingrediente alimentario incorporándolo a la formulación de un postre de origen no lácteo. Se obtuvo un postre con un recuento de probióticos de  $10^9$  UFC/mL, mostrando además un efecto potenciador del color, la firmeza y la capacidad de retención de agua, confirmando su potencial aplicación como ingrediente en la industria alimentaria.

En conclusión, esta tesis presenta evidencia sobre la potencial utilización de tejido vegetal de calabaza, *Cucurbita moschata* Duchesne ex-Poiret, para la fortificación con hierro y *L. casei* ATCC-393, obteniendo un producto con buenas características nutricionales y organolépticas; y la utilización de los subproductos como sustrato y soporte del probiótico para la obtención de un nuevo ingrediente con mayor resistencia a factores de estrés tecnológicos y biológicos, buenas propiedades funcionales, y con alto contenido en fibra dietaria.

*Palabras clave:* calabaza *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret, subproductos fruti-hortícolas, probióticos, *Lactobacillus casei*, fortificación, hierro, alimentos funcionales, ingredientes funcionales.

## **Vegetal matrices and byproducts as base for the elaboration of functional food and ingredients**

### **ABSTRACT**

The pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) was used to formulate a ready to eat snack fortified with iron and *Lactobacillus casei* ATCC-393. It was determined that 55% of the iron was bioaccessible in the intestine, and that the iron presence and the storage time affected the viability of the probiotic,  $>10^7$  CFU/g pumpkin for 14 days at 8 °C, and their tolerance to *in vitro* gastrointestinal digestion (GID). The fortified product presented a good overall acceptability and the addition of iron was not perceived.

The byproducts obtained from the previous process, pumpkin pulp and peel were successfully used as substrate-support for the *Lactobacillus casei*, showing a viable count  $>10^8$  CFU/g. The probiotic survival after the stabilization and the GID was  $>74\%$  for 28 days of storage at room temperature. In general, the physicochemical and functional properties of pumpkin powder (PP) were not affected by the presence of the probiotic.

The new ingredient based on PP containing *L. casei* was tested as a dietary supplement in two commercial beverages. The viscosity increased and the survival percentage of the probiotic was  $>78\%$  after GID. Furthermore, the inactivation rate of the probiotic as a supplement was reduced at 63 °C respect to the free cells. The beverages supplemented with PP containing *L. casei* were well qualified in terms of flavor, texture and overall acceptability.

On the other hand, the PP containing *L. casei* was tested as a food ingredient in the formulation of a non-dairy dessert. The dessert had a probiotic count of  $10^9$  CFU/mL, showing besides a potentiating effect of color, firmness and water retention capacity, confirming its potential application as an ingredient in the food industry.

To conclude, this thesis presents evidence of the potential use of a vegetal tissue, *Cucurbita moschata* Duchesne ex-Poiret pumpkin, for the fortification with iron and *L. casei* ATCC-393, obtaining a final product with good nutritional and organoleptic characteristics; and the use of the byproducts as substrate and support of the probiotic to obtain a new ingredient with higher resistance to technological and biological stress factors, good functional properties, and rich in dietary fiber.

*Keywords:* pumpkin *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret, fruits and vegetables byproducts, probiotics, *Lactobacillus casei*, fortification, iron, functional foods, functional ingredients.

**ABREVIATURAS**

<b>ABRV-L</b>	agar bilis-rojo neutro-cristal violeta-lactosa
<b>AIR</b>	residuo insoluble en alcohol
<b>AF</b>	ácido fítico
<b><math>\alpha</math>-GOS</b>	$\alpha$ -galactooligosacáridos
<b>ANMAT</b>	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza
<b><math>a_w</math></b>	actividad de agua
<b>C.A.A.</b>	Código Alimentario Argentino
<b>CC</b>	coberturas comestibles
<b>Chr</b>	chroma
<b>DE</b>	desvío estándar
<b>DFC</b>	Diseño Factorial Completo
<b>DGI</b>	digestión gastrointestinal
<b>DNH</b>	deficiencia nutricional de hierro
<b>DNM</b>	desnutrición por carencia de micronutrientes
<b><math>\Delta</math>UFC</b>	incremento celular
<b>DW</b>	estadístico de Durbin-Watson
<b><math>E_b</math></b>	elongación a la ruptura
<b>EFSA</b>	European Food and Safety Authority
<b>ENNyS</b>	Encuesta Nacional de Nutrición y Salud
<b><math>\epsilon</math></b>	deformación
<b><math>\epsilon_b</math></b>	deformación a la ruptura
<b>ESEM</b>	microscopía electrónica de barrido ambiental
<b><math>\eta</math></b>	viscosidad aparente
<b>FAO</b>	Food and Agricultural Organization of United Nations/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FD</b>	fibra dietaria
<b><math>\dot{\gamma}</math></b>	velocidad de deformación
<b>GID</b>	gastrointestinal digestion
<b><math>G'</math></b>	módulo de almacenamiento
<b><math>G''</math></b>	módulo de pérdida
<b>Hierro hem</b>	hierro hemínico
<b>Hierro no-hem</b>	hierro no-hemínico
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>HPMC</b>	hidroxipropilmetilcelulosa
<b>HPMC control</b>	película comestible en base a HPMC
<b>HPMC <i>L. casei</i></b>	película comestible en base a HPMC conteniendo <i>L. casei</i>

<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>LAB</b>	bacterias ácido lácticas
<b>LCH</b>	leche chocolatada
<b>LCHc</b>	leche chocolatada control
<b>LS</b>	leche de soja con jugo de manzana
<b>LSc</b>	leche de soja con jugo de manzana control
<b>L*</b>	luminosidad
<b>M<sub>E</sub></b>	módulo elástico
<b>MSR</b>	Metodología de Superficie de Respuesta
<b>MRS</b>	de Man, Rogosa y Sharpe
<b>μ</b>	viscosidad
<b>υ</b>	volumen específico
<b>SEM</b>	microscopía electrónica de barrido
<b>σ</b>	esfuerzo
<b>σ<sub>b</sub></b>	esfuerzo a la ruptura
<b>OHC</b>	capacidad de absorción de aceite
<b>PC</b>	polvo de calabaza
<b>PP</b>	pupmkin powder
<b>R<sup>2</sup></b>	coeficiente de determinación
<b>R<sup>2</sup><sub>aj</sub></b>	coeficiente de determinación ajustado
<b>RNI<sub>s</sub></b>	ingesta recomendada de nutrientes
<b>PDA</b>	pérdidas y desperdicios alimentario
<b>ρ</b>	densidad aparente
<b>SC</b>	capacidad de hinchamiento
<b>Tan δ</b>	ángulo de fase o tangente de pérdida
<b>τ</b>	esfuerzo de corte
<b>Tg</b>	temperatura de transición vítrea
<b>TPA</b>	Análisis del Perfil de Textura
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colonias
<b>WHC</b>	capacidad de atrapamiento de agua
<b>WHO / OMS</b>	World Health Organization / Organización Mundial de la Salud
<b>WHR</b>	capacidad de retención de agua

## **Agradecimientos**

En primer lugar agradezco a mis Directoras Marina y Silvia por el tiempo que me han brindado, el compromiso, la dedicación, el acompañamiento y la orientación en las tareas de mesada y escritura, la paciencia, por compartir todo su conocimiento y experiencia en el tema, y por sobre todo, su amistad.

A la Dra. Lía Gerschenson, por sus consejos y acompañamiento.

A mi familia y amigos, porque todo esto nunca hubiera sido posible sin el acompañamiento y el apoyo incondicional de ellos.

A Germán, por estar siempre a mi lado, por entenderme, acompañarme y sostenerme en los momentos más difíciles.

A Suri, mi compañero incondicional de mesa.

A mis compañeros de LOCAP, por siempre estar dispuestos a darme una mano, por compartir sus experiencias y conocimientos, y por tantos momentos lindos compartidos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), a la Universidad de Buenos Aires (UBA) y a la Fundación ArgenINTA por el apoyo económico para llevar a cabo la presente tesis Doctoral.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por facilitarme el uso de sus instalaciones y brindarme un espacio de trabajo.

A la Dra. Valeria M. Messina y Lic. Facundo N. Pieniasek del Centro de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (UNIDEF-MINDEF-CITEDEF-CONICET) por acceder desinteresadamente a realizar trabajos en colaboración y poner a libre disposición el uso de sus equipamientos.

A la Lic. Nora Heinke del Instituto Nacional de Alimentos (INAL) por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos.

A Julio Sosa y Daniel Araujo, del taller del Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA por colaborar en el corte de las calabazas y asistirme en los inconvenientes técnicos que fueron surgiendo.

*A la memoria de mi madre,*

**PUBLICACIONES**

Parte de los resultados y conclusiones derivados del trabajo de la presente tesis dieron lugar a las siguientes producciones:

**Publicaciones en Revistas Internacionales:**

- ✓ Novel strategies for fortifying vegetable matrices with iron and *Lactobacillus casei* simultaneously. Genevois C.; de Escalada Pla M.; Flores S. LWT - Food Science and Technology (2017) 79: 34-41.
- ✓ Byproduct from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex poiret) as a substrate and vegetable matrix to contain *Lactobacillus casei*. Genevois C.; Flores S.; de Escalada Pla M. Journal of Functional Foods (2016) 23: 210–219.

**Producción tecnológica con título de propiedad intelectual:**

**Solicitud de Patente Nro. AR20140103956.** Título: Un ingrediente alimenticio funcional, insípido e inodoro que comprende probióticos del género *Lactobacillus* soportados en una matriz de fibra dietaria parcialmente digerida y un procedimiento utilizable en su preparación. Solicitante: UBA/CONICET. Inventores: de Escalada Pla M. F., Flores S.K., Genevois C.E. Presentada el 22/10/2014 (en trámite).

**Comunicaciones a Congresos:**

- ✓ Noviembre de 2016. **VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos**, organizado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología del Gobierno de la Provincia de Córdoba. Córdoba, ARGENTINA. ISBN 978-987-45380-0-0.  
Subproductos de calabaza como potencial vehículo de *Lactobacillus casei* para la formulación de alimentos: caracterización físico-química y funcional. Genevois C., de Escalada Pla M., Flores S.
- Desarrollo de un alimento probióticos de origen no lácteo. Genevois C., de Escalada Pla M., Flores S.
- Formulación y caracterización de una bebida fermentada a base de leche de soja. Genevois C., Castellanos A., de Escalada Pla M., Flores S.,
- ✓ Noviembre 2015. **XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología**. C.A.B.A., Buenos Aires, ARGENTINA. ISBN 978-987-22165-7-3.

“Suplementación de dos bebidas comerciales con un ingrediente funcional a base de residuos de calabaza conteniendo bacterias probióticas.” C. Genevois, A. Castellanos; S. Flores; M. de Escalada Pla.

✓ Abril 2015. **IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria.** San Rafael, Mendoza, ARGENTINA. ISBN 978-987-575-119-4.

“Efecto de la presencia de hierro en la viabilidad de *Lactobacillus casei* en un alimento funcional a base de calabaza.” Genevois C., de Escalada Pla M., Flores S.

“Residuos de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex poiret) como soporte de *Lactobacillus casei*.” Genevois C., Flores S, de Escalada Pla M.

✓ Noviembre 2014. **V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.** Córdoba, ARGENTINA. ISBN 978-987-45738-5-8.

“Efecto de la presencia de *Lactobacillus casei* y de la temperatura de almacenamiento en el color de calabaza deshidratada”. Genevois C, Flores S, de Escalada Pla M.

“Características organolépticas de un alimento funcional a base de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible conteniendo probióticos.” Genevois C., de Escalada Pla M., Flores S.

✓ Septiembre-Octubre, 2014. **XXII Jornadas Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo.** Valparaíso, Chile. ISBN 978-956-296-123-3.

“Viabilidad de *Lactobacillus casei* en un producto vegetal fortificado con hierro”. Genevois, Carolina; Flores, Silvia K.; de Escalada Pla, Marina F.

✓ Octubre, 2013. **XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.** Rosario, Santa Fe, ARGENTINA. ISBN: 978-987-22165-5-9.

“Matriz vegetal de calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex poiret) como soporte de *Lactobacillus casei*”. Genevois C., Flores S., de Escalada Pla M.

**Premio:**

ArgenINTA 2015 a la Calidad Agroalimentaria XII. Mención especial adjudicada en la Categoría “Investigación y desarrollo en el área de tecnología de alimentos” por el trabajo titulado: “Conversión de residuos de calabaza en ingredientes funcionales soportes de *Lactobacillus casei*”.

## CONTENIDOS:

RESUMEN.....	- 2 -
ABSTRACT .....	- 3 -
ABREVIATURAS .....	- 4 -
PUBLICACIONES.....	- 8 -
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	- 19 -
OBJETIVOS GENERALES.....	- 39 -

## CAPÍTULO I

**Snack a base de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible en base a hidroxipropilmetilcelulosa conteniendo *Lactobacillus casei***

<b>1. Introducción .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>- 43 -</b>
2.1. Reactivos .....	- 43 -
2.2. Preparación del snack a base de calabaza .....	- 43 -
2.2.1. <i>Proceso de infusión en seco</i> .....	- 43 -
2.2.2. <i>Preparación de la cobertura comestible</i> .....	- 44 -
2.2.3. <i>Microorganismo y preparación del medio de crio-preservación</i> .....	- 44 -
2.2.4. <i>Incorporación del <i>Lactobacillus casei</i> en el recubrimiento comestible a base de HPMC</i> .....	- 45 -
2.3. Caracterización físico-química del snack de calabaza .....	- 46 -
2.4. Evaluación del color .....	- 47 -
2.5. Análisis de la textura .....	- 47 -
2.6. Determinación de la viabilidad del <i>Lactobacillus casei</i> .....	- 48 -
2.7. Ensayos " <i>in vitro</i> " .....	- 48 -
2.7.1. <i>Condiciones simuladas de la digestión gastrointestinal</i> .....	- 48 -
2.7.2. <i>Supervivencia del <i>Lactobacillus casei</i></i> .....	- 49 -
2.7.3. <i>Bioaccesibilidad del hierro</i> .....	- 49 -
2.8. Caracterización de las películas comestibles .....	- 50 -
2.8.1. <i>Ensayo de Tracción</i> .....	- 50 -
2.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	- 51 -
2.10. Calidad microbiológica .....	- 51 -
2.11. Evaluación sensorial .....	- 52 -
2.12. Análisis estadístico .....	- 52 -
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>- 53 -</b>
3.1. Características físico-químicas del snack a base de calabaza .....	- 53 -
3.2. Evaluación del color .....	- 53 -
3.3. Contenido de hierro en el snack a base de calabaza fortificado.....	- 56 -

3.4.	Efecto de la presencia de hierro sobre la textura y la supervivencia del <i>L. casei</i> .....	- 58 -
3.5.	Microestructura .....	- 63 -
3.6.	Inocuidad microbiológica del producto final .....	- 65 -
3.7.	Evaluación sensorial del snack a base de calabaza fortificado .....	- 66 -
<b>4.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>- 67 -</b>

## CAPÍTULO II

### Subproductos de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne Ex Poiret) como sustrato y soporte de *Lactobacillus casei*

<b>1.</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>2.</b>	<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>- 73 -</b>
2.1.	Materiales .....	- 73 -
2.1.1.	<i>Microorganismo y preparación del medio de crio-preservación del L. casei</i> .....	- 73 -
2.1.2.	<i>Preparación del inóculo</i> .....	- 73 -
2.1.3.	<i>Preparación de las muestras</i> .....	- 74 -
2.2.	Métodos .....	- 76 -
2.2.1	<i>Determinación de la viabilidad del Lactobacillus casei</i> .....	- 76 -
2.2.2	<i>Determinación del pH, la acidez y el concentración de ácido láctico en el sobrenadante</i> .....	- 76 -
2.2.3	<i>Determinación de la cinética de crecimiento del L. casei</i> .....	- 76 -
2.2.4	<i>Características físico-químicas</i> .....	- 77 -
2.2.5	<i>Microestructura</i> .....	- 77 -
2.2.6	<i>Condiciones simuladas de la digestión gastrointestinal</i> .....	- 78 -
2.2.7	<i>Propiedades reológicas</i> .....	- 78 -
2.2.8	<i>Evaluación sensorial</i> .....	- 79 -
2.2.9	<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i> .....	- 79 -
<b>3.</b>	<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>- 81 -</b>
3.1.	Efecto de los factores estudiados sobre la viabilidad del <i>L. casei</i> .....	- 81 -
3.2.	Efecto de las operaciones unitarias subsecuentes sobre la supervivencia del <i>L. casei</i> .....	- 88 -
3.3.	Caracterización físico-química del sobrenadante .....	- 90 -
3.4.	Evaluación del polvo de calabaza conteniendo <i>L. casei</i> como suplemento dietario ..	- 91 -
<b>4.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>- 94 -</b>

## CAPÍTULO III

### Caracterización físico-química, funcional y estudio de la estabilidad durante el almacenamiento del ingrediente obtenido a partir de subproductos de calabaza como matriz soporte de *Lactobacillus casei*

<b>1.</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>- 97 -</b>
-----------	---------------------------	---------------

<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>- 100 -</b>
2.1. Materiales .....	- 100 -
2.1.1. Preparación del inóculo .....	- 100 -
2.1.2. Preparación del polvo a base de subproductos de calabaza conteniendo <i>L. casei</i> .....	- 100 -
2.2. Métodos .....	- 101 -
2.2.1. Determinación de la viabilidad del <i>L. casei</i> .....	- 101 -
2.2.2. Condiciones simuladas de la digestión gastrointestinal.....	- 101 -
2.2.3. Medición del color .....	- 101 -
2.2.4. Propiedades físico-químicas y funcionales .....	- 102 -
- Propiedades físicas y funcionales:.....	- 102 -
- Propiedades de hidratación: .....	- 103 -
- Determinación de la temperatura de transición vítrea .....	- 104 -
- Composición química: .....	- 104 -
2.2.5. Calidad microbiológica .....	- 105 -
2.2.6. Resistencia térmica del <i>L. casei</i> soportado en el PC .....	- 105 -
2.2.7. Análisis estadístico .....	- 107 -
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>- 107 -</b>
3.1. Viabilidad del <i>L. casei</i> contenido en el PC durante el almacenamiento .....	- 107 -
3.2. Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la funcionalidad del <i>L. casei</i> soportado en el polvo de calabaza .....	- 109 -
3.3. Evaluación del color del polvo de calabaza durante el almacenamiento .....	- 111 -
3.4. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del polvo de calabaza obtenido y efecto de la presencia del <i>L. casei</i> sobre las mismas .....	- 116 -
3.5. Calidad microbiológica del polvo de calabaza conteniendo <i>L. casei</i> .....	- 122 -
3.6. Resistencia térmica del <i>L. casei</i> soportado en el polvo de calabaza como suplemento de una bebida láctea.....	- 123 -
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>- 125 -</b>

#### CAPÍTULO IV

##### Formulación de un postre a base de leche de soja utilizando el nuevo ingrediente conteniendo *Lactobacillus casei*

<b>1. Introducción .....</b>	<b>-129-</b>
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>-134-</b>
2.1. Materiales .....	-134-
2.1.1. Preparación del inóculo .....	-134-
2.1.2. Preparación del ingrediente .....	-134-
2.1.3. Preparación de la leche de soja .....	-134-
2.1.4. Preparación del postre a base de leche de soja .....	-135-

2.2.	Métodos .....	-135-
2.2.1.	<i>Caracterización físico-química</i> .....	-135-
2.2.2.	<i>Determinación de la viabilidad del L. casei</i> .....	-136-
2.2.3.	<i>Estabilidad física a corto plazo</i> .....	-136-
2.2.4.	<i>Evaluación del color</i> .....	-136-
2.2.5.	<i>Textura</i> .....	-137-
2.2.5.1	Ensayo de Punción .....	-137-
2.2.5.2	Análisis del Perfil de Textura (TPA) .....	-137-
2.2.6.	<i>Propiedades reológicas</i> .....	-139-
2.2.6.1	Ensayo de amplitud y barrido de frecuencia.....	-139-
2.2.6.2	Ensayo de flujo .....	-139-
2.2.7.	<i>Caracterización nutricional</i> .....	-140-
2.2.7.1	Resistencia del probiótico a las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal .....	-140-
2.2.7.2	Contenido de ácido fítico .....	-140-
2.2.7.3	Contenido de rafinosa y estaquiosa .....	-141-
2.2.8.	<i>Evaluación sensorial</i> .....	-141-
2.2.9.	<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i> .....	-142-
<b>3.</b>	<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>-143-</b>
3.1.	Efecto de la concentración del ingrediente y de los sólidos solubles de la leche de soja sobre la viabilidad del probiótico, estabilidad física, textura y color del postre .....	-143-
3.2.	Optimización de la formulación para la elaboración del postre a base de leche de soja .....	-151-
3.3.	Caracterización físico-química y nutricional del postre a base de leche de soja .....	-152-
3.4.	Propiedades reológicas y texturales del postre a base de leche de soja .....	-156-
3.5.	Evaluación sensorial del postre a base de leche de soja.....	-161-
<b>4.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>-163-</b>
	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>-165-</b>
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>-167-</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>-169-</b>
	<b>ANEXO B</b> .....	<b>-170-</b>
	<b>ANEXO C</b> .....	<b>-171-</b>
	<b>ANEXO D</b> .....	<b>-175-</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>-175-</b>

**LISTA DE TABLAS**

<b>Capítulo N°. Tabla N°. Título.</b>	<b>Página N°</b>
<b>Tabla 1.</b> Ingesta diaria recomendada en mujeres y hombres.	-24-
<b>Tabla 2.</b> Ingesta diaria recomendada en lactantes y niños.	-24-
<b>Tabla I.1.</b> Parámetros iniciales de color y valores de las constantes de velocidad de chroma (Chr) y b* obtenidos del modelo de cinética de primer orden.	-56-
<b>Tabla I.2.</b> Contenido de hierro soluble, insoluble y total en el snack a base de calabaza después de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .	-58-
<b>Tabla I.3.</b> Parámetros de textura del snack a base de calabaza recubierto con cobertura comestible a base de hidroxipropil metilcelulosa al inicio y al final del almacenamiento.	-60-
<b>Tabla II.1.</b> DFC (2 <sup>4</sup> ) con 4 factores, dos niveles por cada factor y puntos centrales.	-81-
<b>Tabla II.2.</b> Variables repuestas del DFC (2 <sup>4</sup> ): Viabilidad de <i>L. casei</i> , pH, Acidez titulable y ΔCFU.	-85-
<b>Tabla II.3.</b> Coeficientes de regresión de los efectos estudiados sobre la viabilidad de <i>L. casei</i> , pH, acidez titulable y ΔCFU.	-86-
<b>Tabla II.4.</b> Valores de los parámetros ajustados al modelo modificado de Gompertz de la curva de crecimiento del <i>L. casei</i> en un medio a base de subproductos de calabaza.	-88-
<b>Tabla II.5.</b> Aceptabilidad sensorial de las bebidas comerciales suplementadas con el polvo de calabaza conteniendo <i>L. casei</i> .	-94-
<b>Tabla III.1.</b> Parámetros de ajuste al modelo de primer orden del color en el polvo de calabaza conteniendo <i>L. casei</i> y el sistema control almacenado a distintas temperaturas.	-112-
<b>Tabla III.2.</b> Propiedades físicas, funcionales y de hidratación del polvo de calabaza almacenado a 22 y 8 °C.	-118-
<b>Tabla III.3.</b> Composición química de la fracción rica en material de pared celular (AIR) en el polvo de calabaza con y sin la adición de <i>L. casei</i> .	-120-
<b>Tabla III.4.</b> Parámetros de temperatura de transición vítrea y a <sub>w</sub> en el polvo de calabaza conteniendo <i>L. casei</i> .	-121-
<b>Tabla III.5.</b> Parámetros de ajuste obtenidos del modelo de Weibull de la resistencia térmica del <i>L. casei</i> suplementado a una bebida láctea.	-124-

---

<b>Tabla IV.1.</b> Matriz del diseño experimental con las variables independientes y respuestas físico-químicas, incremento en la viabilidad del <i>L. casei</i> y textura para la optimización de la formulación del postre a base de leche de soja.	-144-
<b>Tabla IV.2.</b> Coeficientes de regresión del ajuste al modelo polinomial de segundo grado de las variables respuestas estudiadas en la formulación del postre a base de leche de soja.	-145-
<b>Tabla IV.3.</b> Matriz del diseño experimental con las variables independientes y variables respuestas de color para la optimización de la formulación del postre a base de leche de soja.	-149-
<b>Tabla IV.4.</b> Contenido de ácido fólico, rafinosa y estaquiosa en la leche de soja y en los postres a base de leche de soja.	-154-
<b>Tabla IV.5.</b> Parámetros de ajuste del Modelo de Herschel-Bulkley para la formulación de postre.	-158-
<b>Tabla IV.6.</b> Parámetros del Perfil de Textura del postre a base de leche de soja.	-161-
<b>Tabla IV.7.</b> Puntuación y calificación obtenida en la aceptación sensorial de los postres a base de leche de soja fermentados con el ingrediente.	-162-
<b>Tabla C.1.</b> Tabla comparativa de los parámetros físicos-químicos y funcionales del polvo de calabaza con <i>L. casei</i> en las distintas etapas de escalado.	-173-

---

**LISTA DE FIGURAS**

Capítulo N°. Figura N°. Título	Página N°
<b>Figura 1.</b> Prevalencia de anemia a nivel mundial en porcentaje <b>(a)</b> niños de 6-59 meses, <b>(b)</b> mujeres en edad reproductiva entre 15-49 años, <b>(c)</b> mujeres embarazadas entre 15-49 años, y <b>(d)</b> mujeres no embarazadas entre 15-49 años.	-21-
<b>Figura 2.</b> Prevalencia de anemia y riesgo de ingesta deficiente en hierro en la población Argentina.	-22-
<b>Figura 3.</b> Esquema de transferencia de agua y solutos durante el proceso la deshidratación osmótica y cambios estructurales de las células.	-26-
<b>Figura 4.</b> Propiedades funcionales de las coberturas comestibles en los alimentos.	-28-
<b>Figura 5.</b> Estructura química de la celulosa.	-29-
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la hidroxipropilmetilcelulosa.	-30-
<b>Figura 7.</b> Factores que afectan la viabilidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento.	-34-
<b>Figura 8.</b> Zapallo de la variedad Butternut.	-37-
<b>Figura I.1.</b> Diagrama de preparación del snack a base de calabaza recubierto con cobertura comestible en base a hidroxipropilmetilcelulosa.	-46-
<b>Figura I.2.</b> Parámetros de Chroma <b>(a)</b> y b* <b>(b)</b> en el snack a base de calabaza en función del tiempo de almacenamiento.	-55-
<b>Figura I.3.</b> Imagen de los snacks a base de calabaza al final del almacenamiento.	-56-
<b>Figura I.4.</b> Viabilidad del <i>L. casei</i> en el snack a base de calabaza durante el almacenamiento.	-61-
<b>Figura I.5.</b> Supervivencia del <i>L. casei</i> después de la digestión gástrica <b>(a)</b> e intestinal <b>(b)</b> en el snack a base de calabaza durante el almacenamiento.	-63-
<b>Figura I.6.</b> Microestructura de snack a base de calabaza. <b>a)</b> Superficie y <b>b)</b> corte transversal del snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo <i>L. casei</i> (sistema A); <b>c)</b> superficie del snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC (sistema B); <b>d)</b> superficie del snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo <i>L. casei</i> (sistema C).	-65-
<b>Figura II.1.</b> Diagrama de flujo de la preparación del polvo de calabaza soporte de <i>L. casei</i> .	-75-

<b>Figura II.2.</b> Curva de crecimiento del <i>Lactobacillus casei</i> en un medio a base de subproductos de calabaza a 37 °C.	-87-
<b>Figura II.3.</b> Microscopia electrónica de células libres de <i>L. casei</i> <b>(a)</b> y células probióticas adheridas a la matriz de calabaza secada al vacío <b>(b)</b> .	-90-
<b>Figura II.4.</b> Porcentaje de supervivencia del <i>Lactobacillus casei</i> después de las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal en leche de soja (LS) y leche chocolatada (LCH) suplementadas con el polvo de calabaza conteniendo el probiótico. Ensayos controles con Leche de soja (LSc) y leche chocolatada (LCHc) suplementadas con células libres del <i>L. casei</i> .	-92-
<b>Figura II.5.</b> Curva de esfuerzo de corte ( $\tau$ ) en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) en <b>(a)</b> Leche Chocolateada (LCH) y <b>(b)</b> Leche de Soja con jugo de manzana (LS) suplementada con el polvo de calabaza conteniendo el <i>L. casei</i> ( $\bullet$ ) y las bebidas sin suplementar ( $\blacktriangle$ ) (sistemas controles).	-93-
<hr/>	
<b>Figura III.1.</b> Viabilidad del <i>L. casei</i> en el polvo de calabaza durante el almacenamiento.	-109-
<b>Figura III.2.</b> Supervivencia a la digestión <i>in vitro</i> del <i>L. casei</i> contenido en el polvo de calabaza almacenado a 8 °C <b>(a)</b> y 22 °C <b>(b)</b> .	-111-
<b>Figura III.3.</b> Parámetros de color de <b>(a)</b> luminosidad ( $L^*$ ), <b>(b)</b> chroma, <b>(c)</b> $a^*$ , y <b>(d)</b> $b^*$ en el polvo de calabaza en función del tiempo de almacenamiento.	-115-
<b>Figura III.4.</b> Imagen del polvo a base subproductos de calabaza como matriz soporte del <i>L. casei</i> .	-115-
<b>Figura III.5.</b> Termograma de las curvas de flujo de calor en función de la temperatura.	-122-
<b>Figura III.6.</b> Reducción logarítmica de la viabilidad del <i>L. casei</i> soportado en el polvo de calabaza suplementado a una bebida láctea tratada térmicamente a 50 y 63 °C.	-125-
<hr/>	
<b>Figura IV.1.</b> Estructura molecular del inositol hexafosfato.	-132-
<b>Figura IV.2.</b> Estructura molecular de la rafinosa y estaquiosa.	-132-
<b>Figura IV.3.</b> Semillas del poroto de soja ( <i>Glycine max</i> ).	-135-
<b>Figura IV.4.</b> Curva típica representativa del Ensayo de Perfil de Textura.	-138-
<b>Figura IV.5.</b> Superficies de respuesta de las variables respuesta <b>A)</b> Delta UFC, <b>B)</b> Capacidad de retención de agua, <b>C)</b> Firmeza , <b>D)</b> Ángulo de tono, <b>E)</b> Chroma, y <b>F)</b> Luminosidad.	-148-
<b>Figura IV.6.</b> Imagen de los sistemas del diseño experimental para la formulación del postre a base de leche de soja.	-151-

<b>Figura IV.7.</b> Barrido de frecuencia del postre a base leche de soja almacenado a 8 °C.	-157-
<b>Figura IV.8.</b> Cambios de la viscosidad aparente ( $\eta$ ) en función de la velocidad de esfuerzo de corte ( $\dot{\gamma}$ ) en las distintas formulaciones del postres a base de leche de soja.	-158-
<b>Figura IV.9.</b> Curvas características del ensayo de Análisis del Perfil de Textura de los postre a base de leche de soja.	-161-
<b>Figura C.1.</b> Diagrama de flujo del proceso para la elaboración del PC a escala piloto.	-171-

---

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **Desnutrición por carencia de micronutrientes: Anemia por deficiencia de hierro**

La desnutrición por carencia de micronutrientes (DNM) está extendida principalmente en los países industrializados, pero son los países en desarrollo los que se ven más afectados. Esta situación puede involucrar a todos los grupos etarios de la población, siendo los niños y las mujeres en edad reproductiva quienes tienden a ser los más vulnerables de padecer deficiencias de micronutrientes. Estas deficiencias poseen diversos efectos adversos sobre la salud humana, los cuales no todos son clínicamente evidentes, e incluso moderados niveles de deficiencias, que pueden ser detectados por mediciones bioquímicas o clínicas, pueden tener serias consecuencias en las funciones del cuerpo humano (World Health Organization & Food and Agricultural Organization of United Nations [WHO & FAO], 2006).

La existencia de DNM también tiene profundas implicaciones sobre la productividad y el desarrollo económico y social de los países, principalmente en términos de costos en la salud pública y en la pérdida de la formación de capital humano (WHO & FAO, 2006).

En términos de salud pública, la DNM es una preocupación no sólo por el gran número de personas que se ven afectadas, sino también porque sigue siendo un factor de riesgo para muchas enfermedades que pueden contribuir a altas tasas de morbilidad e incluso mortalidad (WHO & FAO, 2006).

Dentro de los nutrientes carenciales con mayor incidencia, se encuentran la desnutrición proteico-energética, la hipovitaminosis A y los trastornos por carencia de yodo, los cuales demuestran a nivel mundial una clara tendencia a la declinación. Sin embargo, la anemia por deficiencia de hierro muestra un aumento en su prevalencia, representando el principal problema nutricional carencial en términos de magnitud y distribución espacial. A diferencia de otras DNM, su incidencia afecta tanto a países industrializados como en vía de desarrollo (Souto de Olivera, 2009).

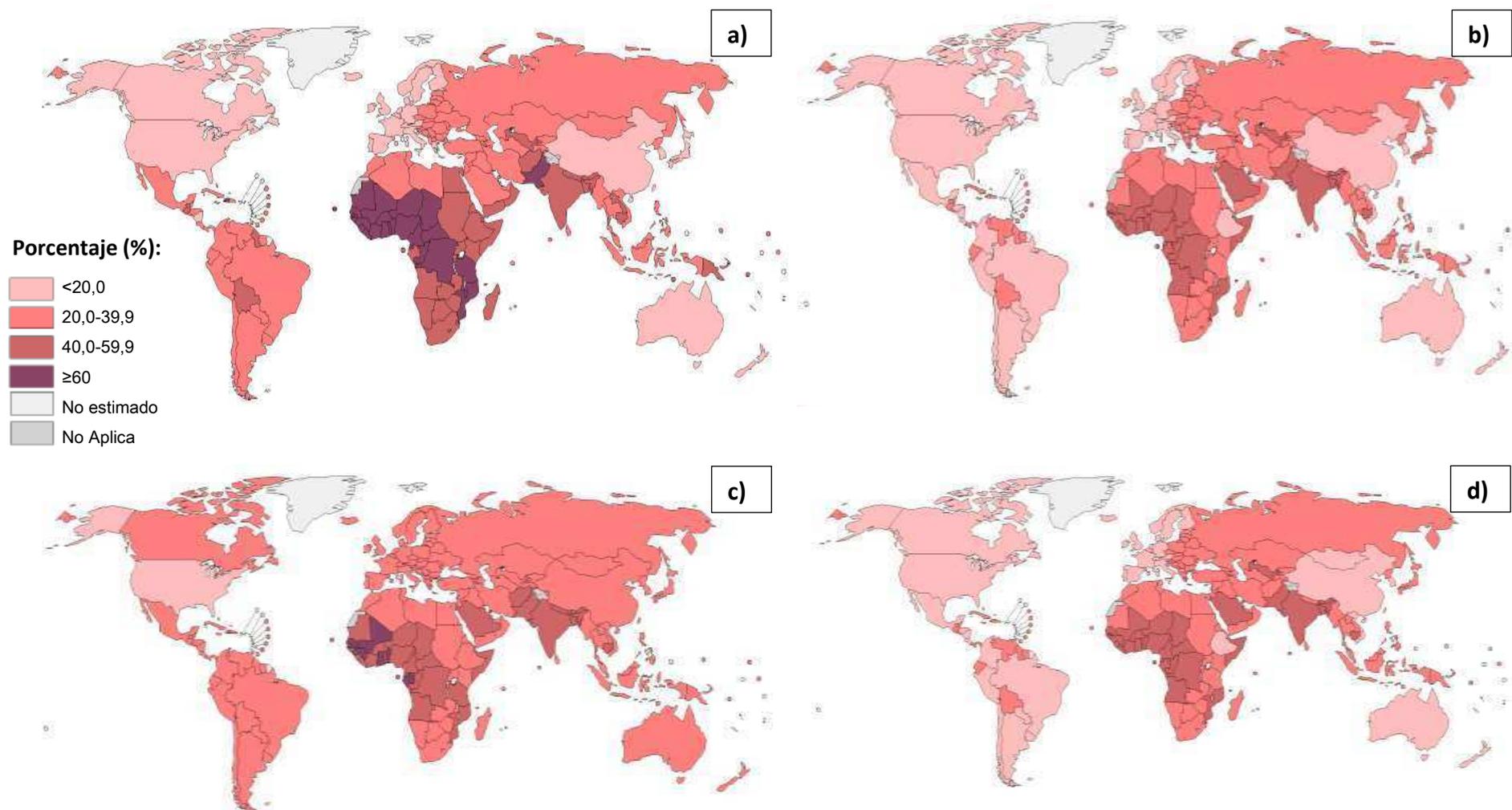
La causa habitual de la anemia es la carencia de hierro, la cual puede deberse por déficit nutricional de hierro en la dieta, deficiencias de ácido fólico, vitamina B<sub>12</sub> y proteínas. Incluso la carencia de vitamina A también está asociada a la anemia (Mehansho, 2006).

La deficiencia nutricional de hierro (DNH) se produce cuando la dieta no suministra suficiente hierro biodisponible para satisfacer las necesidades de crecimiento, embarazo y para reemplazar el hierro que se pierde en el tracto gastrointestinal, piel, orina, y durante del periodo menstrual (Lynch, 2011).

Algunas de las principales consecuencias de la anemia por deficiencia de hierro son la reducción de la capacidad de trabajo físico, el menor rendimiento escolar en los niños, el aumento de la

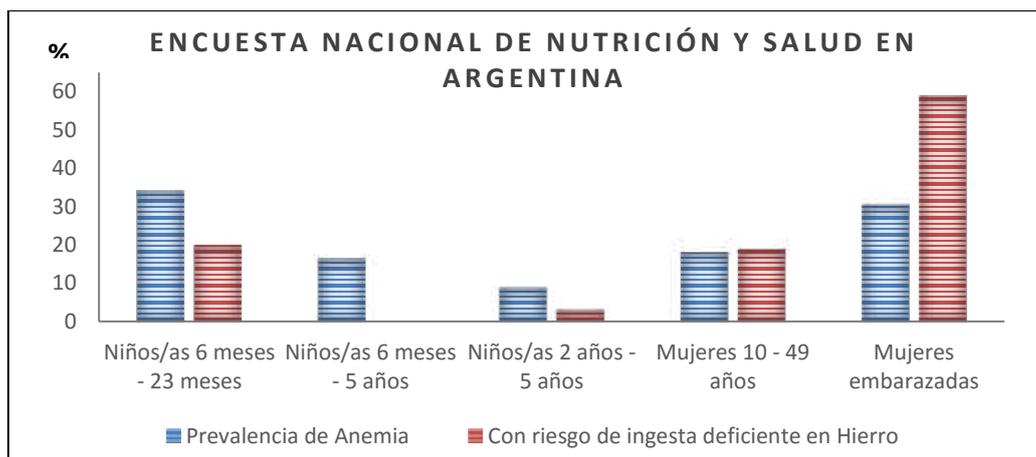
morbilidad y la mortalidad materna, y el mayor riesgo de parto prematuro y la mortalidad neonatal temprana en recién nacidos (Lynch, 2011; Zimmermann & Hurrell, 2007). Además, en términos económicos para un país, la pérdida de productividad promedio anual como consecuencia de la deficiencia de hierro de una población puede llegar a afectar el 4,05% del producto bruto interno (Lynch, 2011).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que la prevalencia de anemia afecta a 800 millones de niños y mujeres a nivel mundial, afectando principalmente a niños (43%), mujeres embarazadas (38%), y mujeres en edad reproductiva (29%) (WHO, 2015). A los efectos de una mayor comprensión sobre la magnitud de esta DNM a nivel mundial se muestran en las **Figura 1a, b, c y d** el porcentaje de prevalencia de anemia para cada país:



**Figura 1.** Prevalencia de anemia a nivel mundial en porcentaje **(a)** niños de 6-59 meses, **(b)** mujeres en edad reproductiva entre 15-49 años, **(c)** mujeres embarazadas entre 15-49 años, y **(d)** mujeres no embarazadas entre 15-49 años. Fuente: WHO (2015).

En Argentina, la última Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS 2004-2005) llevada a cabo en el año 2005, informó que la prevalencia de anemia afectaba principalmente a los niños entre 6 y 23 meses y a las mujeres embarazadas; mientras que, el riesgo de ingesta de hierro de la dieta reveló datos aún más preocupantes, afectando al 59% de las mujeres embarazadas y el 20% de las mujeres y niños de 6 a 23 meses (**Figura 2**) (Kogan et al., 2008). Es interesante resaltar que estos datos estadísticos obtenidos hace más de una década no distan mucho de los reportados recientemente por la OMS (WHO, 2015).



**Figura 2.** Prevalencia de anemia y riesgo de ingesta deficiente en hierro en la población Argentina.

Fuente: ENNyS 2004-2005.

En muchos países, la prevalencia de anemia es aun considerada una problemática nutricional sin una solución alcanzable a largo plazo, y esta premisa se confirma en el Informe publicado por la Secretaria Mixta de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) junto con la OMS en la Segunda Conferencia Internacional sobre Nutrición llevada a cabo en el año 2014; en donde, la comunidad científica expresa su preocupación de que a pesar de los esfuerzos realizados en muchos países en las últimas décadas, aún no se logrado reducir la prevalencia de anemia en sus poblaciones (FAO & OMS, 2015). Incluso, resaltan la importancia de que la reducción de la anemia en niños y mujeres debería ser un componente importante en todas las políticas de salud de los países que aún se ven afectados por esta DNM.

En paralelo, la OMS ha incluido a la anemia como la segunda meta global de nutrición para el año 2025, poniéndose como objetivo reducir un 50% la anemia en mujeres en edad reproductiva (WHO, 2015).

### **Fortificación de Alimentos: Concepto, Aspectos Tecnológicos y Nutricionales**

La fortificación de alimentos se refiere a la adición de uno o más nutrientes a un alimento a fin de mejorar su calidad para las personas que lo consumen, en general con el objeto de reducir o controlar una carencia de nutrientes (Ottaway, 2008).

Hasta el momento, la fortificación de alimentos es considerada la estrategia más costo-efectiva para proporcionar hierro adicional a poblaciones con alta prevalencia de DNH. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta política no siempre alcanza a la población objetivo, como por ejemplo a los grupos de riesgo que dependen de la agricultura de subsistencia y no tiene acceso a alimentos procesados. Para ello, la FAO junto con la OMS han definido las directrices sobre la fortificación de alimentos con micronutrientes y han propuesto una clasificación en función de la población objetivo: 1) fortificación en masa; 2) fortificación objetivo; 3) fortificación impulsada por el mercado (WHO & FAO, 2006).

La mayoría de los países han adoptado como estrategia para reducir la DNH la fortificación en masa, y para ello han seleccionado como soporte o vehículo aquellos alimentos ampliamente consumidos por los grupos de riesgo. La selección del alimento vehículo depende exclusivamente de la disponibilidad y accesibilidad a la población, y entre los más comunes podemos mencionar las harinas, cereales y productos lácteos; no existiendo al momento frutas y/o vegetales destinados a la fortificación en masa con micronutrientes. Por ejemplo, en Canadá y Estados Unidos, la harina de trigo se fortifica con hierro desde la década de 1940; mientras que, en Argentina la fortificación de la harina de trigo con sulfato ferroso, ácido fólico, tiamina, riboflavina y niacina para prevenir las anemias y las malformaciones del tubo neural comenzó a ser de carácter obligatorio a partir de agosto del 2003 con la entrada en vigencia de la Ley 25.630.

En cuanto al ámbito regulatorio local, el Código Alimentario Argentino (C.A.A.) en su artículo 1363 define como "*alimentos fortificados*" a aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente. La porción del alimento fortificado deberá aportar entre un 20% y 50% de los Requerimientos Diarios Recomendados para minerales (**Tabla 1 y 2**).

A su vez, también se establece que los nutrientes incorporados deberán: a) ser estables en el alimento en las condiciones habituales de almacenamiento, distribución, expendio y consumo y presentar una adecuada biodisponibilidad; b) no presentar incompatibilidad con ninguno de los componentes del alimento ni con otro nutriente agregado, y c) estar presente en niveles tales

que no ocasionen una ingesta excesiva por efecto acumulativo a partir de otras fuentes de la dieta.

**Tabla 1.** Ingesta diaria recomendada en mujeres y hombres.

Nutriente	Unidad	Mujeres				Hombres
		19 - 50 años	> 50 años	Embarazo	Lactancia	
Hierro	mg	29	11	27	15*	14

**Tabla 2.** Ingesta diaria recomendada en lactantes y niños.

Nutriente	Unidad	Lactantes		Niños 1-9 años		
		0-6 meses	7-11 meses	1-3 *	4-6 *	7-9 *
Hierro	Mg	0,27	9	6	6	9

\* 10 % de biodisponibilidad. Fuente: Anexo A del artículo 1363, Capítulo XVII del C.A.A.

La fortificación con fuentes de hierro biodisponibles representa múltiples desafíos en la aceptación del producto, la vida útil y la eficacia en mejorar el estado de hierro en los individuos. El éxito de la fortificación de hierro depende de la cantidad de hierro biodisponible, el cual asimismo, no debiera afectar el sabor y la apariencia del producto finalmente consumido. Dentro de los principales obstáculos que presenta la fortificación con hierro se encuentran: 1) gusto metálico, 2) sabor desagradable como resultado de la rancidez producida por oxidación de las grasas, 3) cambios indeseables en el color como resultado de interacciones con antocianinas, flavonoides y taninos, y 4) degradación de vitaminas (por ejemplo, Vitamina C y Vitamina A, factores que favorecen la absorción y utilización del hierro) y minerales (Mehansho, 2006).

Además, es importante tener en cuenta los factores intrínsecos propios de la matriz vehículo y los factores extrínsecos, como por ejemplo componentes de la dieta, pueden interactuar con el mineral y, en consecuencia, reducir la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del mismo.

El hierro se encuentra bajo dos formas químicas en los alimentos, como hierro no-hemínico (no-hem) en forma de complejos férricos poco solubles en los alimentos vegetales, y como hierro hemínico (hem) en los alimentos de origen animal. Si bien, el hierro no-hem es pobremente absorbido (< 10%) comparado con el hierro hem (15-35%), existen factores nutricionales que intervienen en su absorción positivamente, como es el caso de la presencia de Vitamina C y Vitamina A o negativamente como es la presencia de fitatos, polifenoles y calcio (Péneau y col., 2008; Zimmermann y Hurrell, 2007).

La presencia de ácido ascórbico (Vitamina C) favorece la absorción en el tracto intestinal del hierro no-hem mediante su reducción al estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ), y actúa en los alimentos como

agente reductor manteniendo el hierro en su forma soluble ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (Souto de Olivera, 2009). Asimismo, posee una acción antioxidante a través de la neutralización de los radicales libres a nivel celular (Rojas, 1995). A su vez, algunos estudios han revelado que la Vitamina A y, más aún, los  $\beta$ -carotenos, incrementan significativamente la biodisponibilidad de hierro. El mecanismo aún no ha sido dilucidado claramente; sin embargo, se especula que una formación compleja mantiene el hierro soluble en el lumen intestinal evitando efectos inhibitorios de otros componentes de la dieta como taninos y polifenoles. Como consecuencia, la presencia de  $\beta$ -carotenos que confiere el color característico a algunos alimentos, por ejemplo la calabaza, también podría contribuir a mejorar la biodisponibilidad de hierro (de Escalada Pla, Campos, Gerschenson, & Rojas, 2009).

Por otra parte, el hierro contenido en los alimentos sufre modificaciones durante su trayecto por el tracto gastrointestinal. En un principio es reducido por las secreciones gástricas que lo mantienen en su forma soluble ( $\text{Fe}^{+2}$ ), pero al llegar al tracto intestinal las secreciones de bicarbonato del páncreas producen un incremento del pH que inhibe la absorción del hierro mediante la formación de quelatos insolubles (Gil, 2010). Por ello, es interesante llevar a cabo ensayos *in vitro* o *in vivo* a fin de evaluar el efecto de la matriz alimentaria soporte y obtener datos reales de la cantidad del mineral que se encontrará bioaccesible.

Actualmente, existen una serie de fuentes de hierro disponibles como fortificantes de alimentos. Las fuentes de hierro con *alta biodisponibilidad*, por ejemplo el sulfato ferroso y el fumarato ferroso, son los compuestos de elección primaria para ser utilizados en la fortificación de alimentos. Estas fuentes de hierro se caracterizan por ser solubles en medios acuosos neutros y/o ácidos, pero pueden causar cambios organolépticos y afectar la aceptabilidad y la vida útil del producto. Hasta el momento, el desarrollo de tecnologías de fortificación que mejoren la compatibilidad entre las fuentes de hierro con alta biodisponibilidad y el vehículo alimenticio continúa siendo un reto para los científicos y la industria de la alimentación (Mehansho, 2006).

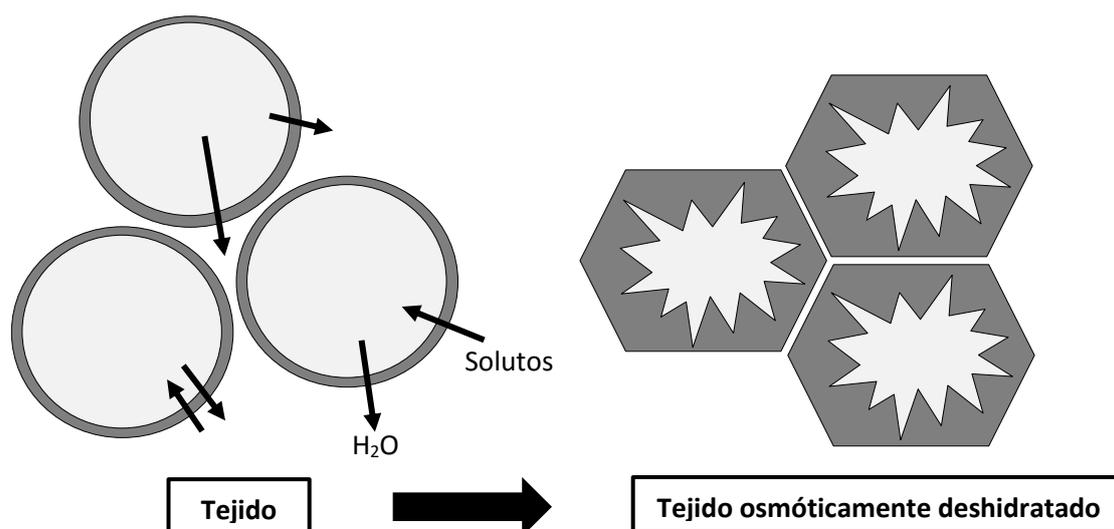
#### **Fortificación de Matrices Vegetales mediante Proceso de Infusión en seco**

El éxito de la fortificación con hierro en el tratamiento de la prevalencia de anemia por DNH, especialmente en los países en desarrollo, muchas veces se ha visto condicionada por la falta de una fortificación robusta, simple y de fácil transferencia tecnológica (Mehansho, 2006).

El proceso de infusión en seco podría ser una buena alternativa para la fortificación de alimentos con micronutrientes. El proceso consiste en adicionar agentes osmóticos (glucosa, sacarosa) directamente sobre la fruta y/o vegetales, y basado en el principio de la deshidratación osmótica las células buscarán alcanzar el equilibrio entre la presión osmótica intracelular y la solución

osmótica circundante. Por lo tanto, la elevada presión osmótica del medio exterior debido a la presencia de los agentes osmóticos dará comienzo al proceso de difusión de solutos y agua a través de las membranas celulares semi-permeables, provocando la deshidratación del producto mediante la liberación de agua al medio exterior y la ganancia de sólidos en el interior de las células. El proceso de deshidratación osmótica finalizará cuando la presión osmótica intracelular y extracelular alcance el equilibrio, resultando en una pérdida significativa del volumen inicial del alimento (**Figura 3**). En general el proceso de deshidratación osmótica es lento, y depende de la estructura celular y permeabilidad de las membranas (Ahmed, Qazi, & Jamal, 2016).

Esta técnica es considerada una práctica económica y factible de aplicar en vegetales y/o frutas cosechados en áreas rurales para prolongar su vida útil y dar valor agregado a la materia prima. Además, desde un punto de vista de sustentabilidad del proceso el consumo de agua se reduce drásticamente y el agua parcialmente drenada del tejido se lleva a cabo mediante bajo consumo energético a diferencia de las deshidrataciones osmóticas realizadas con soluciones isotónicas/hipertónicas (Alzamora, Guerrero, Nieto, & Vidales, 2004).



**Figura 3.** Esquema de transferencia de agua y solutos durante el proceso la deshidratación osmótica y cambios estructurales de las células.

Fuente: adaptado de Ahmed et al. (2016).

Si bien existe vasta información respecto del enriquecimiento o fortificación de matrices vegetales con calcio utilizando el proceso de deshidratación osmótica, hasta el momento escasas referencias bibliográficas se han publicado sobre el efecto de la presencia de hierro sobre las propiedades texturales en matrices vegetales. Por ejemplo, autores como Barrera, Betoret, & Fito (2004) han estudiado la influencia de la presencia de este mineral sobre la cinética de deshidratación osmótica en soluciones isotónicas en tejido de manzana. En este

trabajo los autores concluyeron que la presencia de hierro no afectó la cinética de deshidratación; sin embargo, aspectos como la pérdida del mineral en la solución de impregnación deberían tomarse en cuenta. En línea con lo reportado por Barrera et al. (2004), Betoret, Martínez-Monzo, Fito, & Fito (2005) informaron que el flujo neto de líquido externo y la elasticidad de la matriz de manzana cruda no se vieron afectados con las concentraciones de hierro estudiadas durante la impregnación al vacío en soluciones isotónicas o hipertónicas.

Recientemente, Hironaka, Oda, & Koaze (2014) han evaluado el enriquecimiento de tejido de papa con hierro mediante impregnación al vacío y cocción al vapor, concluyendo que el contenido final del mineral fue 6,4 veces superior comparado con el tejido crudo.

En un estudio llevado a cabo por de Escalada Pla, Campos, Gerschenson, & Rojas (2009) se comprobó que el tejido de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) podría ser adecuado para el enriquecimiento con hierro. En este estudio, la fortificación con hierro se realizó durante la etapa de enfriamiento posterior al escaldado al vapor, permitiendo una retención de aproximadamente del 50% del mineral en el producto final.

En trabajos previos, se estudió la fortificación de tejido de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) con hierro y ácido ascórbico mediante un proceso de impregnación en seco, en donde se observó que la presencia de los fortificantes promovió la deshidratación osmótica y la pérdida de agua durante el proceso de secado en convección (Genevois, Flores, & de Escalada Pla, 2014a). Asimismo, la aplicación de coberturas comestibles a base de almidón de tapioca y kappa-carragenato conteniendo el mineral mejoraron notablemente la bioaccesibilidad del hierro y redujeron significativamente la cinética de degradación del ácido ascórbico en un snack listo para consumir a base de calabaza (Genevois, de Escalada Pla, & Flores, 2015).

### **Preservación de alimentos mediante Tecnología de Barreras y aplicación de Coberturas Comestibles**

La preservación de alimentos implica colocar a los microorganismos en un ambiente hostil con el objeto de inhibir su crecimiento, reducir su supervivencia y/o causar la muerte celular. Si la homeostasis de los microorganismos, por ejemplo su equilibrio interno, se interrumpe por factores de estrés o “barreras” presentes en el alimento, ellos no se multiplicarán y, por ejemplo, permanecerán en una fase lag o incluso pueden llegar a morir antes que su homeostasis se restablezca o repare.

El concepto de “Tecnología de Barreras” o “Métodos Combinados”, se basa en una combinación de barreras que aseguran y/o mejoran la estabilidad microbiológica y la inocuidad, como así también las propiedades sensoriales y nutritivas de un alimento (Leistner, 1995). Algunas de las

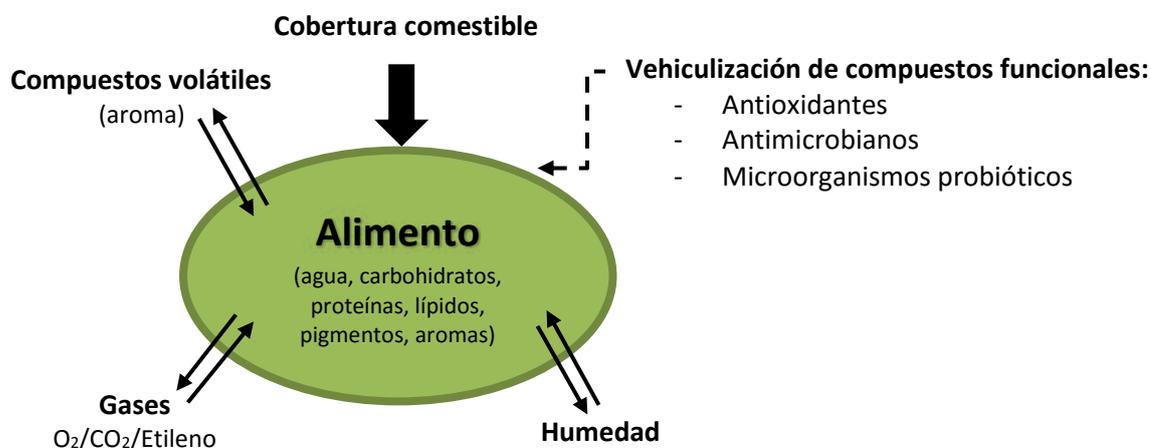
barreras más utilizadas para la preservación de alimentos son: temperatura, pH, actividad de agua, y uso de preservadores. La aplicación de una barrera puede tener un efecto positivo o negativo sobre la calidad total deseada del alimento, dependiendo de su intensidad. Sin embargo, en la práctica es más efectivo utilizar diferentes barreras en pequeñas cantidades que sólo una barrera con una intensidad mayor, debido a que diferentes barreras pueden alcanzar distintos objetivos y de esta forma pueden actuar sinérgicamente.

Entre las tecnologías emergentes para la optimización de la preservación de alimentos surge como novedosa alternativa el empleo de recubrimientos comestibles en forma de películas o coberturas que puedan impartir propiedades funcionales específicas al alimento.

En el caso de la coberturas comestibles (CC), la técnica consiste en aplicar una delgada capa de un material comestible sobre la superficie de un alimento en forma de membrana para reducir la pérdida de humedad y la migración de solutos, el intercambio gaseoso, la respiración y la tasa de reacción oxidativa, prolongando de esta forma la vida útil del mismo (**Figura 4**) (Dhall, 2013; Lin & Zhao, 2007).

Los potenciales beneficios de la aplicación de CC están asociados a:

1. Retardar la migración de humedad.
2. Retardar el transporte de gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ , etileno).
3. Restringir el intercambio de compuestos volátiles entre el producto y el medio ambiente, previniendo la pérdida de compuestos aromáticos volátiles y componentes del color.
4. Retardar la migración de aceites y grasas.
5. Retardar el transporte de solutos.
6. Mejorar las propiedades mecánicas frente al manipuleo e impartir integridad estructural adicional a los alimentos.



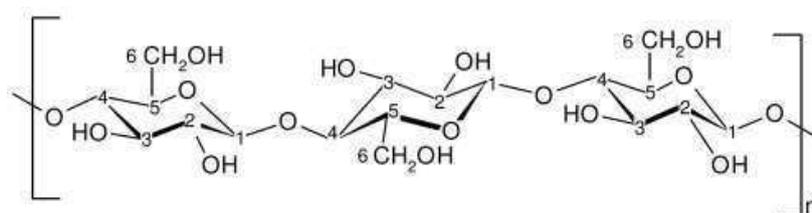
**Figura 4.** Propiedades funcionales de las coberturas comestibles en los alimentos.

Las CC, además de presentar ventajas como biodegradabilidad y la posibilidad de ser ingeridos, son una vía importante para actuar como barrera o para la incorporación de aditivos alimentarios como antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes, aromatizantes, colorantes, compuestos bioactivos, los cuales pueden mejorar su apariencia, textura, sabor, propiedades durante el almacenamiento y calidad nutricional (**Figura 4**) (Rojas-Graü, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009).

Los materiales utilizados para la formulación de las CC deben ser “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) dado que serán consumidos junto con el alimento. Existe una amplia variedad de materiales comestibles que pueden ser incluidos solos o combinados para la formulación de CC, por ejemplo lípidos, proteínas y polisacáridos.

Dentro de los polisacáridos más estudiados como CC se encuentran: almidón y sus derivados, celulosa y sus derivados, alginatos, caragenatos, gomas provenientes de plantas y microorganismos, quitosano y pectinatos.

La celulosa es un biopolímero de unidades de anhidroglucosa unidas por enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicos, su grado de polimerización puede variar entre 100 y 3500 unidades de anhidroglucosa. La configuración  $\beta(1\rightarrow4)$  da como resultado una estructura lineal y rígida del polímero (**Figura 5**). La relativa abundancia de grupos hidroxilo y la tendencia a formar puentes hidrógeno tanto intra como intercatenarios es la causa de la formación de agregados lineales los cuales contribuyen a la rigidez de las paredes celulares y a la relativa insolubilidad de la celulosa en los solventes comunes, particularmente el agua. Estas características limitan su uso en los alimentos, razón por la cual se la modifica químicamente para hacerla soluble y conferirle diversas propiedades de acuerdo al tipo de derivatización realizada. Existen una gran diversidad de celulosas modificadas dependiendo del tipo de reacción química, tipo de sustituyente, porcentaje de sustitución y grado de polimerización, los cuales modifican la capacidad de retención de agua, la sensibilidad a los electrolitos, la solubilidad, las propiedades de gelación, etc.

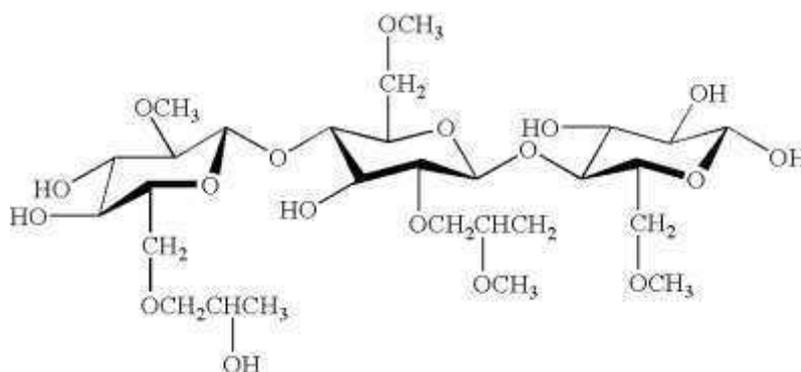


**Figura 5.** Estructura química de la celulosa.

La carboximetilcelulosa, la hidroximetilcelulosa y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) son algunas de las celulosas modificadas que se encuentran disponibles comercialmente y que se caracterizan por presentar buenas propiedades para la conformación de películas y CC. Estos materiales son inoloros, no poseen sabor, flexibles, de moderada resistencia, transparentes, solubles en agua, resistentes a grasas y lípidos, y moderadamente permeables al oxígeno y la humedad (Dhall, 2013; Lin & Zhao, 2007).

- **Hidroxipropilmetilcelulosa: aplicaciones en la industria alimentaria**

La HPMC es un derivado de celulosa que presenta en su cadena grupos metilo e hidroxipropilos (Figura 6). Para este compuesto existen posibilidades de distinto peso molecular, viscosidad, grado de sustitución y sustitución molar. A lo largo de la cadena de celulosa, los grupos metilos constituyen zonas hidrofóbicas mientras que los grupos hydroxipropilos son más hidrofílicos. La presencia de estos substituyentes le confiere a la HPMC posibilidades de comportarse como surfactante. La utilidad de los éteres no iónicos de celulosa se basa, fundamentalmente, en cuatro atributos: son espesantes eficientes, presentan actividad superficial, tienen la habilidad de formar películas interfaciales y la capacidad de formar geles termorreversibles. Las interacciones hidrofóbicas son responsables de la formación de los geles de HPMC durante el calentamiento. A medida que la temperatura aumenta, las moléculas adsorben energía traslacional y pierden gradualmente su hidratación, resultando en una menor viscosidad. Debido a las interacciones entre los grupos hidrofóbicos se producen las interacciones polímero-polímero, causando así opacidad en la solución y una red infinita que provoca un aumento brusco en la viscosidad y la turbidez, dependiendo de la concentración del biopolímero en la solución (Miramont, 2012).



**Figura 6.** Estructura química de la hidroxipropilmetilcelulosa.

La HPMC es un polisacárido que tiene numerosas aplicaciones en la industria alimentaria y en el ámbito de la industria de pinturas, la cosmética y la farmacéutica.

El C.A.A. en su Capítulo XVIII permite la inclusión de la HPMC como aditivo para la elaboración de productos alimenticios cumpliendo funciones de estabilizante, emulsificante o emulsionante, espesante y agente de masa.

En la industria alimentaria, la HPMC es empleada en una gran gama de productos alimenticios, por ejemplo para la elaboración de panificados debido a que mejora la retención de gases producidos durante la fermentación de la masa. En este aspecto, también se han realizado recientemente algunos avances en la incorporación de HPMC como sustituto del gluten en panificados libres de gluten (Kittisuban, Ritthiruangdej, & Suphantharika, 2014).

En productos fritos, se utiliza como un ingrediente en el rebozador ya que tiene de formar un gel alrededor del alimento bloqueando en simultáneo la pérdida de humedad y la absorción de aceite durante la cocción (Miramont, 2012).

La HPMC también se utiliza como espesante y como ligante de agua reduciendo la sinéresis en alimentos fluidos como salsas, sopas, jarabes y yogures. Pueden proveer además estabilidad evitando la coalescencia de gotas en emulsiones durante el almacenamiento.

En los productos batidos, la HPMC cumple la función de estabilizar el sistema y mantener la integridad estructural de la fase que encierra el aire. También ha demostrado tener buenas propiedades emulsificantes (Camino, 2010). En productos congelados contribuye al control del crecimiento de los cristales; esta aplicación tiene mucha importancia en productos batidos congelados contribuyendo a la retención de aire, mejorando las propiedades texturales y sensoriales. En postres congelados bajos en calorías se lo utiliza para producir texturas similares a la generada por los lípidos.

En los últimos años, la HPMC ha ganado interés para la formulación de películas o CC aplicadas a una amplia variedad de alimentos, especialmente frutas y vegetales mínimamente procesados. La utilización de este biopolímero en CC provee de propiedades de barrera a la humedad y CO<sub>2</sub>, y presenta buena adhesión al alimento. Algunos ejemplos de las aplicaciones más estudiadas son el recubrimiento de bananas, arándanos, tomates cherries, naranjas y mandarinas. Sin embargo, muchas veces la formulación de CC a base de HPMC se realiza junto con componentes hidrofóbicos, como ceras o ácidos grasos saturados, con el objetivo de mejorar sus propiedades de permeabilidad al vapor de agua y pérdida de humedad (Fagundes, Palou, Monteiro, & Pérez-Gago, 2015; Osorio, Molina, Matiacevich, Enrione, & Skurtys, 2011; Valencia-Chamorro, Pérez-Gago, del Río, & Palou, 2009; Zhang, Rempel, & McLaren, 2014).

Por otro lado, las CC a base de HPMC además de vehiculizar compuestos bioactivos, también podrían ser adecuadas como matriz soporte y/o protección de microorganismos probióticos. Sin

embargo, hasta el momento el desarrollo de CC conteniendo probióticos es aún una temática de investigación emergente con muy pocos trabajos publicados al momento (Espitia, Batista, Azeredo, & Otoni, 2016).

Autores como Tapia et al. (2007) han estudiado la vehiculización de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 en CC a base de alginato o gelanos aplicados a trozos de manzana y papaya mínimamente procesados, obteniendo un recuento viable  $>10^6$  UFC/g durante 10 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración (2 °C).

Por otro lado, Soukoulis et al. (2014) evaluaron la aplicación de CC a base de alginato o combinadas con proteínas de suero vehiculizando *L. rhamnosus* GG aplicadas a la superficie de pan, seguido de un proceso de secado (60 °C-10 min; 180 °C-1 min). El *L. rhamnosus* en la CC a base de alginato/proteína de suero presentó mayor resistencia al secado (76,3%) respecto de la CC a base de alginato (15,9%); sin embargo la resistencia a las condiciones simuladas de digestión *in vitro* mostraron una mayor supervivencia del probiótico vehiculizado en la CC a base de alginato, confirmando el efecto protector de este biopolímero *per se*.

Recientemente, Tavera-Quiroz et al. (2015) estudiaron la vehiculización de *Lactobacillus plantarum* (CIDCA 83114) y fructooligosacáridos en CC a base de metilcelulosa en un snack de manzana deshidratado por convección (60 °C, 50 min). En este trabajo, los autores concluyeron luego de 90 días de almacenamiento a 20 °C la viabilidad del probiótico se redujo 1,4 ciclos log, presentando un recuento  $>10^6$  UFC/g luego de las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal *in vitro*, y que la aplicación de la CC no afectó las características organolépticas del producto.

En función de lo expuesto anteriormente, existe evidencia de que las CC conteniendo probióticos pueden ser aplicadas a una gran variedad de alimentos, ampliando de esta forma el mercado de alimentos funcionales, además de proveer de un efecto benéfico a la salud del consumidor. Por lo tanto, considerando las propiedades funcionales de la HPMC, resulta interesante evaluar la potencialidad de este biopolímero como vehículo y soporte de microorganismos probióticos en CC aplicadas a hortalizas, y su efecto sobre las características organolépticas en el producto final.

### **Microorganismos probióticos**

Por definición de la FAO y la OMS se define como microorganismos probióticos a “aquellos microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confiere un efecto benéfico a la salud del huésped”. Múltiples estudios han descrito sus beneficios en infecciones gastrointestinales, enfermedades inflamatorias intestinales, metabolismo de la lactosa,

disminución del colesterol en plasma, estimulación del sistema inmune, propiedades anti-mutagénicas y anti-carcinogénicas, actividad antimicrobiana, y supresión de infección por *Helicobacter pylori* (do Espírito Santo et al., 2012; Pereira, Maciel, & Rodrigues, 2011).

El consumo de alimentos probióticos ha incrementado notablemente en las últimas décadas como consecuencia de una mayor preocupación por parte de los consumidores en ingerir alimentos que impartan beneficios adicionales a la salud. Este creciente interés se vio reflejado en las ventas globales de alimentos probióticos, las cuales incrementaron entre el año 2010 y 2011 de 21,6 a 24,2 billones de dólares, respectivamente, y se estima que para el año 2020 el mercado global de probióticos será valorado en 96 billones de dólares. Estas cifras han despertado la atención de la industria alimentaria e investigadores en desarrollar nuevos alimentos que contengan probióticos (Espitia et al., 2016).

Asimismo, dentro del mercado de alimentos probióticos existe un creciente interés en el desarrollo de productos que puedan ser consumidos por individuos con dislipemias, intolerantes a la lactosa o proteínas lácteas, o con hábitos alimentarios como vegetarianos o veganos (Martins et al. 2013). Sin embargo, hasta el momento existe escasa información sobre el efecto de la adición de probióticos a matrices vegetales, y entre las matrices más estudiadas se encuentran los jugos a base de fruta, frutas o vegetales mínimamente procesados, snacks, y bebidas a base de cereales (Martins et al. 2013, Pereira et al. 2011).

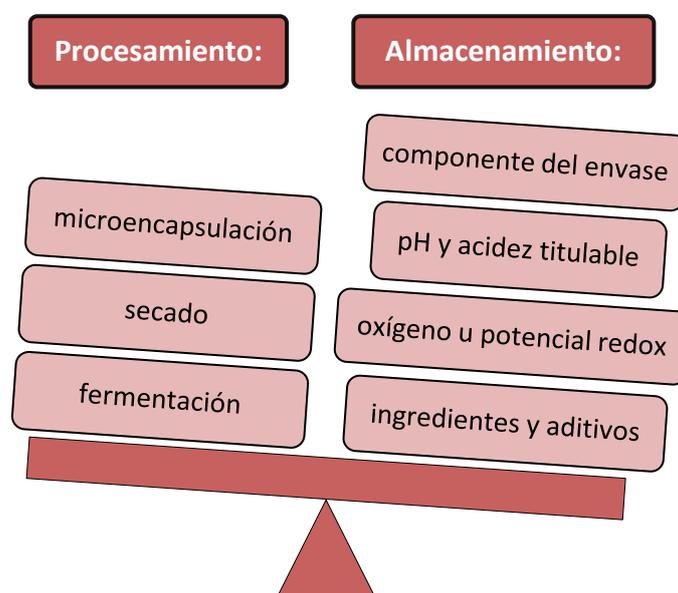
Una extensa bibliografía soporta la premisa de que el consumo de alimentos que contienen microorganismos probióticos y prebióticos ayudan a promover la flora benéfica intestinal, promoviendo la salud y el bienestar de las personas (Ranadheera, Evans, Adams y Baines, 2012; WHO & FAO, 2006). El modo de acción de los microorganismos probióticos sobre la flora colónica en términos generales es a través de la colonización, la resistencia y la exclusión competitiva de los microorganismos patógenos residentes del tracto intestinal. De acuerdo a Oelschlaeger (2010) existen tres formas de agrupar el modo de acción de estos microorganismos: (1) mediante la modulación del sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido del huésped, actuando en la prevención de enfermedades por infección y el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas del tracto digestivo; (2) a través del efecto directo sobre otros microorganismos patógenos, y en consecuencia, teniendo un efecto en la prevención y el tratamiento de infecciones, y la restauración del equilibrio de la flora benéfica del colon; y (3) finalmente, el efecto puede basarse en la síntesis de toxinas resultando en la inactivación de otros microorganismos.

No obstante, para que los probióticos ejerzan su efecto benéfico sobre el huésped deben mantener su efectividad y potencialidad durante las condiciones de procesamiento y la vida útil

del alimento, resistir la exposición a los jugos gástricos e intestinales, y por último, lograr crecer y colonizar el tracto intestinal (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter y Bressollier, 2013).

En cuanto al marco regulatorio local, para que un alimento sea considerado probiótico al momento de su consumo debe presentar una carga de células probióticas viables entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC  $g^{-1}$  (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT], 2011), siendo estos requisitos similares a los establecidos por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Food and Safety Authority (EFSA).

Existen diversos factores que pueden afectar la viabilidad y funcionalidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento. Algunos de los factores más importantes se detallan en la **Figura 7**:



**Figura 7.** Factores que afectan la viabilidad de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento.

Fuente: Tripathi & Giri (2014).

Hasta el momento las bacterias probióticas ampliamente utilizadas y estudiadas son las bacterias ácido lácticas (LAB), siendo las cepas del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* las más populares. Estas cepas se caracterizan por su resistencia a los jugos gástricos e intestinales, su adherencia a la mucosa del colon y rápida multiplicación en el tracto intestinal (Soccol et al., 2010).

- ***Lactobacillus casei***

El *Lactobacillus casei* es una BAL anaerobia facultativa Gram (+) que posee una notable variabilidad fenotípica y genotípica, lo que le permite colonizar diversos ecosistemas, entre ellos el tracto gastrointestinal humano. Además, existe evidencia científica mediante ensayos *in vitro/in vivo* que demuestran que el *L. casei* ATCC-393 posee un potencial efecto contra la proliferación de células de carcinoma de colon, reduce la absorción de colesterol a nivel intestinal, y es capaz de modular la flora intestinal microbiana y adherirse en el colon con niveles compatibles con el efecto fisiológico (Abd El Helim, Hashem, Essam, & Mohamed, 2016; Choi et al., 2006; Lye, Rusul, & Liong, 2010; Saxami et al., 2012; Sidira et al., 2010; Tiptiri Kourpeti et al., 2015). Estas propiedades distintivas, convierten al *L. casei* ATCC-393 en un reconocido microorganismo con potencial efecto probiótico.

Esta bacteria se encuentra naturalmente en masas fermentadas, vinos y vegetales fermentados. En la industria alimentaria son utilizadas como cultivos *starters* del proceso de fermentación en leches fermentadas por su capacidad de intensificar y acelerar el desarrollo de compuestos aromáticos, y además, por su efectividad probiótica (Reale et al., 2015).

Entre las cualidades tecnológicas, el *L. casei* se destaca por su gran capacidad de adaptación a diversos sustratos y matrices alimentarias, así como su resistencia a amplios rangos de pH y temperatura. Además, presenta tolerancia a las condiciones ácidas, siendo una de las características de mayor interés para la industria alimentaria ya que podría mejorar su supervivencia a los procesos tecnológicos y durante su paso a través del tracto gástrico y, en consecuencia, aumentar su potencial para actuar positivamente a nivel intestinal (Bernárdez, Amado, Castro, & Guerra, 2008; Reale et al., 2015).

El ácido láctico es un metabolito secundario producido como resultado de la fermentación de los carbohidratos por parte de las BAL, y tiene mucho interés para la industria debido a las diversas aplicaciones en el ámbito farmacéutico, alimentación animal, cosmética, alimentos, etc. Debido a su capacidad de producir ácido láctico, el *L. casei* ha sido objeto de numerosos estudios dedicados exclusivamente a la optimización y maximización de la producción de este metabolito. Incluso, autores como Bernárdez, Amado, Castro, & Guerra (2008) han demostrado que el *L. casei* es un excelente productor de ácido láctico, llegando a producir entre 21,7 y 27,8 g de ácido láctico L<sup>-1</sup>.

Por lo tanto, considerando las características tecnológicas y su gran efectividad probiótica, el *L. casei* se convierte en un microorganismo ideal para el desarrollo de productos innovadores en el mercado de alimentos funcionales, especialmente en materia de desarrollo de alimentos de origen no-lácteo.

Existen varios estudios que han evaluado la vehiculización del *L. casei* mediante inoculación directa en distintas matrices vegetales con el objetivo de estabilizar la cepa, evaluar el efecto del procesamiento sobre la viabilidad y funcionalidad, y prolongar la vida útil del alimento probiótico (Guergoletto, Magnani, Martin, Andrade, & Garcia, 2010; Kourkoutas, Xolias, Kallis, Bezirtzoglou, & Kanellaki, 2005; Pereira et al., 2011). Sin embargo, hasta el momento no se han publicado estudios relacionados a la vehiculización de probióticos en tejido de zapallo y/o a la utilización de los subproductos de esta hortaliza como matriz soporte y/o sustrato para la producción de biomasa de *L. casei*.

### **Cucurbitáceas**

El zapallo es una de las numerosas especies que integran la gran familia de las Cucurbitáceas, y es considerada una hortaliza tradicional en Argentina de gran importancia económica, social y alimenticia. El zapallo integra la dieta alimenticia de nuestro pueblo desde épocas precolombinas. Existen cinco especies que el hombre ha domesticado para su alimentación: *Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *C. argyrosperma ex mixta*, y *C. ficifolia*. Las cuatro primeras especies se cultivan para consumo de sus frutos como zapallo o zapallito, y la última se destinada a la industria repostera (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], 2013).

El principal destino de la producción nacional es el mercado interno, y su disponibilidad durante todo el año se debe a que Argentina cuenta con zonas que permiten producciones de zapallo tempranas, tardías y de contra-estación entre el norte y el sur del país. Las principales provincias productoras en nuestro país son: Santiago del Estero, Córdoba, Tucumán, Santa Fe, Mendoza y Buenos Aires. Se estima que cada año se cultivan 37.000 hectáreas en el país, con una producción promedio de 18.000 kg/ha, generando una movilización de 434 millones de dólares (INTA, 2013).

La cultivar tipo Butternut (*Cucurbita moschata*) llamada comúnmente zapallo anquito o calabacita, es el zapallo más consumido en Argentina y en la mayoría de los países latinoamericanos (**Figura 8**). Esta hortaliza se consume durante todo el año, en todos los estratos sociales y de todas las edades, con un promedio de 22 kg per cápita por año, y es considerado una importante fuente de hidratos de carbono, fibra dietaria, vitaminas A y C, y aminoácidos esenciales (González, Montenegro, Nazareno, & López de Mishima, 2001). El aporte calórico es reducido comparado con otros vegetales, y es por ello que se encuentra incluido en la mayoría de las dietas hospitalarias, comedores comunitarios y programas de alimentación para niños. El color anaranjado intenso de la pulpa está asociado a altos contenidos de carotenos, con alta actividad como pro Vitamina A (INTA, 2013).



**Figura 8.** Zapallo de la variedad *Butternut*.

La utilización del fruto fresco de la *C. moschata* se destina principalmente para abastecer el mercado fresco de zapallos maduros, y en segundo lugar para uso industrial, especialmente deshidratados para la elaboración de sopas, caldos, conservas y congelados. Solo una pequeña parte de la producción nacional (1,5%) es destinada a la industria del deshidratado, siendo esta actividad principalmente desarrollada en la provincia de Mendoza. El resto de las plantas deshidratadoras que se encuentran en otras provincias producen deshidratado en escamas o cubos que luego son comercializados para la preparación de sopas de uso hospitalario o en comedores comunitarios y de escuelas. Estas empresas, además de comprar frutos de cultivos comerciales, compran parte del descarte que se origina en los cultivos comerciales por deformidades o tamaños inadecuados (INTA, 2013; Lang & Ermini, 2011).

La calidad del zapallo anquito se rige en función de la Resolución Nro. 634/2006 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de la Nación, determinando las características de calidad para el zapallo anco. No obstante, muchas veces la conservación de los frutos es afectada por diferentes factores, como por ejemplo los previos a la cosecha: fertilización inadecuada, escaldaduras, daños por bajas temperaturas, traumatismos y enfermedades. Además, existen factores propios a la cultivar como la uniformidad de la maduración, la firmeza de la pulpa, tendencia al rajado, susceptibilidad a enfermedades, deshidratación y tasa de respiración.

Cuando los estándares de calidad no se cumplen llevan a pérdidas del 100% del fruto, ocasionando grandes pérdidas económicas a los productores. Se estima que las pérdidas poscosecha exceden el 30 % en muchos países en desarrollo debido a la falta de infraestructura o a una infraestructura inadecuada para el manipuleo, almacenamiento y elaboración eficiente de la producción agrícola. También contribuyen a estas pérdidas el alto costo de las tecnologías de procesamiento y la falta de información o de un apropiado conocimiento técnico de los procesos (Alzamora et al. 2004).

Recientemente la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación analizó las causas, la magnitud y las consecuencias que alcanzan las pérdidas de alimentos en Argentina, con el objetivo de establecer bases para implementar políticas dirigidas a reducir la dimensión de este problema. En el marco de estas acciones, se creó mediante la Resolución Ministerial N° 392/2015 el Programa Nacional de Reducción de Pérdida y Desperdicio de Alimentos (Ministerio de Agricultura, ganadería y Pesca, 2015). Por lo tanto, resulta de interés investigar, desarrollar e innovar en nuevos alimentos y/o ingredientes con potenciales aplicaciones para la alimentación humana a partir de la re-utilización de los subproductos provenientes del sector agro-industrial, como por ejemplo de las pérdidas durante la cosecha y poscosecha del y/o de las provenientes durante los procesamientos industriales del zapallo anco en Argentina.

**OBJETIVOS GENERALES**

Por lo antedicho los objetivos generales que se plantean en la presente tesis son:

- Contribuir a la salud de la población, en especial en el control de la anemia por déficit nutricional de hierro, a través del desarrollo de alimentos fortificados con hierro y probióticos.
- Basados en los principios de economía circular, proponer procesos sustentables que busquen el aprovechamiento integral de las materias primas, minimizando el consumo energético y de agua potable. Adicionalmente reducir la generación de residuos transformándolos en nuevos insumos con mayor valor agregado y con tecnología de fácil transferencia al sector agro-industrial.

Para ello, se analizará en el Capítulo I el proceso para la elaboración de un alimento listo para consumir a base de calabaza, fortificado con hierro y *Lactobacillus casei*. En el Capítulo II se propondrá una alternativa para el aprovechamiento de los subproductos generados en el proceso del primer capítulo. Como resultado, se obtendrá un nuevo ingrediente funcional enriquecido en probióticos y fibra dietaria. En el Capítulo III se definirá la caracterización completa de un nuevo ingrediente. Finalmente, en el Capítulo IV se mostrará una posible aplicación del ingrediente desarrollado, destacando las bondades y ventajas de su uso.

## CAPÍTULO I

**Snack a base de calabaza fortificado con hierro y  
recubierto con cobertura comestible en base a  
hidroxipropilmetilcelulosa conteniendo  
*Lactobacillus casei***

## 1. Introducción

La anemia por deficiencia de hierro es considerada a nivel mundial un problema de salud pública que afecta tanto a los países desarrollados como a subdesarrollados, con importantes consecuencias en la salud humana, el crecimiento social y económico. Afecta a todas las etapas del ciclo de vida, pero tiene mayor tasa de incidencia en mujeres embarazadas y niños, teniendo efectos negativos en el rendimiento cognitivo y físico de los niños, y pérdida de productividad laboral en los adultos (WHO & FAO, 2006).

La fortificación de alimentos es un proceso mediante el cual uno o más micronutrientes esenciales son adicionados con el objetivo de mejorar su calidad nutricional para prevenir o corregir una deficiencia de micronutrientes. Al momento, es considerada la estrategia más costo-efectiva para proporcionar hierro adicional a poblaciones con una alta prevalencia de DNH (Ottaway, 2008; Zimmermann & Hurrell, 2007).

Entre las técnicas comúnmente utilizadas para fortificar matrices de alimentos vegetales, la infusión en seco podría ser considerada como una buena alternativa desde un punto de vista de sustentabilidad del proceso, en donde el consumo de agua se reduce drásticamente y el agua parcialmente drenada del tejido demanda bajo consumo energético (Alzamora et al., 2004; 2005).

En trabajos previos, se logró fortificar con hierro y ácido ascórbico, tejido de calabaza *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret a través de un proceso de infusión en seco (Genevois, Flores, & de Escalada Pla, 2014a). Además, se concluyó que la aplicación de coberturas comestibles mejoró significativamente la retención del color y del ácido ascórbico, e incrementó la bioaccesibilidad del hierro a nivel del lumen intestinal.

Por otro lado, algunos estudios sugieren que la absorción de minerales se realiza mejor en un intestino saludable. En este contexto, existe una extensa bibliografía científica que apoya la función de los probióticos en el mantenimiento del equilibrio de la flora intestinal, y la importancia en la salud y el bienestar de los seres humanos y animales (Oelschlaeger, 2010). Se han propuesto varios mecanismos por los cuales los microorganismos probióticos podrían incrementar la absorción mineral a nivel intestinal, por ejemplo reduciendo los procesos inflamatorios, sintetizando enzimas fitasas, e incrementando la solubilidad mineral debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta (Parvaneh, Jamaluddin, Karimi, & Erfani, 2014; Scheers, Rossander-Hulthen, Torsdottir, & Sandberg, 2015; Scholz-Ahrens et al., 2007).

Los microorganismos probióticos más utilizados en el mercado pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo los yogures o las leches fermentadas los más utilizados como matrices soporte de estos microorganismos. Sin embargo, existe un creciente interés en el desarrollo de productos que puedan ser consumidos por individuos con dislipemias,

intolerancia a la lactosa, o vegetarianos (Martins et al., 2013). Por lo tanto, el desarrollo de productos probióticos utilizando matrices vegetales es aún un desafío pendiente en el segmento de alimentos funcionales, y para ello es necesario evaluar el crecimiento, la viabilidad, y la funcionalidad del probiótico en la matriz del alimento, así como también el efecto de los factores extrínsecos e intrínsecos del alimento (Guergoletto *et al.* 2010, Martins *et al.* 2013).

Por otro lado, la aplicación de películas y coberturas comestibles biopoliméricas tiene la ventaja de ser utilizadas como soportes o para inmovilizar y/o vehiculizar microorganismos probióticos cuando éstos no pueden ser inoculados directamente. Por ejemplo, Tapia et al. (2007) utilizaron coberturas comestibles a base de alginato y gelanos como soporte y vehículo de Bifidobacterias en cilindros de manzana y papaya recién cortados. A su vez, López de Lacey, López-Caballero, Gómez-Estaca, Gómez-Guillén, & Montero (2012) y López de Lacey, López-Caballero, & Montero (2014) lograron estabilizar y prolongar la vida útil de pescado refrigerado utilizando películas y coberturas comestibles a base de gelatina y agar vehiculizando *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* y *B. bifidum*. Tavera-Quiroz et al. (2015) aplicaron con éxito películas comestibles en base a metilcelulosa conteniendo *L. plantarum* para obtener un snack saludable a base de manzana con una alta concentración viable de probióticos.

Hay un amplio espectro de biopolímeros que pueden tener aplicación en la industria alimentaria como soporte y/o protección de las células probióticas durante el procesamiento y el tránsito gastrointestinal. Los derivados de celulosa se caracterizan por formar geles biodegradables que son transparentes, inodoros, insípidos, resistentes al aceite, solubles en agua, tienen eficiente barrera contra el oxígeno, dióxido de carbono y aromas, y poseen moderada resistencia al vapor de agua (Imran, El-fahmy, Revol-Junelles, & Desobry, 2010; Romano et al., 2014). Entre los derivados de celulosa, la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) es un hidrocoloide soluble en agua y es utilizado en tecnología de los alimentos por sus capacidad para formar películas (Osorio et al., 2011).

Hasta el momento, escasa información ha sido publicada sobre la fortificación de matrices vegetales con hierro, así como también sobre el efecto del mineral en la viabilidad de los probióticos. En este contexto, el estudio de la fortificación de hierro combinado con la vehiculización de probióticos en frutas o vegetales mínimamente procesados es aún materia pendiente de investigación.

**Objetivo General:**

Formular y elaborar un snack a base de calabaza fortificado con hierro y bacterias probióticas, y estudiar las características organolépticas y nutricionales del producto obtenido.

**Objetivos específicos:**

- Formular y elaborar un snack a base de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible en base a HPMC conteniendo *Lactobacillus casei*.
- Estudiar la viabilidad y funcionalidad del probiótico, y la bioaccesibilidad del hierro después de las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal durante el almacenamiento.
- Evaluar el efecto de la fortificación del mineral sobre las características organolépticas.
- Determinar la calidad microbiológica del producto durante el período de almacenamiento.

**2. Materiales y Métodos****2.1. Reactivos**

Se utilizó sacarosa (grado alimenticio), glucosa monohidrato (Anedra, San Fernando, Buenos Aires, Argentina) e HPMC con 28-30 % de grupos metoxilo (E4M Methocel<sup>®</sup>, Dow Chemical, Midland, MI, USA). Los aditivos FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck, Kenilworth, NJ, USA), sorbato de potasio (Sigma, St. Louis, MO, USA), ácido cítrico y glicerol (Sintorgan, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina), fueron todos de grado analítico. Los reactivos α-α'-bipiridil e hidrocloruro de hidroxilamina (10%, p/v) (Fluka Inc., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hong Kong, China) fueron de grado analítico.

**2.2. Preparación del snack a base de calabaza****2.2.1. Proceso de infusión en seco**

La preparación de las muestras se realizó siguiendo la metodología descrita por Genevois et al. (2014a). Se utilizaron calabazas *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret adquiridas en el mercado local, que fueron cuidadosamente lavadas y enjuagadas con agua destilada. Se cortaron cilindros de mesocarpio de 10 mm de espesor por 29 mm de diámetro utilizando un sacabocados de acero inoxidable. Luego, los cilindros se escaldaron durante 7 minutos, rápidamente fueron enfriados por inmersión en agua a 0 °C durante 1 minuto, y se colocaron sobre papel tisú para escurrir el agua. Inmediatamente, los cilindros se colocaron en un bol plástico para realizar la infusión en seco (Alzamora et al., 2004). Primeramente, fueron espolvoreados con glucosa (33 g/100 calabaza cocida) y sacarosa (23 g/100 calabaza cocida), y se dejaron a temperatura ambiente hasta que el tejido de calabaza drenara suficiente agua para disolver los aditivos: ácido cítrico (0,18 g/100 calabaza cocida), sorbato de potasio (0,13 g/100 calabaza cocida), y hierro como FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,6 g/100 calabaza cocida) equivalentes a 119 mg de hierro (Damoran, Parkin, & Fennema, 2008). En paralelo, se realizó otro lote como sistema control, bajo las mismas condiciones pero sin la adición de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. La impregnación en seco

se realizó a 20 °C con agitación orbital a 45 revoluciones por minuto (rpm) (Vicking S.A., CABA, Buenos Aires, Argentina) hasta alcanzar el equilibrio osmótico. El equilibrio se alcanzó a las 48 h cuando los cilindros de calabaza y la solución circundante tuvieron el mismo pH y actividad de agua ( $a_w$ ). Luego, fueron escurridos usando un filtro de acero inoxidable, e inmediatamente se recubrieron por inmersión con una cobertura comestible (CC) en base a HPMC.

El lote de cilindros de calabaza fortificados con hierro se subdividió en dos lotes, uno de ellos fue recubierto con HPMC conteniendo *Lactobacillus casei* (Sistema A) como se describe en la sección 2.2.4, y el otro fue recubierto con HPMC sin la adición del probiótico (sistema B), tal como se describe en la sección 2.2.2. Mientras que, los cilindros sin fortificar con hierro (sistema control) fueron recubiertos con HPMC conteniendo *L. casei* (Sistema C).

La cobertura se realizó por inmersión de los cilindros de calabaza en la correspondiente solución de cobertura comestible en base a HPMC durante 1 min. Luego, se dejaron escurrir por 1 min para retirar por goteo el excedente de la solución. Todos los sistemas se llevaron a una cámara de convección (FAC, Pilar, Buenos Aires, Argentina) a 46 °C durante 4 h. Finalmente, los cilindros de calabaza fueron envasados en bolsas plásticas de polietileno de baja densidad provistas de cierre fácil tipo Ziploc®, y almacenados a 8 °C durante 21 días (**Figura I.1**).

### **2.2.2. Preparación de la cobertura comestible**

La concentración y el tipo de la cobertura en base a HPMC fue seleccionada de acuerdo a ensayos previos (Genevois, Flores, & de Escalada Pla, 2014b). La metodología utilizada para su preparación se describe brevemente a continuación. El HPMC (1,5 %, p/v) se disolvió en agua destilada utilizando agitación constante durante 20 min. Luego, se adicionó glicerol (0,5 %, p/v) como plastificante y sorbato de potasio (0,025 %, p/v) como agente antimicrobiano, y se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una homogeneización adecuada. La solución de cobertura se esterilizó durante 15 min a 121 °C y se reservó a temperatura ambiente con agitación magnética hasta su uso.

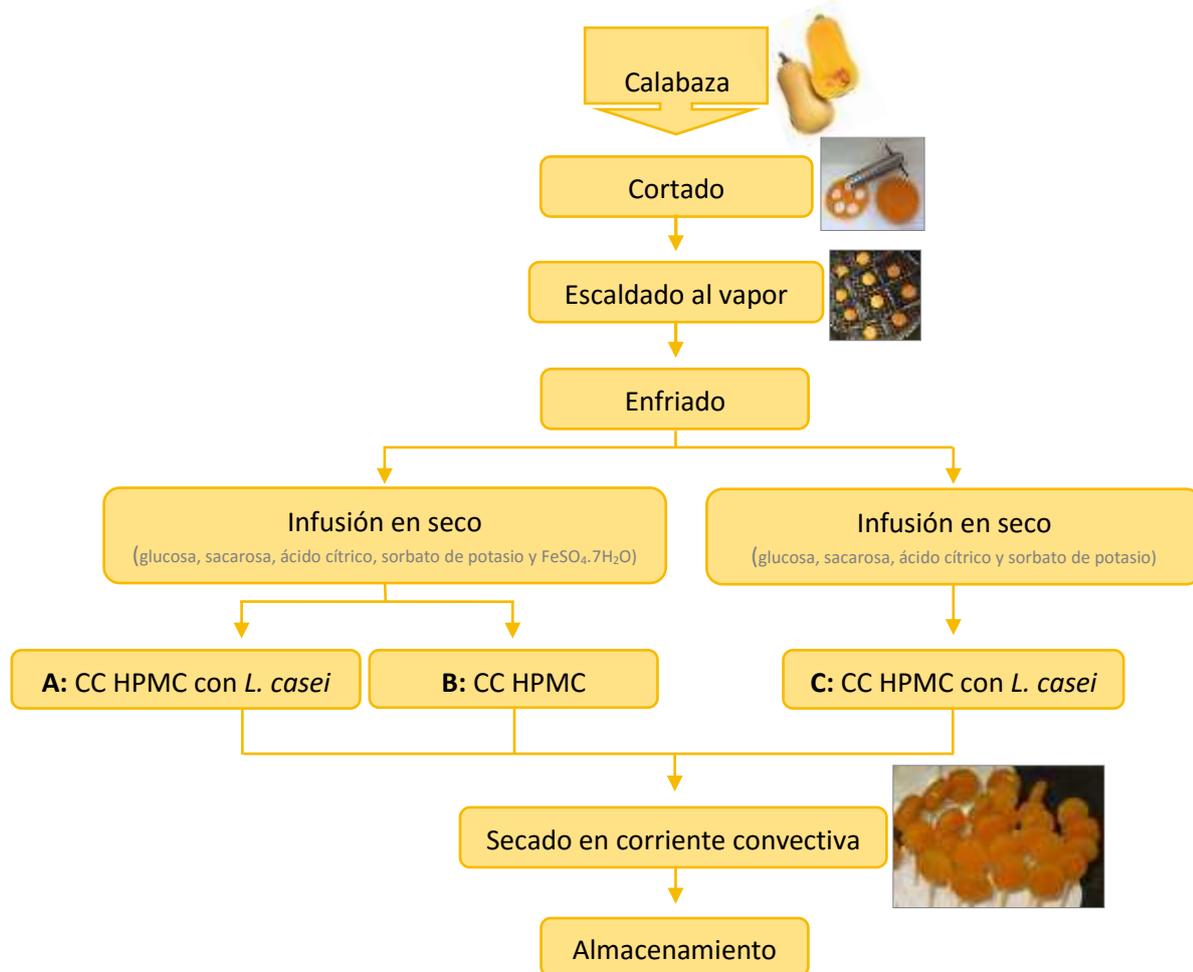
### **2.2.3. Microorganismo y preparación del medio de crio-preservación**

La cepa comercial del *Lactobacillus casei* (ATCC-393) fue adquirida en Microbiologics (St. Cloud, Minnesota, USA). La cepa liofilizada fue activada de acuerdo al protocolo sugerido. Brevemente, las células probióticas fueron re-suspendidas en caldo estéril de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia) e incubadas a 37 °C durante 48 h. Seguidamente, 100 µL del caldo crecido fueron transferidos a tubos Eppendorf de 1,5 mL conteniendo 1 mL de caldo estéril de crio-preservación (triptona 2% (v/v) (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia), leche descremada 5% (v/v) (Mastellone, Buenos Aires, Argentina), y glicerol 20% (v/v) en caldo MRS.

Luego, los cultivos de *L. casei* se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente, y finalmente fueron almacenados a -20 °C (crio-preservado), hasta el momento de su uso.

#### **2.2.4. Incorporación del *Lactobacillus casei* en el recubrimiento comestible a base de HPMC**

El inóculo iniciador se preparó transfiriendo 1 mL del cultivo crio-preservado del *L. casei* en tubos cónicos de 50 mL (Eppendorf, Hamburgo, HH, Alemania) conteniendo 30 mL de caldo MRS estéril (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia). El crecimiento celular se llevó a cabo en una incubadora (I-290, INGELAB, Argentina) durante 18-20 h a 37 °C con agitación orbital (Vicking S.A., Buenos Aires, Argentina) a 45 rpm. Luego, las células del *L. casei* fueron centrifugadas (Eppendorf 5804R, Hamburg, HH, Alemania) a 6 °C a una velocidad de 12.000 rpm durante 10 min, seguido de dos lavados con solución fisiológica estéril (glucosa 5%, NaCl 0,9%, p/v). Por último, el pellet del probiótico se re-suspendió en agua destilada estéril, y luego se adicionó a la solución de HPMC previamente esterilizada, seguido de agitación hasta obtener una adecuada homogeneización. El recuento viable del *L. casei* fue de  $10,1 \pm 0,1$  log (UFC/mL de solución de cobertura comestible en base a HPMC).



**Figura I.1.** Diagrama de preparación del snack a base de calabaza recubierto con cobertura comestible en base a hidroxipropilmetilcelulosa.

### 2.3. Caracterización físico-química del snack de calabaza

El pH superficial se determinó con un electrodo combinado de vidrio  $\text{Ag}^{\circ}/\text{AgCl}$  conectado a un medidor de pH (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA).

La pérdida de agua de los cilindros de calabaza durante el proceso de secado en convección se determinó como la diferencia entre la masa inicial y final, y se calculó utilizando la siguiente expresión (Ecuación 1):

$$\text{Pérdida de agua}(\%) = (\text{Masa}_{\text{inicial}} - \text{Masa}_{\text{final}}) / \text{Masa}_{\text{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Dónde,  $m_{\text{inicial}}$  corresponde al peso antes del tratamiento de secado, y  $m_{\text{final}}$  corresponde al peso después del secado.

La actividad de agua ( $a_w$ ) se midió con un higrómetro (Aqualab, Pullman, WA, USA) a 20 °C.

El contenido de humedad se determinó con un analizador de humedad (Ohaus MB-45, Parsippany, NJ, USA) utilizando un perfil de tiempo de secado de 5 min a 130 °C seguido de una etapa de secado a 105 °C hasta obtener una pérdida de humedad menor a 1 mg en 30 segundos. Los resultados se expresaron en porcentaje de humedad en base húmeda. Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado, a partir de muestras independientes, y en los resultados se informan los valores promedios  $\pm$  desvío estándar (DE).

#### 2.4. Evaluación del color

Las determinaciones de color después del secado y durante el almacenamiento se realizaron utilizando un colorímetro (Minolta Konica, Tokio, Japón) en el espacio CIE L\*a\*b\*, bajo el iluminante D65 y un ángulo de observación de 2 °. La luminosidad se utilizó para cuantificar la oscuridad/claridad (L\*: 0-100), la coordenada a\* para determinar el rojo/verde (+98,233; -86,183), y la coordenada b\* para el amarillo/azul (+94,47; -107,857). Las mediciones se realizaron por cuadruplicado, partiendo de muestras independientes, e informando el valor promedio  $\pm$  DE.

El valor de chroma (Chr) se calculó a partir de los parámetros de a\* y b\*, el cuál describe la intensidad del color (Olivera et al., 2008) (Ecuación 2):

$$\text{Chr} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (2)$$

Los datos experimentales del cambio de color de Chr y b\* en función del tiempo de almacenamiento se ajustaron a una cinética de primer orden, utilizando la siguiente expresión algebraica (Ecuación 3):

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (3)$$

Dónde,  $C_0$  es el valor inicial del parámetro de color;  $C$  corresponde al valor del parámetro de color en el tiempo  $t$ ;  $t$  es el tiempo expresado en días;  $k$  es la constante de velocidad de cambio para el correspondiente parámetro de color.

#### 2.5. Análisis de la textura

El perfil de la textura de los cilindros de calabaza se evaluó a través de una prueba de compresión, utilizando una máquina universal de testeo Instron (Modelo 3345, Norwood, MA, USA.), equipada con una celda de carga de 500 N y un plato paralelo de compresión de 30 mm

de diámetro. La velocidad de compresión del cabezal fue de 5 mm/min, y durante cada ensayo se registró la fuerza (N) y el desplazamiento del cabezal (mm) hasta el 80% de deformación de la muestra. A partir de estos datos, se calculó el esfuerzo ( $\sigma$ , MPa) y la deformación ( $\epsilon$ , %) con las ecuaciones (4) y (5), y se graficaron las curvas de  $\sigma$  en función de la  $\epsilon$ .

$$\text{Esfuerzo (MPa)} = \frac{F}{ST} \quad (4)$$

Dónde, F es la fuerza (N) normal a la sección del cilindro de calabaza, requerida para deformarlo; ST corresponde a la sección transversal normal del cilindro (mm<sup>2</sup>).

$$\text{Deformación (\%)} = \frac{D}{A} \times 100 \quad (5)$$

Dónde, D representa el desplazamiento (mm) del cabezal; A es la altura (mm) inicial del cilindro de calabaza.

A partir de la curva obtenida, se determinó el módulo elástico ( $M_E$ ) al inicio de la pendiente, y se calculó la firmeza (MPa) como el cociente entre el  $\sigma$  (MPa) y la  $\epsilon$  (%) previamente mencionados. Se analizaron al menos 4 muestras independientes de cada sistema, informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

## 2.6. Determinación de la viabilidad del *Lactobacillus casei*

El recuento de células viables se realizó por recuento en profundidad mediante diluciones seriadas en agua peptona al 0,1% (p/v) de un homogenato de la muestra (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia). Alícuotas de 0,1 mL de las diluciones seleccionadas de muestra fueron plaqueadas en profundidad en agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia) seguidas de incubación a 37 °C durante 72 h en condiciones aeróbicas.

El número de células viables del *L. casei* se expresó como log (UFC/g calabaza) (base seca). Cada determinación fue realizada por duplicado a partir de muestras independientes, informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

## 2.7. Ensayos “in vitro”

### 2.7.1. Condiciones simuladas de la digestión gastrointestinal

El ensayo fue realizado de acuerdo a Guergoletto, Magnani, Martin, Andrade, & Garcia (2010), con algunas modificaciones. El procedimiento incluyó 3 etapas: digestión en la boca, gástrica e intestinal. Brevemente, ~ 5 g del snack a base de calabaza fueron mezclados con 5 mL de saliva

artificial [NaCl (6,2 g L<sup>-1</sup>), KCl (2,2 g L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0,22 g L<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (1,2 g L<sup>-1</sup>)], seguido de agitación durante 2 min con vortex (MSI minishaker IKA®, Campinas, SP, Brasil). Inmediatamente, la digestión gástrica se realizó mediante la adición de 30 mL de una solución de HCl-pepsina [pepsina 0,7 FIP-U/mg (0,3%, p/v) (Merck) en HCl 0,01 N] seguido de incubación a 37 °C (I-290, INGELAB, AR) con agitación orbital a 120 rpm durante 2 h. Luego, el pH de la solución gástrica se ajustó a 7,5-8,0 con una solución estéril de NaOH 2 M, y finalmente, se adicionó 30 mL de solución intestinal [pancreatina: amilasa, proteasa >100 unidades FIP/mg, lipasa >20 unidades FIP/mg (0,3%, p/v) (Saporitti) y sales biliares (0,6%, p/v) en KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M]. Luego, se llevó a 37 °C con agitación orbital a 120 rpm durante otras 2 h.

El ensayo de digestión *in vitro* se realizó por duplicado a partir de muestras independientes.

### 2.7.2. Supervivencia del *Lactobacillus casei*

La supervivencia del *L. casei* a las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal fueron evaluadas en el snack a base de calabaza recubierto con cobertura comestible a base de HPMC conteniendo el probiótico (sistema A y C). La viabilidad se determinó por recuento en profundidad en agar MRS al final de la digestión gástrica e intestinal. Los resultados se expresaron en porcentaje de células viables del *L. casei* después de cada etapa de la digestión *in vitro* y se calculó de acuerdo a la Ecuación (6).

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\log (\text{UFC}) N_1}{\log (\text{UFC}) N_0} \times 100 \quad (6)$$

Dónde,  $N_1$  corresponde al recuento viable del *L. casei* en el snack [log (UFC/g calabaza); base seca] después de la digestión gástrica o intestinal en el tiempo  $t$ , y  $N_0$  representa el recuento viable del probiótico en el snack [log (UFC/g calabaza); base seca] antes de la digestión gástrica o intestinal.

El ensayo se llevó a cabo por duplicado, a partir de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

### 2.7.3. Bioaccesibilidad del hierro

El contenido de hierro se analizó utilizando un método colorimétrico (AOAC official method 937.03, 1990; Nayak & Nair, 2003). Las mediciones se realizaron en el sobrenadante y residuo después de las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal (ver sección 2.7.1). Al final de la digestión gastrointestinal, el residuo fue separado del sobrenadante mediante filtración a través de papel de celulosa libre de cenizas (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania), e

inmediatamente fue incinerado a 550 °C en un horno mufla durante 12 h. Las cenizas fueron re-suspendidas en 5 mL de HCl 6M, después se adicionaron 5 mL de hidrocloreuro de hidroxilamina (10%, p/v) (Sigma Aldrich, Fluka Inc., China) y se completó el volumen con agua bidestilada hasta 50 mL.

A una alícuota de 200 uL de muestra, se adicionó 200 uL de agua bidestilada, 100 uL de hidrocloreuro de hidroxilamina (10%, p/v), 500 uL de buffer CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 2M, y 200 uL de α-α'-dipiridilo. La curva de calibración se realizó con un estándar de sulfato ferroso (1000 ppm de hierro) y la absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Kioto, Japón) a una longitud de onda de 510 nm.

La fracción de hierro bioaccesible se calculó utilizando la Ecuación (7):

$$\text{Hierro bioaccesible (\%)} = \frac{\text{Fe}_{\text{intestinal}}}{\text{Fe}_{\text{intestinal}} + \text{Fe}_{\text{residuo}}} \times 100 \quad (7)$$

Donde, Fe<sub>intestinal</sub> representa la fracción de hierro (mg hierro/g de calabaza; base seca) contenido en el sobrenadante de la digestión gastrointestinal; Fe<sub>residuo</sub> corresponde a la fracción de hierro (mg de Fe/g de calabaza; base seca) contenido en el residuo de la digestión gastrointestinal.

Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada sistema, partiendo de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio ± DE.

## 2.8. Caracterización de las películas comestibles

Con el objetivo de evaluar el efecto de la presencia del *L. casei* sobre las propiedades de la matriz biopolimérica, se prepararon dos sistemas con películas comestibles a base de HPMC: a) película comestible en base a HPMC conteniendo *L. casei* (HPMC *L. casei*) y, b) película comestible en base a HPMC (HPMC control).

Las películas se obtuvieron extendiendo ~ 20 g de solución de HPMC (ver sección 2.2.2) sobre una placa de Petri de polietileno con un diámetro de 9 cm, y luego fueron secadas en una cámara de convección a 45 °C durante 20 h. Finalmente, las películas se retiraron cuidadosamente de las placas de Petri y se dejaron equilibrar en una atmósfera de 75 % de humedad relativa a 25 °C durante 5 días.

### 2.8.1. Ensayo de Tracción

El ensayo de tracción de las películas comestibles hasta ruptura se realizó con una máquina universal de testeo Instron (Modelo 3345, Norwood, MA, USA.), provista de una celda de carga de 100 N, y dos mordazas neumáticas. La separación inicial entre las mordazas y la velocidad de

movimiento vertical de la mordaza superior fue 20 mm y 0,80 mm/min, respectivamente. La geometría de las muestras utilizada fue rectangular (6 x 60 mm). Durante cada ensayo, se analizó el esfuerzo ( $\sigma = F/A$ , siendo F la fuerza (N) normal de la sección de la muestra y A (mm<sup>2</sup>) el área de la sección transversal de la muestra; MPa) y la deformación ( $\epsilon = H/L_0$ , siendo H (mm) el desplazamiento de la mordaza o la extensión de la muestra, y L<sub>0</sub> (mm) la longitud inicial de la muestra; %) a partir del perfil fuerza versus desplazamiento registrado por el software del equipo (Bluehill V.2.2, 2005).

A partir de la F y el H de la película comestible, se calculó el  $\sigma$  a la ruptura ( $\sigma_b$ ; MPa), la  $\epsilon$  a la ruptura ( $\epsilon_b$ ; %), y el módulo elástico ( $M_E$ ; MPa) que corresponde a la pendiente del tramo inicial de la curva donde la relación entre el  $\sigma$  y la  $\epsilon$  son proporcionales (Espinel, Flores, & Gerschenson, 2014).

Se evaluaron al menos diez muestras de cada sistema, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

## 2.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La presencia del *L. casei* en los cilindros de calabaza se corroboró por SEM (Supra TM 40, Carl-Zeiss, Oberkochen, BW, Alemania). Las muestras fueron previamente secadas bajo vacío en presencia de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt, Mulhuddart, Dublin, Irlanda) durante 3 días. Luego, se fijaron sobre un soporte de bronce y se recubrieron con una fina lámina de oro antes de la observación microscópica (Sputter Modelo 108, Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, GB, Reino Unido). Las muestras fueron examinadas bajo vacío con un voltaje de aceleración de 3,00 kV hasta magnificaciones de 10.000 x.

## 2.10. Calidad microbiológica

La calidad microbiológica de los productos se llevó a cabo mediante el recuento de bacterias coliformes, y hongos y levaduras como indicadores de la calidad higiénica del proceso. La inocuidad y estabilidad microbiológica del producto se verificó al inicio y final del período de almacenamiento mediante diluciones seriadas en agua peptona al 0,1% (p/v), donde se llevaron a cabo los recuentos de:

- Bacterias coliformes con agar violeta cristal-rojo neutro-bilis-lactosa (AVRB-L) (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia), incubando las placas en condiciones aeróbicas a 37°C durante 24 h.
- Hongos y levaduras en agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia), incubando las placas en condiciones aeróbicas a 25°C durante 5 días.

Los muestreos se realizaron por duplicado, partiendo de muestras independientes, e informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE expresado como UFC/g calabaza.

### **2.11. Evaluación sensorial**

La evaluación sensorial se llevó a cabo en el snack a base de calabaza con y sin la fortificación de hierro (sistema A y C). Noventa y seis consumidores frecuentes o no de calabaza, seleccionados al azar del Departamento de Industrias de la Universidad de Buenos Aires, participaron voluntariamente como panelistas no entrenados del ensayo. Las muestras fueron codificadas con números aleatorios de tres dígitos, y se ofrecieron a los panelistas a temperatura ambiente para obtener condiciones homogéneas durante las sesiones del análisis sensorial. Antes de iniciar la evaluación sensorial, los panelistas fueron informados de enjuagar la boca con agua mineral para evitar efectos de arrastre (Lawless & Heymann, 2010).

En primer lugar, se realizó una Prueba Discriminativa para confirmar si las muestras eran percibidas diferentes como consecuencia de la presencia de hierro. Las muestras se codificaron en seis combinaciones diferentes y se presentaron en orden aleatorio y balanceado. Durante la sesión de la Prueba Triangular, cada panelista recibió un set de 3 muestras codificadas, se instruyó de degustar las muestras de izquierda a derecha, y a continuación que identificaran y registraran la muestra diferente (ISO 4120:2004).

Posteriormente, se llevó a cabo una Prueba Afectiva para conocer el grado de aceptabilidad global por parte de los consumidores. Los panelistas fueron informados de juzgar las muestras con respecto a su grado de agrado o desagrado en relación a la aceptabilidad global en una Escala Hedónica estructurada de 7 puntos, con un punto central neutro, y 3 categorías negativas y positivas a cada lado. Los descriptores utilizados van desde "*me desagrada mucho*" hasta "*me agrada mucho*" (**ANEXO A**). En los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE de la puntuación obtenida para cada muestra (ISO 4121:2003).

### **2.12. Análisis estadístico**

Las constantes de velocidad de cambio de los parámetros de color se determinaron mediante un análisis de regresión lineal. La bondad de ajuste al modelo matemático se evaluó a través de los parámetros: coeficiente de determinación ( $R^2$ ) con un valor  $> 90\%$  y el estadístico de Durbin-Watson (DW) con un valor  $> 1,0$ .

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 0,05 seguido de un Test de Fisher (LSD) para establecer diferencias significativas entre las muestras. El test  $t$  de Student se utilizó en la aceptabilidad del consumidor.

El análisis estadístico de los resultados y la regresión lineal se realizó con el programa Statgraphics Centurion XV (V 2.15.06, 2007, Warrenton, VA, USA).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Características físico-químicas del snack a base de calabaza

Después del tratamiento de secado con corriente convectiva, los sistemas A, B y C presentaron valores promedio de pérdida de agua de  $15 \pm 5$  %, pH superficial de  $4,42 \pm 0,05$ , contenido de humedad de  $20 \pm 5$  % y  $a_w$  de  $0,81 \pm 0,03$ . Los parámetros estudiados no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los sistemas y durante el almacenamiento.

Las bacterias ácido lácticas se caracterizan por metabolizar los azúcares presentes y producir ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, y en consecuencia el pH del medio se reduce (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2011). En el presente trabajo, no se observaron cambios significativos ( $p \geq 0,05$ ) en el pH superficial durante los 21 de almacenamiento en ninguno de los sistemas estudiados, lo cual podría ser atribuido a la reducida actividad metabólica del *L. casei* debido a su inmovilización en la matriz biopolimérica.

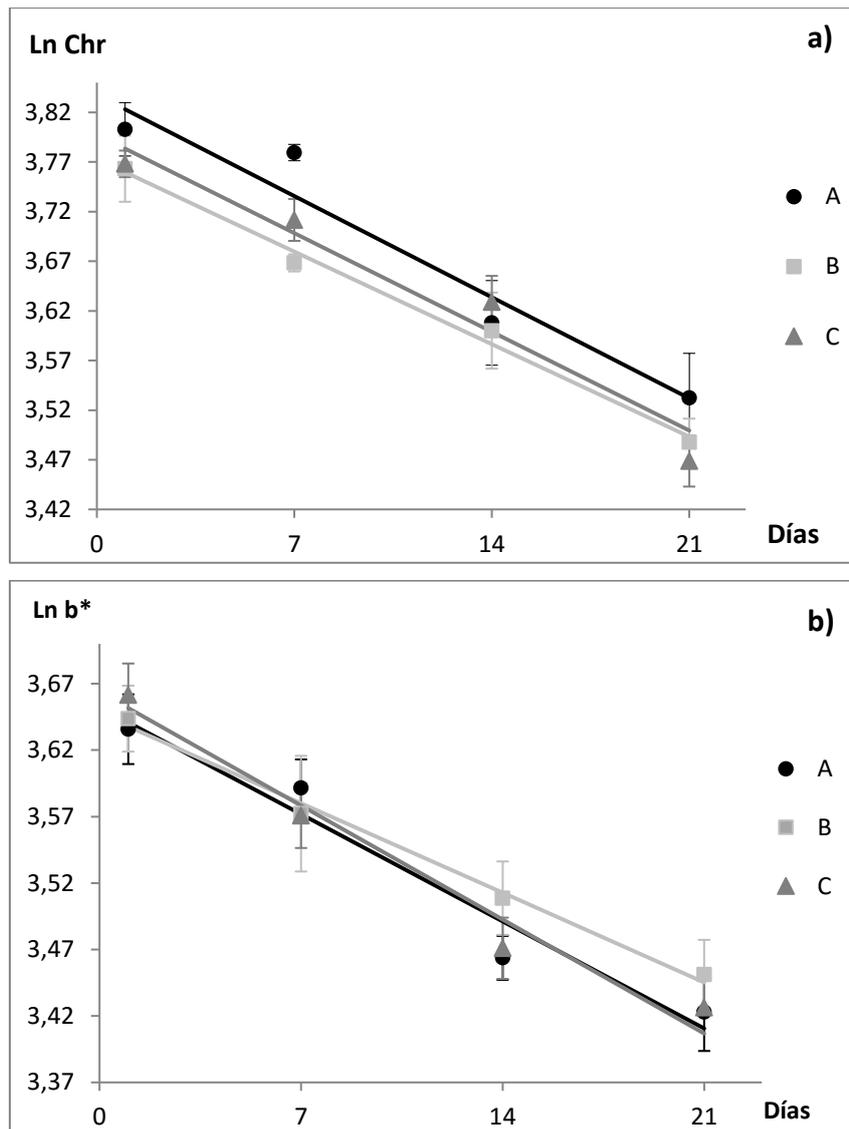
#### 3.2. Evaluación del color

El color tiene dos objetivos fundamentales, en primer lugar, la aceptabilidad del consumidor a través de la apariencia visual, y en segundo lugar, la calidad nutricional ya que los cambios de color en la calabaza están directamente relacionados a la concentración de carotenoides, en particular, de los  $\beta$ -carotenos (de Escalada Pla et al., 2009).

La **Figura I.1** muestra el cambio de Chr y  $b^*$  en función del tiempo de almacenamiento, mientras que los parámetros iniciales de color y las constantes de velocidad correspondientes se detallan en la **Tabla I.1**. En todos los sistemas estudiados, la bondad de ajuste al modelo de regresión lineal presentó valores de  $R^2 > 93$ %. El estadístico de DW fue  $> 1,0$  indicando la ausencia de correlaciones significativas en los residuos basados en el orden en que aparecieron los datos.

La luminosidad y el componente  $a^*$  del color no presentaron variaciones significativas ( $p \geq 0,05$ ) durante el almacenamiento en los sistemas estudiados (A, B y C) (datos no mostrados). Mientras que, la intensidad del color denominada croma (Chr), y el componente  $b^*$  fueron los parámetros más sensibles para registrar los cambios de color en la superficie del snack a base de calabaza durante el almacenamiento. En la **Figura I.2 a y b**, se muestran los cambios de Chr y  $b^*$  en función del tiempo de almacenamiento. Las pendientes negativas de la tendencia lineal en los cambios de Chr (**Figura I.2 a**) indican pérdida de la intensidad del color en la calabaza, la cual se debe principalmente a la pérdida de amarillo ( $b^*$ ) (**Figura I.2 b**). De acuerdo a Dutta, Dutta, Raychaudhuri, & Chakraborty (2006), existe una correlación directa entre los cambios visuales

de color y la concentración de  $\beta$ -carotenos en el tejido de calabaza. A su vez, la degradación de los pigmentos carotenoides podría estar acompañada por cambios en la isomerización geométrica de *trans* a *cis*, y como consecuencia, se produciría pérdida de actividad como pro-vitamina A y alteración de la biodisponibilidad y bioconversión (Lago-Vanzela, do Nascimento, Fontes, Mauro, & Kimura, 2013). En un trabajo previo, se observó que la aplicación de coberturas comestibles a base de almidón de mandioca pre-gelatinizado o kappa-carragenato fueron una buena estrategia para conservar y/o mejorar las características organolépticas y nutricionales de tejido de calabaza (Genevois et al., 2015). Por otro lado, autores como Lago-Vanzela et al. (2013) reportaron que coberturas comestibles a base de maíz modificado o nativo y almidón de yuca preservaron el color y el contenido de *trans*- $\beta$ -caroteno y *trans*- $\alpha$ -caroteno durante el secado a temperaturas elevadas en calabaza, y como consecuencia, el producto final presentó mejor apariencia visual y mayor contenido de carotenoides con actividad de pro-Vitamina A.



**Figura 1.2.** Parámetros de Chroma **(a)** y  $b^*$  **(b)** en el snack a base de calabaza en función del tiempo de almacenamiento.

Línea negra, gris oscura y gris clara representan el ajuste de los datos experimentales a la cinética de primer orden ( $\ln C = \ln C_0 - kt$ ). Círculos, cuadrados y triángulos representan los valores experimentales de los sistemas estudiados. Valores promedios  $\pm$  DE (n = 4)

A) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; B) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC; C) snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.

Las constantes de la velocidad del cambio de color obtenidas del análisis de regresión lineal, no mostraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los sistemas fortificados con hierro (A y B) y entre los sistemas recubiertos con cobertura comestible a base de HPMC con y sin la presencia del *L. casei* (A y C) (**Tabla I.1**). Si bien, se observó pérdida del color en el snack a base de calabaza durante el almacenamiento, no hubo cambios significativos ( $p \leq 0,05$ ) en el color por la presencia

de hierro en el tejido o debido a la vehiculización del *L. casei* en la cobertura comestible bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo.

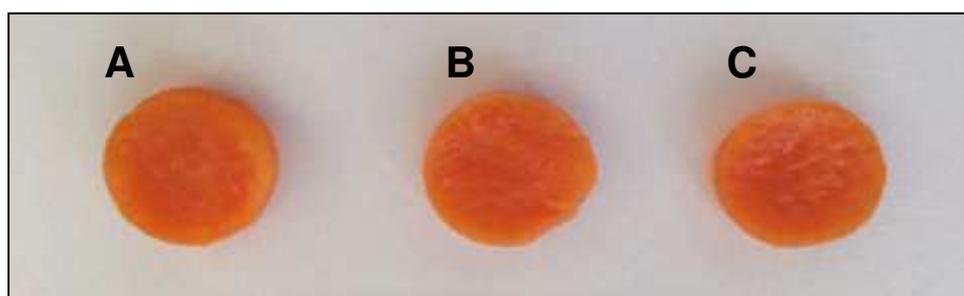
Estos resultados están de acuerdo con Sánchez-González, Quintero Saavedra, Saavedra, & Chiralt (2013), quienes informaron la ausencia de cambios en el color de películas a base de polisacáridos (HPMC) como consecuencia de la incorporación de *Lactobacillus plantarum*. En la **Figura I.3** a modo de referencia se muestra una imagen de los snacks a base de calabaza al final de almacenamiento.

**Tabla I.1.** Parámetros iniciales de color y valores de las constantes de velocidad de chroma (Chr) y  $b^*$  obtenidos del modelo de cinética de primer orden.

Sistemas	Chr				$b^*$			
	$C_0$	$k \times 10^2$ (día <sup>-1</sup> )	$R^2$	DW	$C_0$	$k \times 10^2$ (día <sup>-1</sup> )	$R^2$	DW
<b>A</b>	45 ± 1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	93	3,2	38,6 ± 0,8 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>d</sup>	96	3,4
<b>B</b>	43,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>b</sup>	99	3,4	38,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,96 ± 0,06 <sup>d</sup>	99	2,1
<b>C</b>	43 ± 1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	96	2,1	39,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>d</sup>	97	2,1

Modelo de cinética de primer orden:  $\ln C = \ln C_0 - kt$ .  $C_0$ : parámetro inicial de color.  $k$ : constante de velocidad del cambio de color.  $R^2$ : coeficiente de determinación (%). DW: estadístico de Durbin-Watson. Valores promedios ± DE (n = 4). Letras similares denotan ausencia de diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre sistemas.

A) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; B) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC; C) snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.



**Figura I.3.** Imagen de los snacks a base de calabaza al final del almacenamiento.

A) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; B) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC; C) snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.

### 3.3. Contenido de hierro en el snack a base de calabaza fortificado

El proceso de infusión en seco es considerado una buena alternativa para incorporar compuestos fisiológicamente activos en matrices vegetales (Alzamora et al., 2004; 2005).

Los cilindros de calabaza fortificados con hierro después de la infusión en seco presentaron un contenido promedio de hierro de  $35 \pm 8$  mg/100 g de calabaza (base seca). De acuerdo al C.A.A., un alimento fortificado debe contener al menos un 20 % de la ingesta recomendada de nutrientes (RNIs) por porción en el producto final. Por lo tanto, una porción aproximadamente de 25 g del snack de calabaza fortificado con hierro (equivalentes a 4-5 cilindros) aportaría ~ 48,6 y 30,2% de la RNIs establecida para los hombres (14 mg/día) y mujeres (29 mg/día), respectivamente (FAO & OMS, 2001).

Por otra parte, comparando el contenido de hierro del sistema A y B con respecto al sistema C, se pudo observar que el proceso de infusión permitió fortificar la matriz de calabaza original  $\approx$  12 veces (**Tabla I.2**). Es importante resaltar, que autores como Barrera et al. (2004) y Hironaka et al. (2014) han informado que la impregnación al vacío incrementó 5,6 y 6,4 veces el contenido de hierro en trozos de manzana y papa, respectivamente.

La **Tabla I.2** también muestra el contenido de hierro intestinal soluble e insoluble después de las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal en los sistemas estudiados.

La primera etapa hacia la biodisponibilidad del mineral comprende la bioaccesibilidad, es decir la solubilidad en el tracto intestinal (Cilla et al., 2009). La bioaccesibilidad se define como la fracción de un compuesto liberado de su matriz en el tracto gastrointestinal, y que se encuentra disponible para la absorción intestinal (Alegría, Garcia-Llatas, & Cilla, 2015).

En lo que respecta al contenido de hierro total y soluble a nivel intestinal en el snack a base de calabaza fortificado, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los sistemas A y B. Sin embargo, se observó una diferencia leve pero significativa ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido de hierro insoluble, lo que se traduce como el mineral que no es absorbido y es eliminado por las heces. Consecuentemente, esta diferencia ( $p \leq 0,05$ ) también se observó en el porcentaje de hierro bioaccesible (**Tabla I.2**). El menor contenido de hierro insoluble y la mayor bioaccesibilidad de hierro en el sistema de A respecto de B, podría estar asociado a la presencia del *L. casei* (Scheers et al., 2015). En este contexto, Scholz-Ahrens et al., (2007) resumen algunas evidencias científicas y los mecanismos que contribuyen a que la absorción de minerales se facilite por la presencia de probióticos. También, se ha demostrado en varios estudios en animales y humanos el efecto positivo sobre el metabolismo del calcio, la composición ósea y la arquitectura del hueso, pero estos efectos no fueron en todos los casos uniformes. Factores como la dieta y las características fisiológicas del grupo de estudio podrían favorecer un resultado positivo en el estudio. Uno de los mecanismos propuestos para explicar estos efectos, es la hidrólisis del enlace glicosídico de los alimentos en el intestino por parte de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que conducen a la liberación de los minerales y, por lo tanto, aumentan la bioaccesibilidad (Parvaneh et al., 2014). En este contexto, sería interesante realizar más estudios

con el objetivo de confirmar y justificar el incremento de la bioaccesibilidad de hierro en la calabaza debido a la presencia del *L. casei* en la cobertura comestible.

**Tabla I.2.** Contenido de hierro soluble, insoluble y total en el snack a base de calabaza después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Sistemas	Hierro intestinal soluble <sup>1</sup>	Hierro intestinal insoluble <sup>2</sup>	Hierro total	Bioaccesibilidad (%)
A	0,21 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,06 <sup>f</sup>	61 ± 6 <sup>h</sup>
B	0,20 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,38 ± 0,05 <sup>f</sup>	50 ± 4 <sup>i</sup>
C	0,006 ± 0,005 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>g</sup>	16 ± 7 <sup>j</sup>

<sup>1</sup> Contenido de hierro en el sobrenadante y <sup>2</sup> en el residuo después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Valores promedios ± DE (n = 2) expresados como mg de hierro/g de calabaza (base seca). Letras diferentes denotan diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre sistemas.

A) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; B) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC; C) snack de calabaza y recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.

### 3.4. Efecto de la presencia de hierro sobre la textura y la supervivencia del *L. casei*

El esfuerzo, la firmeza y el módulo elástico obtenidos de las curvas de esfuerzo vs deformación se detallan en la **Tabla I.3**. Los parámetros de textura se registraron al 50 % de deformación debido a que durante las mediciones no se observó la ruptura del tejido, lo que sugiere un alto nivel de plastificación de la matriz de calabaza después del proceso de infusión, recubrimiento y secado final. Al inicio del almacenamiento, no se observaron diferencias significativas (p ≥ 0,05) en el esfuerzo, firmeza y el módulo elástico entre los cilindros de calabaza fortificados con hierro y recubiertos con CC en base a HPMC conteniendo *L. casei* (sistema A) y los cilindros de calabaza recubiertos con CC en base a HPMC (sistema B). Mientras que, los cilindros de calabaza sin fortificar y recubiertos con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei* (sistema C) presentaron valores un orden de magnitud inferior en la firmeza y el módulo elástico, lo que podría explicarse por la ausencia de hierro en el tejido vegetal.

Con respecto a la fortificación de calcio y su efecto sobre la textura de vegetales y frutas mínimamente procesadas existen varias referencias bibliográficas (Martín-Diana et al., 2007; Rico et al., 2007). Por el contrario, muy pocos avances se han realizado sobre la fortificación con hierro en matrices vegetales y su efecto en la textura. Recientemente, Mierczynska, Cybulska, Sołowiej, & Zdunek (2015) han informado que la presencia de hierro en una matriz de polisacáridos modificados de pared celular de pulpa de manzana mejoró las propiedades

reológicas, y que este comportamiento se podría explicar por el entrecruzamiento de los iones de hierro con las pectinas, similar a como ocurre con el calcio según el modelo “egg-box” o “caja de huevo”.

Después de 21 días de almacenamiento, los sistemas B y C mostraron un aumento significativo en el esfuerzo, la firmeza y el módulo elástico comparado con los valores iniciales. En el sistema A, si bien los parámetros de textura no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) respecto de los valores iniciales, si se observó una leve tendencia a incrementar estos valores al final del almacenamiento (**Tabla I.3**).

La presencia del *L. casei* en la CC a base de HPMC podría introducir discontinuidad en la matriz biopolimérica. Según Tapia et al. (2007) la presencia de probióticos en CC a base de alginato y gelanos aplicados a trozos de frutas mínimamente procesados podría incrementar los espacios entre las cadenas del biopolímero. De tal forma, se llevó a cabo un ensayo de tracción con el objetivo de dilucidar si la presencia del probiótico en la CC podría afectar el comportamiento de la película. Las propiedades mecánicas de la película comestible en base a HPMC en el ensayo de tracción presentaron valores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más altos en el esfuerzo a la ruptura ( $\sigma_b$ ) ( $27 \pm 3$  MPa) y la deformación a la ruptura ( $\epsilon_b$ ) ( $46 \pm 7\%$ ) cuando el *L. casei* estuvo ausente (sistema control). Mientras que, cuando el probiótico fue incorporado en la película comestible el  $\sigma_b$  y la  $\epsilon_b$  mostraron valores de  $20 \pm 3$  MPa y  $31 \pm 5\%$ , respectivamente. El módulo elástico ( $M_E$ ) no presentó diferencias significativas entre la película comestible a base de HPMC sin y con la presencia del *L. casei*, presentando valores de  $563 \pm 73$  y  $567 \pm 64$  MPa, respectivamente. Por lo tanto, la incorporación de probióticos en la matriz biopolimérica resultó en una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) del esfuerzo y la elongación a la ruptura de la película comestible, sin cambios notables ( $p \geq 0,05$ ) en el  $M_E$ . Estos cambios en las propiedades mecánicas podrían explicar, en parte, la mayor firmeza en el sistema B a los 21 días de almacenamiento.

Basándose en estos resultados, se observó que la presencia combinada de hierro y *L. casei* podría retrasar los cambios de textura durante el almacenamiento en el producto final, y que la fortificación de hierro o la vehiculización del *L. casei* por separado en el tejido vegetal ejercieron el mayor efecto en los parámetros de textura (**Tabla I.3**).

**Tabla I.3.** Parámetros de textura del snack a base de calabaza recubierto con cobertura comestible a base de hidroxipropil metilcelulosa al inicio y al final del almacenamiento.

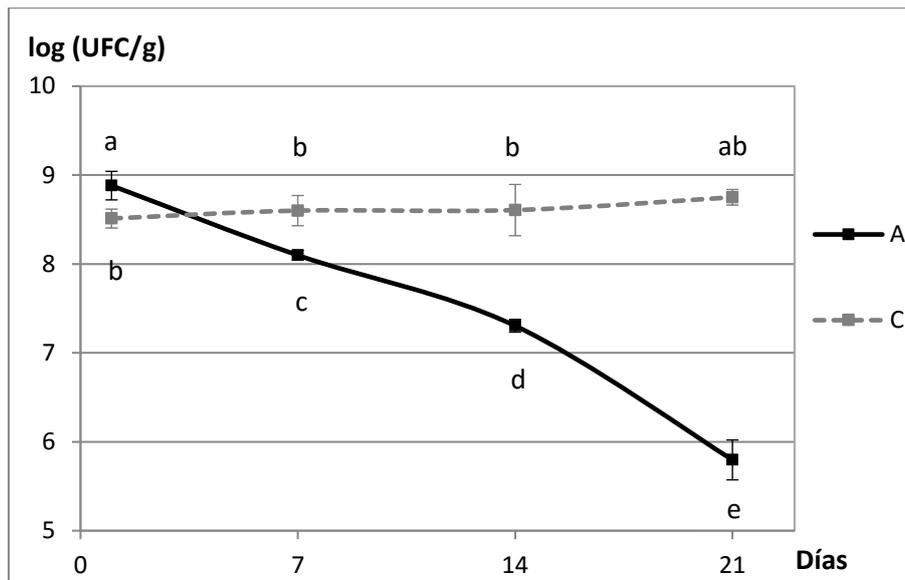
Sistemas	Día 1			Día 21		
	Esfuerzo (MPa)	Firmeza (MPa)	M <sub>E</sub> (MPa)	Esfuerzo (MPa)	Firmeza (MPa)	M <sub>E</sub> (MPa)
<b>A</b>	0,061 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>g</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>g</sup>
<b>B</b>	0,059 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,14 ± 0,04 <sup>g</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,32 ± 0,06 <sup>f</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>i</sup>
<b>C</b>	0,016 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,032 ± 0,007 <sup>e</sup>	0,04 ± 0,004 <sup>h</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>g</sup>

M<sub>E</sub>: módulo elástico. Valores promedios ± DE (n = 4). Letras diferentes significan diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre sistemas y tiempos de almacenamiento para un mismo parámetros de textura.

A) Snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; B) Snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC; C) Snack de calabaza y recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.

El recuento viable del *L. casei* en el producto final y su supervivencia después de las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal se ensayaron en el snack fortificado con hierro (sistema A) y sin fortificar (sistema C), ambos recubiertos con CC a base de HPMC con *L. casei* (**Figura I.4** y **I.5**).

El recuento del *L. casei* en la cobertura comestible a base de HPMC presentó un valor de 10,1±0,1 log (UFC/mL de cobertura). Después de la aplicación de la cobertura comestible a los cilindros de calabaza y posterior secado en corriente convectiva, la viabilidad del probiótico fue de 8,9±0,2 y 8,5±0,1 log (UFC/g de calabaza) en el sistema A y C, respectivamente. Durante los 21 días de almacenamiento, la viabilidad del *L. casei* se mantuvo sin modificaciones (p ≤ 0,05) en la calabaza sin fortificar con hierro (sistema C), presentando un recuento viable promedio de 8,7±0,1 log (UFC/g de calabaza). Mientras que, en la calabaza fortificada con hierro (sistema A) se observó una disminución significativa (p ≤ 0,05) de la viabilidad del probiótico a partir de los 7 días de almacenamiento (**Figura I.4**). La pérdida de viabilidad total del *L. casei* en el sistema de A disminuyó 3 ciclos logarítmicos después de 21 días de almacenamiento, presentando una concentración celular final de 5,8±0,2 log (UFC/g de calabaza) (base seca). De acuerdo a las normas internacionales y locales, un alimento debe contener un recuento viable de microorganismos probióticos > 10<sup>6</sup> UFC/g al momento de su consumo (FDA, EFSA y ANMAT). Por lo tanto, el recuento del *L. casei* en la calabaza fortificada con hierro a los 14 días de almacenamiento marcó el fin de la vida útil del producto (**Figura I.4**).



**Figura I.4.** Viabilidad del *L. casei* en el snack a base de calabaza durante el almacenamiento.

Valores promedio  $\pm$  DE (n = 2). Viabilidad expresada como log (UFC/g de calabaza) (base seca). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas.

A) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; C) snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.

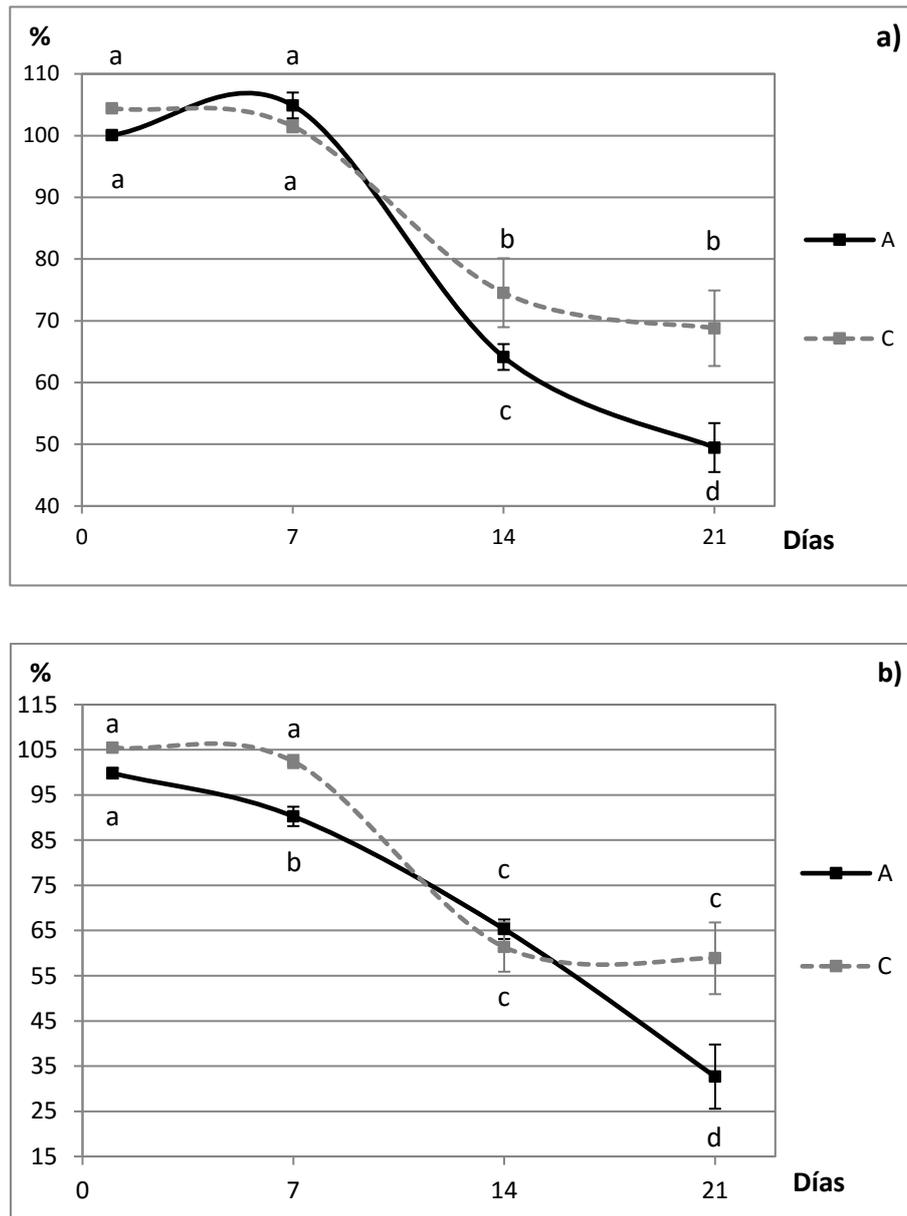
Para actuar como un probiótico en el tracto gastrointestinal, el microorganismo debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago y resistir los ácidos biliares en el intestino delgado (Monteagudo-Mera et al., 2012). En el presente trabajo, el *L. casei* logró sobrevivir con éxito a las condiciones simuladas de digestión gástrica en el sistema A y C hasta los 7 días de almacenamiento (**Figura I.5 a**). A partir de los 14 días de almacenamiento, tanto el sistema A como el C, presentaron una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) de la supervivencia del probiótico, siendo esta reducción mayor ( $p \leq 0,05$ ) en el sistema A ( $64 \pm 2\%$ ) respecto de C ( $75 \pm 6\%$ ). A los 21 días de almacenamiento, la tasa de supervivencia del *L. casei* fue del  $69 \pm 6\%$  en la calabaza sin fortificar y  $49 \pm 4\%$  en la calabaza fortificada con hierro.

Después de las condiciones simuladas de digestión intestinal, la supervivencia del *L. casei* en el sistema A se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) respecto del valor inicial a partir de los 7 días de almacenamiento (**Figura I.5 b**). A los 14 días de almacenamiento el porcentaje de supervivencia del probiótico en ambos sistemas fue similar ( $\sim 60\%$ ). Al final del almacenamiento, la resistencia en el sistema C se mantuvo estable ( $59 \pm 8\%$ ), mientras que en el sistema A la supervivencia fue del  $33 \pm 7\%$ , lo que se traduce en una reducción total de 3,2 y 6,8 ciclos logarítmicos, respectivamente. Autores como Vinderola et al. (2011) también han reportado cambios en la tolerancia del probiótico al medio ácido y a la presencia de bilis durante el

almacenamiento refrigerado en leches fermentadas comerciales a pesar de no observarse cambios en la viabilidad celular.

En líneas generales, se podría decir que tanto la presencia de hierro en la matriz vegetal como el tiempo de almacenamiento afectaron la viabilidad y funcionalidad del *L. casei* vehiculado en la cobertura comestible a base de HPMC.

La baja tasa de supervivencia del probiótico en el snack a base de calabaza fortificado con hierro podría explicarse por la difusión del mineral desde la zona con alta concentración a la de baja concentración de hierro en la cobertura comestible, causando un efecto tóxico en las cepas del *L. casei* (Solioz, Mermod, Abicht, & Mancini, 2011). Hasta el momento, no se han reportado publicaciones sobre la supervivencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en tejidos vegetales fortificados con hierro. Además, existe muy poca información disponible sobre la homeostasis intracelular del metal y su defensa contra el estrés en presencia del mineral en BAL (Solioz et al., 2011). La pérdida de la viabilidad celular del probiótico en presencia de hierro podría explicarse por el mecanismo de Fenton y de Haber-Weiss. Las BAL son microorganismos hierro-independientes, sin embargo, en condiciones de crecimiento aerobias el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) intracelular es inestable, y en presencia de  $\text{O}_2$  podría dar lugar a la síntesis de algunas especies reactivas, tales como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y radicales hidroxilos ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Estas especies reactivas podrían ser las responsables de la toxicidad en los microorganismos (Krewulak & Vogel, 2008; Solioz et al., 2011). Algunas cepas, inclusive el *L. casei*, no poseen catalasa para la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por lo tanto, en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  o de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se puede convertir en  $\text{OH}^{\cdot}$  a través del mecanismo de Fenton y de Haber-Weiss (Acevedo-Félix & Pérez-Martínez, 2003). De esta forma, altos niveles intracelulares de hierro podrían contribuir significativamente al aumento de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Solioz et al., 2011).



**Figura I.5.** Supervivencia del *L. casei* después de la digestión gástrica (a) e intestinal (b) en el snack a base de calabaza durante el almacenamiento.

Valores promedios  $\pm$  DE (n = 2). Viabilidad expresada supervivencia en porcentaje (%). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

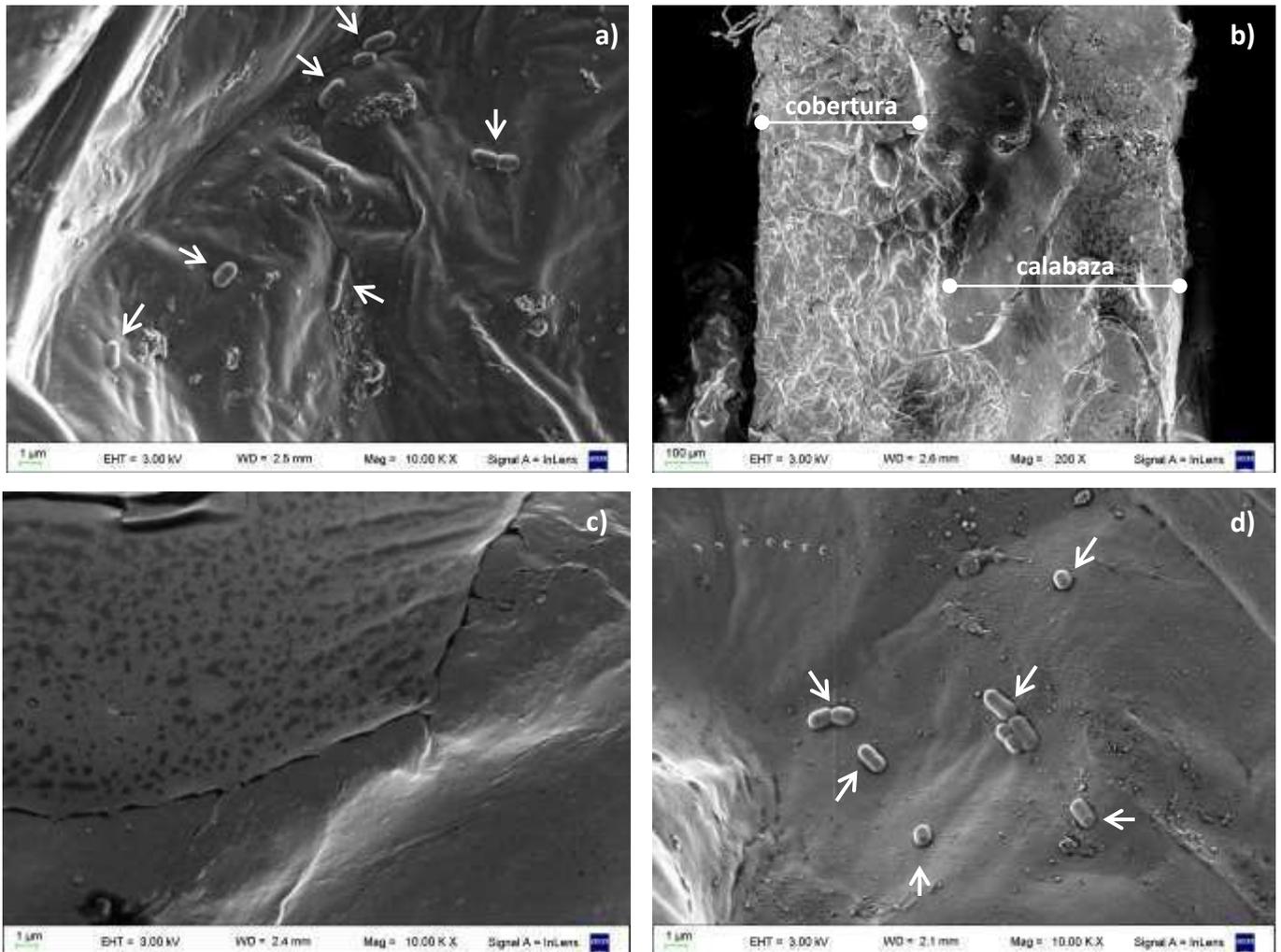
A) snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei*; C) snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei*.

### 3.5. Microestructura

Las observaciones microscópicas de los sistemas estudiados se realizaron con el objetivo de tener una mejor comprensión de la microestructura y las características morfológicas del probiótico vehiculizado en la CC a base de HPMC (Figura I.6).

La **Figura I.6 a** representa la superficie de la calabaza fortificada con hierro y recubierta con CC en base a HPMC con *L. casei* (sistema A), en donde se puede observar la adhesión de las células probióticas a la matriz biopolimérica (indicado por flechas) y algunos fragmentos de celulosa. La sección transversal del sistema A permitió confirmar una buena adherencia de la CC a base de HPMC (izquierda) al tejido de calabaza (derecha) (**Figura I.6 b**). La **Figura I.6 c** representa la superficie de calabaza fortificada con hierro recubierta con CC a base de HPMC (sistema B), en donde se visualiza la presencia de algunos fragmentos de celulosa y la ausencia de células probióticas en la matriz biopolimérica. La adherencia de las células probióticas a la matriz biopolimérica (indicado por flechas) junto con la presencia de algunos fragmentos de celulosa, también se corroboró en la superficie de la calabaza sin fortificar con hierro y recubierta con CC a base de HPMC con *L. casei* (sistema C) (**Figura I.6 d**).

Las observaciones microscópicas permitieron confirmar en el producto final una buena adherencia de la CC al tejido vegetal y la ausencia de cambios morfológicos en las células probióticas vehiculizadas en la CC.



**Figura 1.6.** Microestructura de snack a base de calabaza. **a)** Superficie y **b)** corte transversal del snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con cobertura comestible (CC) a base de HPMC conteniendo *L. casei* (sistema A); **c)** superficie del snack de calabaza fortificado con hierro y recubierto con CC a base de HPMC (sistema B); **d)** superficie del snack de calabaza recubierto con CC a base de HPMC conteniendo *L. casei* (sistema C).

Las flechas indican las células del *Lactobacillus casei*.

### 3.6. Inocuidad microbiológica del producto final

Durante el proceso propuesto, se aplicaron buenas prácticas de manufactura durante las etapas de elaboración, higienizando y sanitizando las áreas de trabajo durante la manipulación de las muestras. Un proceso higiénico, junto con las barreras tecnológicas incorporadas en la formulación del producto (pH reducido, agregado de sorbato de potasio,  $a_w$  reducido), contribuyen a la estabilidad del producto desde el punto de vista microbiológico. El almacenamiento de las muestras se realizó a 8 °C a los efectos de retrasar el crecimiento de

microorganismos y preservar las características nutricionales y organolépticas (Genevois et al., 2014a).

El recuento de enterobacterias es un indicador de la calidad ambiental (sanitización de las áreas de trabajo, utensilios, equipos) así como de la eficiencia de los procesos (escaldado). Mientras que, los recuentos de hongos y levaduras indican la estabilidad del producto desde el punto de vista del deterioro microbiológico durante el almacenamiento.

El C.A.A. establece un recuento máximo de coliformes en placa de  $5 \times 10^4$  UFC/g, y de hongos y levaduras de  $10^3$  UFC/g. En el presente trabajo, el snack a base de calabaza presentó un recuento de coliformes y hongos y levaduras  $< 10^2$  UFC/g calabaza durante el almacenamiento, cumpliendo de esta forma con las exigencias del C.A.A. en su artículo 1340, y garantizando la calidad microbiológica e inocuidad del producto listo para consumir.

### **3.7. Evaluación sensorial del snack a base de calabaza fortificado**

Las bebidas o alimentos fortificados con hierro generalmente están asociados a cambios indeseables en el color y un sabor metálico que afectan negativamente la aceptación del producto por parte del consumidor (Gahruie, Eskandari, Mesbahi, & Hanifpour, 2015; Zimmermann & Hurrell, 2007). A pesar de los beneficios aportados a la salud por los alimentos funcionales, las características sensoriales son una de las principales determinantes de la aceptabilidad del alimento. En este sentido, la evaluación sensorial se realizó en el snack a base de calabaza fortificada con hierro y sin fortificar, ambos recubiertos con CC en base a HPMC con *L. casei* (sistemas A y C, respectivamente).

Durante las sesiones de evaluación sensorial participaron 96 panelistas no entrenados, consumidores frecuentes o no de calabaza en cualquiera de las distintas formas de preparación culinaria, de edades entre 19 y 55 años, donde el 66% de los participantes correspondió a mujeres y el 34% a hombres.

De acuerdo a la norma ISO 4120:2004 en una Prueba Triangular se requiere un mínimo de 41 respuestas correctas de un total de 96 evaluaciones a fin de afirmar, con base estadística, que existen diferencias perceptibles entre las muestras evaluadas. En el presente estudio, el número de respuestas correctas (39 panelistas) fue menor al valor teórico, por lo tanto no se percibieron diferencias sensoriales significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el producto fortificado y sin fortificar con hierro. A su vez, hubo 3 panelistas que al no lograr identificar la muestra distinta, aclararon que su elección fue al azar. Estas tres respuestas resultaron ser correctas solo por azar.

En lo que respecta a la Prueba Afectiva, ambas muestras fueron bien aceptadas por los consumidores. La apreciación de la aceptabilidad global por parte de los consumidores no presentó diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el sistema A y B, siendo calificadas como “me

*agrada un poco*”, lo cual se traduce en una puntuación por encima de  $5 \pm 1$  en una escala de 7 puntos (ISO 4121:2003). Es interesante resaltar, que las calificaciones seleccionadas con mayor frecuencia fueron *“me agrada bastante”* (6/7 puntos) y *“me agrada un poco”* (5/7 puntos), las cuales representaron en promedio el  $44,0 \pm 0,1\%$  y el  $26 \pm 1\%$ , respectivamente, del total de observaciones. Mientras que calificaciones como *“me es indiferente”* (4/7 puntos), *“me agrada mucho”* (7/7 puntos) y *“me desagrada un poco”* (3/7 puntos) representaron el  $15 \pm 3\%$ ,  $10 \pm 1\%$  y  $5 \pm 1\%$ , respectivamente, de las observaciones registradas.

#### 4. Conclusiones

En el presente trabajo, se logró implementar una nueva estrategia para la fortificación de vegetales con hierro y *Lactobacillus* en simultáneo. La impregnación en seco permitió fortificar la matriz de calabaza  $\approx 12$  veces respecto al contenido de hierro de la materia prima original, presentando una cantidad final de  $35 \pm 8$  mg de hierro/100 g de calabaza (base seca). Aproximadamente, el 50% estuvo bioaccesible en el lumen intestinal, lugar donde se produce la absorción efectiva del mineral. La vehiculización del *L. casei* se logró aplicando una CC a base de HPMC. La presencia del probiótico mejoró la bioaccesibilidad del hierro a un valor  $\approx$  del 61%.

Los parámetros de textura incrementaron significativamente debido a la fortificación con hierro. La degradación del color del snack a base de calabaza siguió una cinética de primer orden, sin embargo, las constantes de velocidad de degradación no fueron afectadas por la presencia de hierro en la calabaza ni por la vehiculización del *L. casei* en la cobertura comestible a base de HPMC.

La presencia del mineral en la matriz vegetal y el tiempo de almacenamiento afectaron la viabilidad del *L. casei*, presentando una concentración viable del probiótico  $> 10^7$  UFC/g de calabaza fortificada durante 14 días de almacenamiento. La resistencia del probiótico a las condiciones gástricas y la presencia de bilis se redujeron significativamente durante el almacenamiento. Este hecho demuestra que los ensayos *in vitro* podrían ser una buena herramienta para controlar la funcionalidad del probiótico y, en consecuencia, la calidad nutricional de los alimentos funcionales.

La calidad microbiológica del snack durante el almacenamiento estuvo dentro de los límites establecidos para un producto listo para consumir según el C.A.A, garantizando de esta forma la seguridad e inocuidad del producto.

La evaluación sensorial demostró que la calabaza fortificada con hierro no fue percibida como diferente respecto del producto sin fortificar por el panel no entrenado. La aceptabilidad global del snack fortificado fue clasificada como *“me agrada un poco”*, recibiendo una puntuación de 5 en una escala de 7 puntos.

En síntesis, una porción (~25 g) del snack a base de calabaza fortificado con hierro y *Lactobacillus casei* aportaría un contenido de hierro superior al 30% de la RNIs, y una concentración del probiótico por encima de la concentración mínima establecida (FDA, EFSA y ANMAT) para que un producto sea considerado probiótico al momento del consumo.

## **CAPÍTULO II**

**Subproductos de calabaza (*Cucurbita moschata*  
Duchesne Ex Poiret) como sustrato y soporte de  
*Lactobacillus casei***

## 1. Introducción

La FAO estima que alrededor de 1.300 millones de toneladas de alimentos se pierden o desperdician cada año en el mundo, aproximadamente el 30% de la oferta alimenticia mundial (FAO, 2016).

El concepto que engloba y define las pérdidas y el desperdicio considera a todo aquel alimento apto para el consumo humano que se descarte, pierda, degrade o afecte, en cualquier punto de la cadena de suministro alimentario; así como también, el ser utilizado intencionalmente para la alimentación animal o que constituya un subproducto de la elaboración de alimentos no utilizado para la alimentación humana. Las *pérdidas* de alimentos se refieren específicamente a la reducción en la cantidad o calidad del producto comestible en los eslabones iniciales de la cadena de suministro, disminuyendo la cantidad global de alimento apto para consumo humano. Este concepto se halla principalmente relacionado con actividades de poscosecha, y en general, con la ausencia de un sistema eficiente de gestión de los recursos o deficiencias de la infraestructura disponible, tratándose así de una pérdida no intencional (Parfitt, Barthel & Macnaughton, 2010).

En Argentina, el total de pérdidas y desperdicios alimentario (PDA) estimado comprende aproximadamente a 16 millones de toneladas de alimentos, que representa el 12,5% de la producción agroalimentaria, en donde las pérdidas (11,3%) explican el 90% del total de PDA estimadas (Rivas, Blengino, Alvares de Toledo, & Franco, 2015).

Las pérdidas de alimentos afectan a la seguridad alimentaria, a la calidad y la inocuidad alimentarias, al desarrollo económico y al medioambiente. Las causas exactas de las pérdidas de alimentos varían en las diferentes partes del mundo y dependen de las condiciones específicas y de la situación local de cada país. Se estima que en países en desarrollo el 40% de las pérdidas de alimentos ocurre en etapas de poscosecha y procesamiento (6-11 kg per cápita por año); mientras que, en países industrializados más del 40% de las pérdidas de alimentos se produce en comercios minoristas y consumidores (95-115 kg per cápita por año) (FAO, 2012). Independiente del nivel de desarrollo económico y de la madurez de los sistemas, todos los países deberían mantener al mínimo las pérdidas y desperdicios de alimentos, y para ello, se requiere de la implementación de actividades estratégicas a nivel de tres pilares fundamentales: 1) Gobernanza y alianzas; 2) Tecnología, innovación y capacitación; 3) Información y comunicación (FAO, 2016).

En nuestro país, la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación comenzó a analizar en el ámbito de su Dirección de Agroalimentos las causas, magnitud y consecuencias que alcanzan las pérdidas y el desperdicio de alimentos en nuestro país, con el propósito de establecer bases para implementar políticas dirigidas a reducir la dimensión de este problema.

En el marco de estas acciones, se creó mediante la Resolución Ministerial N° 392/2015 el Programa Nacional de Reducción de Pérdida y Desperdicio de Alimentos (Ministerio de Agricultura, ganadería y Pesca, 2015).

La principal disposición final de los residuos generados por la actividad agropecuaria e industrial es para la alimentación animal, como abono, fertilizantes o para la producción de bio-diesel (Müller-Maatsch et al., 2016). Uno de los principales objetivos de la industria alimentaria es encontrar una forma de reducirlos, ya que constituyen un problema desde un punto ecológico y económico debido a los costos en la administración de su desecho (Mora et al., 2013). Autores como Naveena, Altaf, Bhadrappa, Madhavendra, & Reddy (2005a) y Naveena, Altaf, Bhadrappa, & Reddy (2005b) han propuesto reducir los subproductos agroindustriales (fibra de salvado de trigo, harina de maíz, lentejas, guisantes, etc) desde una perspectiva de sustentabilidad del proceso al utilizarlos como sustrato en la producción de L (+) ácido láctico a través de la fermentación en estado sólido.

Al mismo tiempo, estos residuos no aprovechados constituyen una fuente aún no utilizable de compuestos de alto valor biológico que podrían encontrar aplicaciones en la industria alimentaria como ingredientes, aditivos alimentarios o como suplementos dietarios.

Según estimaciones realizadas recientemente por la Secretaria de Agroalimentos de la Nación, y en consecuencia con lo reportado por la FAO (2016), entre un 42 y 55% de las hortalizas se desperdician en las etapas de producción primaria, poscosecha y almacenamiento, procesamiento y envasado, y distribución; siendo considerado este grupo de alimentos el de mayor impacto en las pérdidas de alimentos respecto de otros grupos (Rivas et al., 2015; FAO, 2016).

En Argentina, la *Cucurbita moschata* es una de las hortalizas más consumidas en todos los estratos sociales y edades, y se encuentra ampliamente disponible durante todo el año (INTA, 2013). Durante la cosecha de la calabaza, se pueden alcanzar pérdidas del 100% del cultivo debido a daños microbiológicos, mecánicos y/o deshidratación (USAID (United States Agency for International Development), 2004). A su vez, se ha reportado que el procesamiento industrial de vegetales genera una gran cantidad de residuos, entre un 18 y 21%, dado que sólo utiliza la pulpa de la calabaza (Norfezah, 2013). Estudios realizados por de Escalada Pla, Ponce, Stortz, Gerschenson, & Rojas (2007) y de Escalada Pla, Rojas, & Gerschenson (2013) lograron obtener fracciones rica en fibra dietaria a partir de subproductos de calabaza, y concluyeron que estas fracciones podrían ser utilizadas como ingredientes alimenticios para aplicaciones tecnológicas y nutricionales.

Por otro lado, actualmente, existe un consenso general sobre la importancia de la microflora intestinal en la salud y el bienestar de los seres humanos y los animales (Senaka Ranadheera et

al., 2012). La modulación de la microflora del huésped se consigue por la ingesta de probióticos y prebióticos. Sin embargo, para que los microorganismos probióticos ejerzan su efecto benéfico sobre el huésped deben tener la capacidad de sobrevivir a las condiciones de proceso en el alimento, resistir la exposición a los jugos gástricos y a las sales biliares, y deben ser capaces de crecer y colonizar el tracto intestinal. Además, deben mantener su efectividad y potencialidad durante la vida útil del alimento (Saad et al., 2013), y estar presente en el producto formulado en un recuento viable  $> 10^6$  UFC/g para cumplir con los requisitos regulatorios locales e internacionales (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica [ANMAT], 2011; Codex Alimentarius, 2003).

Actualmente, las bacterias probióticas comerciales se proporcionan a la industria alimentaria principalmente como cultivos congelados y/o liofilizados. El secado por spray es una tecnología de bajo costo que se podría utilizar para la producción de probióticos. Sin embargo, este proceso presenta elevada pérdida de la viabilidad celular debido a que los microorganismos son sometidos a altas temperaturas, efectos de esfuerzo de corte, presión osmótica y deshidratación (Paéz et al., 2012; Peighambardoust, 2011).

Por otra parte, el secado al vacío es un método simple y de bajo costo para la conservación de microorganismos (Tymczyszyn et al., 2008). Por ejemplo, autores como Foerst, Kulozik, Schmitt, Bauer, & Santivarangkna (2012) han reportado una menor cinética de inactivación en células de *Lactobacillus paracasei* secadas al vacío comparado con el secado por liofilización, obteniendo un polvo con células probióticas con elevada estabilidad durante el almacenamiento a 20 °C y actividades de agua reducidas.

Por otro lado, algunos autores han propuesto la inmovilización de cepas probióticas en fibras de distintas fuentes vegetales (avena, banana, manzana, maracuyá) con el objetivo de mejorar la viabilidad y estabilidad de las cepas durante el almacenamiento (do Espírito Santo et al., 2012; Guergoletto et al., 2010).

Por lo tanto, considerando el creciente interés de la región en reducir las pérdidas de alimentos, y en concordancia con el Programa de Pérdidas y Desperdicios del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, sumado al concepto de desarrollo e innovación de alimentos que promuevan una buena salud, este apartado estudia la re-utilización de los subproductos obtenidos en la elaboración del snack a base de calabaza fortificado descrito en el Capítulo I de la presente tesis. Los subproductos de calabaza, cáscara y pulpa, obtenidos del proceso anterior podrían ser utilizados como sustrato y/o soporte para la vehiculización de microorganismos probióticos en la elaboración de un suplemento y/o ingrediente para la industria alimentaria.

**Objetivo general:**

Evaluar la factibilidad de utilizar subproductos de calabaza (*Cuburbita moschata* Duchesne Ex Poiret) como matriz vegetal soporte y sustrato de *Lactobacillus casei*.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto de 4 variables: suero lácteo, tiempo de incubación, inóculo inicial y contenido de agua, sobre el crecimiento del *Lactobacillus casei* (ATCC-393), utilizando como soporte y/o sustrato subproductos, cáscara y pulpa, de calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret).
- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento del *L. casei* en el nuevo medio propuesto a base de subproductos de calabaza.
- Analizar el efecto de las operaciones unitarias subsecuentes sobre la supervivencia del *L. casei*.
- Analizar el comportamiento reológico de dos bebidas comerciales, una de origen lácteo y otra vegetal, suplementadas con el polvo a base de subproductos de calabaza conteniendo *L. casei*.
- Evaluar la funcionalidad del polvo de calabaza conteniendo *L. casei* como suplemento de dos bebidas comerciales y el grado de aceptabilidad en consumidores.

**2. Materiales y Métodos****2.1. Materiales****2.1.1. *Microorganismo y preparación del medio de crio-preservación del Lactobacillus casei***

La cepa comercial del *L. casei* (ATCC-393) se activó y almacenó siguiendo el protocolo detallado en la sección 2.2.3 del Capítulo I.

**2.1.2. *Preparación del inóculo***

Los inóculos fueron preparados transfiriendo 1 mL del cultivo crio-preservado de *L. casei* en un frasco erlenmeyer de 250 mL conteniendo 30 mL de caldo MRS estéril (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia). El crecimiento celular se llevó a cabo en una incubadora (I-290, INGELAB, Argentina) durante 18-20 h a 37 °C con agitación orbital (Vicking S.A., Buenos Aires, Argentina) a 45 rpm. Los inóculos iniciales fueron considerados adecuados cuando presentaron una concentración viable de *L. casei* de ~ 9 log (UFC/mL) en el recuento en profundidad.

### 2.1.3. Preparación de las muestras

Los subproductos de calabaza *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret conteniendo cáscara y pulpa (70:30, p/p) fueron procesados con una multiprocesadora (Modelo D-56, Molinex, Argentina), secados al vacío (Martin Christ Alpha 1-4, Osterode am Harz, NI, Alemania) durante 24 h, y almacenados a -20°C hasta su utilización.

La calabaza deshidratada fue pesada (~ 1 g), introducida en un tubo cónico de 50 mL (Eppendorf, Hamburg, HH, Alemania) y mezclada (MS1 minishaker IKA, Staufen, BW, Alemania) con diferentes volúmenes de agua destilada (10-20 mL) y suero lácteo (0-0,4 g) de acuerdo al diseño experimental (**Tabla II.1**). Inmediatamente, todos los sistemas fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min, luego enfriados e inoculados con 100 µL de caldo conteniendo una suspensión de *Lactobacillus casei* (1,68-7,68 log (UFC/mL), según el diseño experimental propuesto. Seguidamente, los sistemas fueron incubados (24-72 hs) a 37 °C con agitación orbital a 45 rpm. Al final del período de incubación, la viabilidad del *L. casei* fue determinada por recuento en profundidad. Luego, cada sistema fue centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos a 6 °C (**Figura II.1**). La acidez titulable y el pH fueron determinados en los sobrenadantes, mientras que el pellet fue lavado con solución fisiológica y secado al vacío a 25 °C y 4.5 Pa durante 24 h. Finalmente, el polvo de calabaza (PC) fue tamizado con una malla de acero inoxidable calibrada con tamaño de poro < 840 µ (Zonytest, Buenos Aires, Argentina) (**Figura II.1**).



**Figura II.1.** Diagrama de flujo de la preparación del polvo de calabaza soporte de *L. casei*.

En la siguiente etapa se planificó un experimento basado en un diseño factorial completo (sección 2.2.9) a fin de seleccionar un sistema sobre el cual determinar la curva de crecimiento del *L. casei* en el nuevo medio propuesto.

Por último, para analizar el efecto del proceso de estabilización (lavado, centrifugado y secado al vacío) sobre la viabilidad del *L. casei*, se realizó otro lote de producto en donde se evaluó el recuento del probiótico en cada etapa del proceso y finalmente en el PC conteniendo *L. casei*. El porcentaje de células probióticas recuperadas luego del secado al vacío se calculó de acuerdo a la Ecuación (1), informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  desvío estándar (DE) de las determinaciones realizadas por duplicado a partir de muestras independientes. Los resultados del porcentaje de supervivencia se expresaron en base seca.

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Log (UF/g)}_{\text{Final}}}{\text{Log (UFC/g)}_{\text{Inicial}}} \quad (1)$$

## 2.2. Métodos

### 2.2.1 *Determinación de la viabilidad del Lactobacillus casei*

El recuento de células viables fue realizado por recuento en profundidad mediante diluciones seriadas de la muestra en agua peptona al 0,1% (p/v) (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia). Alicuotas de 0,1 mL de muestra de las diluciones seleccionadas fueron plaqueadas en profundidad en agar MRS (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia) seguido de incubación a 37 °C durante 72 hs en condiciones aeróbicas. Los resultados fueron expresados como log (UFC/g calabaza deshidratada).

El incremento celular de *L. casei* durante el período de incubación ( $\Delta$ UFC) fue expresado como la diferencia entre el recuento final e inicial, y calculado con la Ecuación (2). Cada determinación fue realizada por duplicado a partir de muestras independientes, informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

$$\Delta\text{UFC} = [\log(\text{UFC g}^{-1})]_{\text{Final}} - [\log(\text{UFC g}^{-1})]_{\text{Inicial}} \quad (2)$$

### 2.2.2 *Determinación del pH, la acidez y el concentración de ácido láctico en el sobrenadante*

El pH fue determinado con un electrodo combinado de vidrio  $\text{Ag}^{\circ}/\text{AgCl}$  conectado a un pH metro (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). La acidez titulable se determinó por titulación con NaOH 0,01 M y fenolftaleína como indicador, y los resultados fueron expresados como miliequivalentes de ácido láctico/g de calabaza deshidratada.

Ambas determinaciones fueron realizadas por duplicado para cada sistema, informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

La presencia y concentración de ácidos orgánicos se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la determinación cuali-cuantitativa se utilizó una columna de intercambio iónico (AMINEX HPX-87H, BioRad Labs, Richmond, CA, USA) asociada a un detector UV (Waters <sup>TM</sup> 996, Millipore Corporation, Milford, MA, USA). Las corridas cromatográficas se realizaron inyectando 20  $\mu\text{l}$  de muestra a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min a 60 °C utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,009 N como fase móvil. Los ácidos se detectaron a una longitud de onda de 214 nm y la identificación se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención con soluciones estándar de ácido láctico. La concentración de ácido láctico presente en las muestras se calculó en base a curvas de calibración con soluciones patrón de concentración conocida.

### 2.2.3 *Determinación de la cinética de crecimiento del L. casei*

Basado en los resultados del diseño factorial completo, un sistema fue seleccionado y un segundo lote de producto fue preparado y analizado. El crecimiento celular fue monitoreado

cada 3 h durante 72 h mediante el recuento en profundidad de células viables de *L. casei*. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado a partir de muestras independientes.

Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de Gompertz modificado (Ecuación 3), expresando el cambio de la población de microorganismos en función del tiempo (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & Van't Riet, 1990).

$$\ln \left( \frac{N}{N_0} \right) = C * \exp \left\{ - \exp \left[ \left( \frac{\mu_{max}}{C} \right) * (\text{lag} - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Dónde,  $N$  está definido como el recuento viable de *L. casei* a un determinado tiempo (h) durante el período de incubación (UFC/g calabaza deshidratada);  $N_0$  representa el recuento viable de *L. casei* al inicio del período de incubación (UFC/g calabaza deshidratada);  $C$  es el máximo crecimiento logarítmico sostenido de *L. casei*;  $\mu_{max}$  es la máxima velocidad de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ );  $\text{lag}$  es la duración de la fase de adaptación (expresado en h);  $t$  es el tiempo del período de incubación (expresado en h).

La curva de crecimiento fue realizada con dos concentraciones diferentes de inóculos iniciales:  $1,8 \pm 0,2$  y  $3,4 \pm 0,1$  log (UFC/g calabaza deshidratada), informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

#### 2.2.4 Características físico-químicas

El pH fue determinado al final del período de fermentación. La actividad de agua ( $a_w$ ) y el contenido de humedad fueron determinados sobre el PC. La  $a_w$  se midió utilizando un higrómetro a 20 °C (Aqualab Series 3, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA). El contenido de humedad se analizó utilizando un analizador de humedad (Ohaus MB-45, NJ, USA) a través de un perfil de secado de 5 min a 130 °C seguido de un secado a 105 °C hasta una pérdida de humedad menor a 1 mg en 30 seg.

Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado, a partir de muestras independientes, e informando el valor promedio  $\pm$  DE.

#### 2.2.5 Microestructura

La presencia de *L. casei* fue observada y confirmada por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) (XL-30 ESEM, Philips, Amsterdam, NH, Holanda). El PC conteniendo *L. casei* fue recubierto con una capa de oro y examinado bajo vacío con un voltaje de aceleración de 20 kV y magnificaciones hasta 6.500x.

### 2.2.6 Condiciones simuladas de la digestión gastrointestinal

La resistencia de *L. casei* a las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal fueron evaluadas en el PC reconstituido en dos bebidas comerciales, leche chocolatada (LCH 0,8%, p/v) y leche de soja con jugo de manzana (LS 0,5%, p/v). La reconstitución se realizó adicionando el PC seguido de una homogeneización (T25 Ultra-Turrax® IKA, Guangzhou, Cantón, China) a una velocidad 9.500 rpm durante 30 segundos. En paralelo, se ensayaron los sistemas control, LSc y LCHc, adicionando células libres de *L. casei* resuspendidas en solución fisiológica luego de haber sido incubadas en caldo MRS. El ensayo fue realizado de acuerdo a Guergoletto, Magnani, Martin, Andrade, & Garcia (2010), con algunas modificaciones. El procedimiento incluyó 3 etapas: digestión en la boca, gástrica e intestinal. Brevemente, 0,12 g de PC conteniendo un recuento viable de *L. casei* de  $10,14 \pm 0,03$  log (UFC/g) fueron reconstituidos con las respectivas bebidas y luego se adicionaron 5 mL de saliva artificial [NaCl (6,2 g L<sup>-1</sup>), KCl (2,2 g L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0,22 g L<sup>-1</sup>), NaHCO<sub>3</sub> (1,2 g L<sup>-1</sup>)] seguidos de agitación durante 2 min con vortex (MSI minishaker IKA®, Campinas, SP, Brasil). La digestión gástrica se llevó a cabo mediante la adición de 30 mL de una solución de HCl-pepsina [pepsina al 0,3% (p/v) (Merck, 0,7 FIP-U/mg) en HCl 0,01 N] seguido de incubación a 37 °C (I-290, INGELAB, Buenos Aires, Argentina) con agitación orbital a 120 rpm durante 2 h. Luego, el pH de la solución gástrica se ajustó a 7,5-8,0 con una solución estéril de NaOH 2 M, y finalmente, 30 mL de solución intestinal (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M) conteniendo sales biliares (0,6% p/v) fueron adicionadas, seguido de incubación a 37 °C y agitación orbital a 120 rpm durante otras 2 h.

La viabilidad del *L. casei* se expresó como porcentaje de supervivencia a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal, mediante el cociente entre el valor logarítmico del recuento viable en el PC luego de la etapa de digestión gástrica o intestinal ( $N_t$ ) y el recuento inicial antes de la digestión ( $N_0$ ) en el PC [ $\log N_t / \log N_0 \times 100$ ].

Los ensayos *in vitro* se realizaron al menos por duplicado, a partir de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

### 2.2.7 Propiedades reológicas

El comportamiento reológico de las bebidas comerciales suplementadas con el PC conteniendo *L. casei* (LCH, leche chocolatada; LS, leche de soja con jugo de manzana) fueron evaluadas a través de un ensayo de flujo utilizando un reómetro (Paar Physica MCR 300, Antón Paar GmbH, Ostfildern-Scharnhausen, Alemania). En paralelo, también se ensayaron los sistemas controles (LCHc y LSc) bajo las mismas condiciones pero sin la suplementación del PC.

Las mediciones se realizaron a temperatura constante de 20 °C (Viscotherm VT2 Physica, Ostfildern-Scharnhausen, Alemania), utilizando una geometría de cono y plato de 40 mm de

diámetro (Modelo CP75-2). Aproximadamente, 5 mL de cada muestra se cargaron en la placa Peltier y se trabajó con un rango de velocidad de deformación de 0,1-1500 s<sup>-1</sup>. Las curvas de flujo se graficaron como esfuerzo de corte ( $\tau$ ; Pa) en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ; s<sup>-1</sup>), y se realizó un ajuste lineal para determinar la constante de proporcionalidad (viscosidad:  $\mu$ ; cp) de acuerdo a la Ecuación (4):

$$\tau = \mu \times \dot{\gamma} \quad (4)$$

Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado a partir de muestras independientes, informando en los resultados el  $R^2 \geq 0,90$  del ajuste a un modelo de regresión lineal.

### **2.2.8 Evaluación sensorial**

Los atributos de las bebidas comerciales suplementadas con el PC conteniendo *L. casei* (ver sección 2.2.6) fueron evaluados por un panel sensorial no entrenado. Las bebidas fueron adquiridas en el mercado local. Las marcas comerciales no se revelarán por razones de confidencialidad. En la evaluación sensorial participaron 120 voluntarios, consumidores frecuentes o no frecuentes de las bebidas, de edades entre 19 y 55 años. Las bebidas fueron almacenadas a temperatura ambiente antes de la suplementación con el objetivo de homogeneizar las condiciones durante las sesiones de evaluación sensorial. Cada panelista recibió una porción individual de 10 mL de cada bebida, en vasos plásticos codificados con 3 dígitos randomizados. El panel fue instruido en evaluar las bebidas suplementadas según el grado de agrado o desagrado en atributos de olor, textura en la boca, y aceptabilidad global usando una escala hedónica no estructurada de 9 puntos (**ANEXO B**). También se les instruyó en enjuagar la boca con agua mineral antes de comenzar con la evaluación y de comer una galletita de agua entre muestra y muestra para evitar el arrastre de efectos (Lawless & Heymann, 2010). En los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE del nivel de percepción de cada atributo evaluado y de la aceptabilidad global de las bebidas.

### **2.2.9 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental se realizó de acuerdo a un Diseño Factorial Completo (DFC) (2<sup>4</sup>) que incluyó el efecto de 4 factores (suero lácteo parcialmente desmineralizado (Mageral, Buenos Aires, Argentina), el tiempo de incubación, la concentración inicial de inóculo, y el volumen de agua destilada) con 2 niveles por cada factor y puntos centrales. Los niveles de los factores fueron seleccionados de acuerdo a ensayos previos y se encuentran detallados en la **Tabla II.1**. El diseño experimental se realizó en un bloque y los puntos centrales fueron realizados por

cuadruplicado. El ensayo se llevó a cabo en dos oportunidades, observando la misma tendencia en ambos casos, sin embargo, los resultados del último ensayo son reportados en los resultados. El coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) con un valor  $\geq 70\%$  y la prueba de falta de ajuste con un p-valor  $\geq 0,05$  fueron utilizados para reportar los factores del diseño experimental. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) con un valor  $\geq 90\%$  y el estadístico de Durbin-Watson (DW) con un valor  $\geq 1,0$  fueron utilizados para validar el ajuste al modelo de regresión no lineal. El coeficiente de correlación de Pearson entre las variables cuantitativas también fue analizado y reportado.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un ANOVA con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 0,05 seguido de un Test de Fisher (LSD) para establecer diferencias significativas entre las muestras. El test  $t$  de Student se utilizó en la aceptabilidad del consumidor.

Para el análisis del diseño experimental, las curvas de regresión no lineal, las correlaciones y los análisis estadísticos de los resultados se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV (V 2.15.06, 2007, Warrenton, VA, USA).

**Tabla II.1.** DFC (2<sup>4</sup>) con 4 factores, dos niveles por cada factor y puntos centrales.

Sistemas	Suero lácteo <sup>1</sup>		Tiempo de incubación		Inoculo Inicial <sup>1</sup>		Agua <sup>1</sup>	
	G		Horas		log (UFC/mL)		mL	
	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar
0	0	0,2	0	48	0	4,68	0	15
0	0	0,2	0	48	0	4,68	0	15
0	0	0,2	0	48	0	4,68	0	15
0	0	0,2	0	48	0	4,68	0	15
1	1	0,4	1	72	1	7,68	1	20
2	1	0,4	1	72	-1	1,68	-1	10
3	1	0,4	-1	24	1	7,68	-1	10
4	1	0,4	-1	24	-1	1,68	1	20
5	-1	0	1	72	1	7,68	-1	10
6	-1	0	1	72	-1	1,68	1	20
7	-1	0	-1	24	1	7,68	1	20
8	-1	0	-1	24	-1	1,68	-1	10
9	1	0,4	1	72	1	7,68	-1	10
10	1	0,4	1	72	-1	1,68	1	20
11	1	0,4	-1	24	1	7,68	1	20
12	1	0,4	-1	24	-1	1,68	-1	10
13	-1	0	1	72	1	7,68	1	20
14	-1	0	1	72	-1	1,68	-1	10
15	-1	0	-1	24	1	7,68	-1	10
16	-1	0	-1	24	-1	1,68	1	20

<sup>1</sup>Cantidades agregadas a un gramo de cáscara y pulpa de calabaza deshidratada.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Efecto de los factores estudiados sobre la viabilidad del *L. casei*

Los resultados correspondientes al recuento viable del *L. casei*,  $\Delta$ UFC, pH y acidez titulable se encuentran detallados en la **Tabla II.2**, mientras que en la **Tabla II.3** se resumen los coeficientes de regresión de los 4 factores estudiados (suero lácteo, tiempo de incubación, inoculo inicial y volumen de agua). En general, los signos de los coeficientes coincidieron con los respectivos efectos estandarizados observados.

En el presente trabajo de investigación, la temperatura de fermentación fue de 37 °C debido a que las cepas probióticas provienen del tracto gastrointestinal. Autores como Costa, Fonteles,

De Jesus, & Rodrigues (2013) y Pereira, Maciel, & Rodrigues (2011) han reportado que temperaturas de fermentación entre 30-31 °C fueron las condiciones más adecuadas para obtener la mayor viabilidad de *L. casei* en bebidas a base de frutas tropicales.

Luego del tiempo de incubación de 24, 48 o 72 h en la calabaza, se observó un incremento en la viabilidad de *L. casei* en todos los sistemas respecto del recuento en el inóculo inicial. La significancia estadística de cada efecto se evaluó comparando el cuadrado medio con un estimado del error experimental. Los efectos con un p-valor  $\leq 0,05$  fueron significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95%. El tiempo de incubación ( $p < 0,015$ ) y el inóculo inicial ( $p \leq 0,02$ ) presentaron un efecto positivo sobre la viabilidad de *L. casei*. Sin embargo, el factor interacción fue negativo ( $p \leq 0,015$ ), lo cual puede explicarse por la falta de nutrientes en el medio.

El incremento de *L. casei* ( $\Delta$ UFC) se vio afectado de forma positiva por el tiempo de incubación ( $p \leq 0,015$ ), y de forma negativa por el inóculo inicial ( $p \leq 0,010$ ). Mientras que el factor interacción, al igual que fue observado en la viabilidad de *L. casei*, presentó un efecto negativo y significativo ( $p \leq 0,02$ ) sobre el  $\Delta$ UFC.

En cuanto al volumen de agua y el suero lácteo, estos factores no presentaron un efecto significativo sobre la viabilidad del probiótico o el  $\Delta$ UFC. Por lo tanto, independientemente de la presencia o ausencia de agua y suero lácteo, se observó que los sistemas con el nivel más bajo de inóculo inicial ( $10^2$  UFC/mL) incrementaron entre 3-4 ciclos log respecto del recuento inicial de *L. casei* en los sistemas con 24 h de incubación, mientras que en los sistemas con 72 h el incremento fue de 7-8 ciclos log (**Tabla II.2**).

La síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas, algunos carbohidratos y lípidos, cofactores de enzimas, y otras sustancias están asociadas con el uso de nitrógeno por los microorganismos. En este contexto, la suplementación de suero lácteo podría ser útil como fuente de carbono y nitrógeno.

A modo de ejemplo, Aguirre-Ezkauriatza, Aguilar-Yáñez, Ramírez-Medrano, & Alvarez (2010) así como también Bernárdez, Amado, Castro, & Guerra (2008) han reportado que el suero podría ser utilizado para producir biomasa de *L. casei* a través de la aplicación de tecnologías de fermentación. Por otro lado, Horackova, Sedlackova, Sluková, & Plocková (2014), han demostrado que la adición de suero a leche en polvo no mejoró el recuento final de *L. casei* luego de 24 h de incubación a 37 °C. En el presente trabajo, se observó que la presencia de suero lácteo no tuvo un efecto significativo ( $p \geq 0,05$ ) sobre la viabilidad de *L. casei* y el  $\Delta$ UFC, sugiriendo de esta forma que los subproductos de calabaza pueden ser utilizadas como sustrato y, en consecuencia, incrementar el rendimiento de la biomasa bajo las condiciones ensayas en el presente trabajo.

Por otro lado, cabe destacar que el efecto del volumen de agua sobre el recuento celular y el  $\Delta$ UFC fue negativo y no significativo ( $p \geq 0,05$ ), presentando el mismo signo en el coeficiente de regresión (**Tabla II.3**). El hecho de que un mínimo contenido de agua pueda ser utilizado sin afectar el crecimiento celular, representa una ventaja adicional desde un punto de vista de sustentabilidad.

A pesar del bajo contenido de agua, luego de la centrifugación de todos los sistemas se recolectó un volumen variable del sobrenadante. Estos sobrenadantes podrían presentar en su composición productos del metabolismo de fermentación que son responsables del descenso del pH (Pereira et al., 2011; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son importantes por su habilidad de transformar azúcares fermentables en ácido láctico. Si bien el objetivo del presente trabajo no fue producir ácido láctico, la presencia de este metabolito está parcialmente asociada a la producción de biomasa (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010). En este contexto, el pH y la acidez titulable fueron determinados (**Tabla II.2**) y analizados (**Tabla II.3**). El pH de los sistemas estudiados fue afectado de forma negativa por el inóculo inicial ( $p \leq 0,015$ ) y el tiempo de incubación ( $p \leq 0,025$ ), mientras que el término interacción tuvo un efecto positivo ( $p \leq 0,015$ ). Sin embargo, este coeficiente fue un orden de magnitud menor que el coeficiente lineal del tiempo de incubación (**Tabla II.3**).

Consecuentemente con el pH, la acidez titulable fue afectada positivamente por el tiempo de incubación ( $p \leq 0,025$ ) y el inóculo inicial ( $p \leq 0,035$ ). Además, se observó un efecto positivo del suero lácteo ( $p \leq 0,035$ ). El hecho de que este efecto solo se observó en la acidez titulable y no en el pH, podría explicarse por la capacidad buffer del suero lácteo (Horackova S., Sedlackova P., 2014). Un efecto positivo se observó para la interacción entre suero lácteo y tiempo de incubación ( $p \leq 0,05$ ), el cuál coincidió con el signo del coeficiente de regresión (**Tabla II.3**). Con respecto al volumen de agua, no se observó un efecto significativo ( $p \geq 0,05$ ) sobre la acidez titulable. Por lo tanto, más células en el inóculo inicial junto con tiempos prologados de incubación y la presencia de suero tienden a incrementar la producción de ácido láctico.

A su vez, se observó una correlación negativa y significativa entre el pH del sobrenadante y la acidez titulable (Correlaciones momento producto de Pearson,  $r = -0,777$ ;  $p \leq 0,0015$ ), y también con la viabilidad de *L. casei* ( $r = -0,961$ ;  $p \leq 0,0005$ ). Este hecho significa que el descenso del pH y la producción de ácido láctico estuvieron asociados al crecimiento de *L. casei* mediante la utilización de los desperdicios de calabaza como sustrato.

Por otro lado, la exposición de las BAL al estrés ácido durante el tiempo de fermentación podría resultar en la pérdida de viabilidad celular o muerte celular debido a la acumulación intracelular de ácido láctico disociado y daños en la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) y

proteínas presentes en la membrana celular (Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011; De Angelis & Gobbetti, 2004). El pH al final del proceso de fermentación en yogurt y jugos ha sido reportado como el factor más influyente en el crecimiento y viabilidad en probióticos (Champagne et al., 2011).

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, el descenso en el pH final en los sistemas ensayados estuvo acompañado de un incremento en el recuento de *L. casei* en todos los sistemas. Por lo tanto, no se observó un efecto negativo del descenso de pH sobre la viabilidad del probiótico, probablemente como resultado de una resistencia intrínseca a pH ácidos de la cepa de *L. casei*, como así también a un efecto protector de la matriz vegetal durante el tiempo de incubación (Vinderola et al., 2011).

Por otra parte, Costa et al. (2013), Guergoletto et al. (2010) y Pereira et al. (2011) han reportado que cepas de *L. casei* usualmente adicionadas a matrices vegetales exhiben un crecimiento óptimo a  $\text{pH} \geq 5,5$ . El pH de los sistemas 4, 8, 12 y 16, con menor tiempo de incubación y menor concentración de inóculo inicial, estuvieron en línea con estos resultados ya que presentaron  $\text{pH} \geq 5,5$ .

En base a los resultados obtenidos del DFC, el sistema con menor concentración de células en el inóculo inicial, menor contenido de agua, sin la suplementación de suero lácteo y 24 h de incubación fue seleccionado para continuar con los siguientes ensayos (sistema 8).

**Tabla II.2.** Variables repuestas del DFC (2<sup>4</sup>): Viabilidad de *L. casei*, pH, Acidez titulable y  $\Delta$ UFC.

Sistemas	Viabilidad de <i>L. casei</i> log (UFC/g)	pH	Acidez titulable mEq ácido láctico/g	$\Delta$ UFC
0	9,5 ± 0,2 <sup>a,c,d,e</sup>	3,83 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>a,g</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>a,g</sup>
0	9,5 ± 0,2 <sup>a,c,d,e</sup>	3,85 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>a,g</sup>
0	9,5 ± 0,1 <sup>a,c,d,e</sup>	3,83 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,1 <sup>a,g</sup>
0	9,6 ± 0,3 <sup>a,c,d,e</sup>	3,82 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>a,g</sup>
1	9,2 ± 0,4 <sup>a,d,e</sup>	3,60 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,4 <sup>b,e</sup>
2	8,9 ± 0,4 <sup>a,d</sup>	3,93 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,03 <sup>a,g</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>c</sup>
3	9,2 ± 0,2 <sup>a,d,e</sup>	4,02 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,07 <sup>a,g,h</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>b,e</sup>
4	5,57 ± 0,05 <sup>b</sup>	6,07 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,89 ± 0,005 <sup>a,g</sup>
5	9,02 ± 0,13 <sup>a,d</sup>	4,09 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
6	9,1 ± 0,1 <sup>a,d</sup>	4,09 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>d</sup>	7,4 ± 0,1 <sup>c</sup>
7	8,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,17 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,01 ± 0,05 <sup>b</sup>
8	5,51 ± 0,01 <sup>a,c,d,e</sup>	6,18 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,84 ± 0,01 <sup>a,g</sup>
9	9,5 ± 0,1 <sup>a,c,d,e</sup>	3,71 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,07 <sup>e</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>b,e</sup>
10	10,4 ± 0,1 <sup>c,e</sup>	3,78 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,60 ± 0,01 <sup>f</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>d,f</sup>
11	9,8 ± 0,5 <sup>d,e</sup>	3,93 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>g</sup>	2,1 ± 0,5 <sup>b,e</sup>
12	5,74 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,82 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>c</sup>	4,07 ± 0,03 <sup>a</sup>
13	10,31 ± 0,09 <sup>c,e</sup>	4,04 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>d</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>e</sup>
14	9,9 ± 0,60 <sup>c,d,e</sup>	4,02 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,1 <sup>d,h</sup>	8,2 ± 0,6 <sup>c,f</sup>
15	9,1 ± 0,3 <sup>a,d</sup>	4,15 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
16	4,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	6,23 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,99 ± 0,5 <sup>e,g</sup>

$\Delta$ UFC: crecimiento de *L. casei* durante el tiempo de incubación.

Valores expresados en g de calabaza deshidratada. Valores medios  $\pm$  DE para la viabilidad de *L. casei* (n = 2), pH (n = 3), acidez titulable (n = 2) y  $\Delta$ UFC (n = 2).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas.

**Tabla II.3.** Coeficientes de regresión de los efectos estudiados sobre la viabilidad de *L. casei*, pH, acidez titulable y  $\Delta$ UFC.

	Coeficientes de regresión			
	Viabilidad de <i>L. casei</i> <sup>1</sup>	pH	Acidez titulable <sup>2</sup>	$\Delta$ UFC <sup>3</sup>
<b>Constantes</b>	2,53	7,96	0,153	2,95
<b>A: Suero lácteo</b>	2,31	-0,119	-2,31 *	0,523
<b>B: Tiempo de incubación</b>	0,115 *	-0,057 *	0,011 *	0,096 *
<b>C: Inoculo inicial</b>	0,852 *	-0,547 *	0,091 *	-0,110 *
<b>D: Agua</b>	-0,107	0,024	-0,018	-0,113
<b>AB</b>	-0,015	0,020	0,039 *	-0,035
<b>AC</b>	-0,237	-0,225	0,224	-0,077
<b>AD</b>	0,046	-0,0034	0,052	0,144
<b>BC</b>	-0,014 *	0,0083 *	-0,0014	-0,0135 *
<b>BD</b>	0,0006	-0,0003	0,0002	0,0014
<b>CD</b>	0,012	-0,002	0,0010	0,0058
<b>R<sup>2</sup></b>	93,7	93,8	93,6	96,1
<b>R<sup>2</sup><sub>aj</sub></b>	83,2	83,6	84,6	90,4
<b>Falta de ajuste</b>	0,09	0,17	0,16	0,08

\* Efecto estadísticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) con un nivel del 95,0% de confianza. R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación. R<sup>2</sup><sub>aj</sub>: coeficiente de determinación ajustado. <sup>1</sup> Viabilidad del *L. casei* expresada como log (UFC/g calabaza deshidratada). <sup>2</sup> Acidez titulable expresada como mEq. de ácido láctico/g calabaza deshidratada. <sup>3</sup> Crecimiento del *L. casei* durante el tiempo de incubación.

Cuando un nuevo medio es propuesto, es de utilidad proveer la caracterización del crecimiento del microorganismo en las nuevas condiciones. En este sentido, los parámetros cinéticos de crecimiento de *L. casei* fueron determinados. La regresión no lineal de los datos representados en la **Figura II.1** describe la curva de crecimiento *L. casei*.

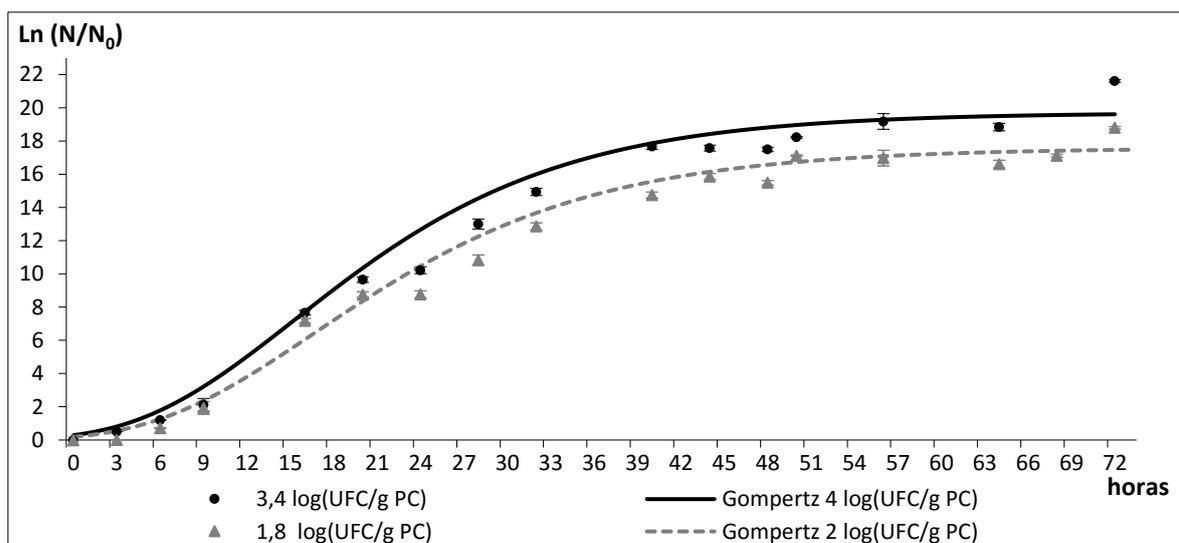
Adicionalmente al inóculo inicial con la menor concentración de células ( $1,8 \pm 0,2$  log (UFC/g PC)), una segunda curva de crecimiento fue realizada con una concentración inicial de  $3,4 \pm 0,1$  log (UFC/g PC). Como se puede observar en la **Figura II.2**, el crecimiento de *L. casei* fue lento durante las horas iniciales de la fermentación (fase lag o período de adaptación), posiblemente debido al tiempo que requieren los microorganismos para hidrolizar los nutrientes o sintetizar los compuestos que son necesarios para su crecimiento (Willey et al. 2011).

Luego de aproximadamente 6 h, ambos sistemas presentaron un crecimiento celular exponencial hasta las 20 h. A partir de las 20 h y hasta el final del ensayo (72 h) el crecimiento

exponencial fue parcialmente inhibido, posiblemente debido a la falta de nutrientes en el medio (fase estacionaria). El recuento viable de *L. casei* fue de  $5,61 \pm 0,12$  y  $7,82 \pm 0,05$  log (UFC/g PC) a las 24 h de fermentación para el sistema inoculado con una concentración inicial de  $1,8 \pm 0,2$  y  $3,4 \pm 0,1$  log (UFC/g PC), respectivamente.

Pereira et al. (2011) han reportado que el proceso de fermentación de jugo de castaña de cajú con *L. casei* presentó una fase de adaptación corta, seguida de una fase logarítmica de 6 a 14 h, y luego de este periodo, se observó pérdida celular (fase de muerte). La fase logarítmica de *L. casei* en los desperdicios de calabaza estuvo dentro de las 6 a 24 h. Luego de la fase estacionaria no se observó pérdida de la viabilidad celular, posiblemente como resultado de la calabaza como sustrato y simultáneamente como soporte protector del microorganismo probiótico.

La tasa de máximo crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) se determinó en el nuevo medio propuesto. Los valores de la  $\mu_{max}$  duplicaron consistentemente, siendo  $0,6 \pm 0,1$  h<sup>-1</sup> ( $R^2_{aj}$ : 98,5) and  $0,7 \pm 0,2$  h<sup>-1</sup> ( $R^2_{aj}$ : 96,7) para un inóculo inicial de  $1,8 \pm 0,2$  y  $3,4 \pm 0,1$  log (UFC/g PC), respectivamente. También se determinaron los parámetros de *C* y *lag* (Tabla II.4). Estos parámetros son de interés cuando el proceso necesita ser escalado y para el diseño de nuevos equipos.



**Figura II.2.** Curva de crecimiento del *Lactobacillus casei* en un medio a base de subproductos de calabaza a 37 °C.

Líneas negras y grises representan el ajuste de los datos experimentales al modelo modificado de Gompertz. Líneas negras y círculos (●) corresponden al inóculo inicial de 3,4 log (UFC/g PC); líneas grises y triángulos (▲) corresponden al inóculo inicial de 1,8 log (UFC/g PC). Barras representan la DE del valor promedio de cada punto (n = 2).

**Tabla II.4.** Valores de los parámetros ajustados al modelo modificado de Gompertz de la curva de crecimiento del *L. casei* en un medio a base de subproductos de calabaza.

Parámetros	Inóculo inicial	
	1,8 log (UFC/g PC)	3,4 log (UFC/g PC)
<b>C</b>	17,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	19,7 ± 1,4 <sup>a</sup>
<b>μ<sub>max</sub></b>	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>Lag</b>	5,6 ± 2,8 <sup>c</sup>	5,7 ± 4,1 <sup>c</sup>
<b>R<sup>2</sup><sub>aj</sub></b>	98,5	96,7

PC: polvo de calabaza conteniendo *L. casei*. C: máximo crecimiento logarítmico sostenido del *L. casei* (adimensional). μ<sub>max</sub>: máxima velocidad de crecimiento expresado en h<sup>-1</sup>. Lag: duración de la fase de adaptación expresada en h. R<sup>2</sup><sub>aj</sub>: coeficiente de determinación ajustado (%).

Valores medios ± DE. Letras similares denotan ausencia de diferencias significativas (p ≥ 0,05).

### 3.2. Efecto de las operaciones unitarias subsecuentes sobre la supervivencia del *L. casei*

Con el objetivo de analizar el efecto de las operaciones unitarias subsiguientes (centrifugado, lavado y secado al vacío) al proceso de fermentación sobre la supervivencia de *L. casei*, un nuevo lote con una mayor cantidad de subproductos de calabaza (10 g) fue preparado bajo las mismas condiciones que el sistema óptimo del DFC (sistema 8). Por lo tanto, a 10 g de calabaza se adicionaron 100 mL de agua destilada y un inóculo inicial con una concentración de células probióticas de 2,5 log (UFC/g calabaza deshidratada). Al final del proceso de fermentación, el recuento de *L. casei* fue de 8,8±0,1 log (UFC/g calabaza), pH de 6,09±0,05 y 0,40±0,01 mEq. de ácido láctico/g calabaza deshidratada.

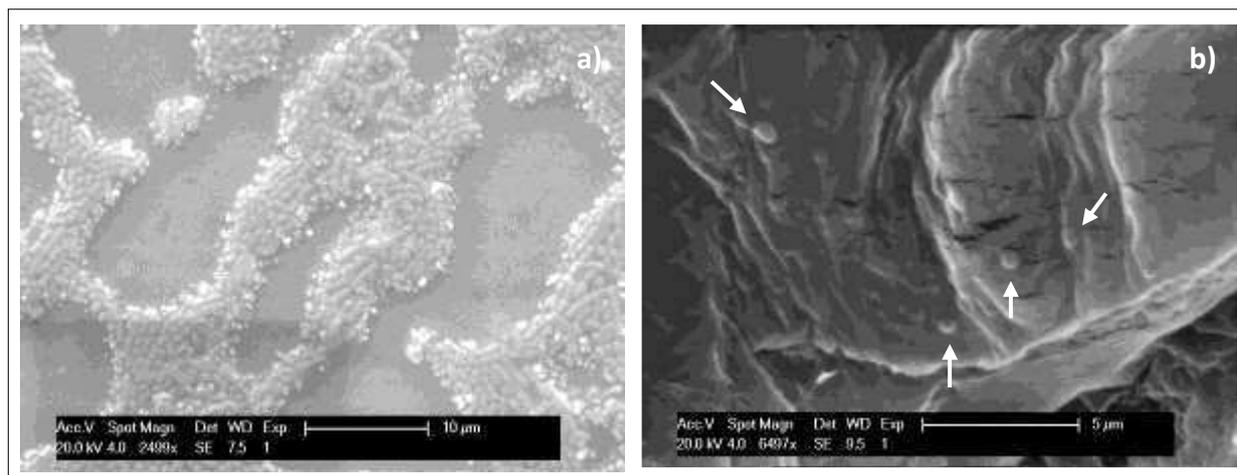
Al comparar el recuento viable del *L. casei* con el valor obtenido a partir de los coeficientes de predicción (**Tabla II.3**) se observó un recuento mayor de células, lo cual podría deberse al efecto de escalado del proceso. El ensayo con 1 g de calabaza fue realizado en tubos cónicos de 50 mL, mientras que el ensayo con 10 g de calabaza se llevó a cabo en frascos cilíndricos de 500 mL, siendo la agitación más efectiva como resultado de una relación diámetro-altura mayor (Doran, 2008). Este mismo efecto se observó en un escalado piloto para preparar 3,6 kg de calabaza a partir de una consulta proveniente del sector de Vinculación Tecnológica de CONICET (**ANEXO C**).

Una vez finalizado el período de fermentación, el residuo de calabaza fue centrifugado, secado al vacío a temperatura ambiente y tamizado con una malla de acero inoxidable (ASTM > 840 micrones), presentando un recuento final de bacterias probióticas de 7,67±0,06 log (UFC/g PC). Luego del proceso de secado al vacío, el porcentaje de supervivencia del *L. casei* fue del 87%, lo cual se traduce en una reducción 1,13 ciclos logarítmicos durante el proceso. Guergoletto et al. (2010) han reportado un porcentaje de supervivencia de *L. casei* del 79% en salvado de avena,

76% en harina de banana verde, 64% en fibra de manzana y 55% en inulina después del secado al vacío a 45 °C durante 12 o 25 h hasta alcanzar un contenido de humedad de 5,6% y una  $a_w$  final de 0,35-0,25. En nuestro trabajo, el producto final presentó un contenido de humedad de  $7,0\pm 0,2\%$  y una  $a_w$  de  $0,2\pm 0,09$ .

Durante el secado al vacío, el daño celular podría ser reducido a daños por deshidratación, llevando a una alta viabilidad de probióticos en el producto final (Bauer, Schneider, Behr, Kulozik, & Foerst, 2012). Incluso, la aplicación de períodos de incubación como paso previo al proceso de secado podría inducir cambios en el comportamiento tecnológico de células probióticas, tales como resistencia al calor y liofilización para mejorar su supervivencia, y estabilidad durante el almacenamiento (Makinen, Berger, Bel-Rhliid, & Ananta, 2012). En este sentido, autores como Bauer et al. (2012) han reportado una elevada tasa de supervivencia de *L. paracasei ssp. paracasei* después del secado al vacío a bajas temperaturas con un previo proceso de fermentación en condiciones de estrés controladas (pH 6,3).

Por lo tanto, la resistencia al proceso de secado al vacío junto con una alta tasa de supervivencia del *L. casei* reportados en el presente trabajo, podrían estar asociados tanto a la aplicación de un proceso de fermentación previo, así como también, al efecto protector de la matriz de calabaza. Es importante resaltar que estos resultados fueron obtenidos a escala de laboratorio, razón por la cual ensayos adicionales deberían ser conducidos para escalar el proceso descrito. En la **Figura II.3 a y b** se muestran las imágenes microscópicas representativas de las células libres de *L. casei* re-suspendidas en caldo nutritivo y las células probióticas adheridas a la matriz de subproductos de calabaza luego del secado al vacío, respectivamente. Estas observaciones confirmaron la adherencia del probiótico a la matriz vegetal, así como también la ausencia de cambios morfológicos visibles luego de la fermentación y posterior secado al vacío. Imágenes microscópicas similares de células de *L. casei* fueron reportados por Guergoletto et al. (2010) y Kourkoutas, Xolias, Kallis, Bezirtzoglou, & Kanellaki (2005).



**Figura II.3.** Microscopia electrónica de células libres de *L. casei* (a) y células probióticas adheridas a la matriz de calabaza secada al vacío (b).

Las flechas indican las células probióticas.

### 3.3. Caracterización físico-química del sobrenadante

Si bien se llevó a cabo un proceso con bajo agregado de agua, luego de la centrifugación del sistema se obtuvieron  $\sim 4$  mL de sobrenadante/g de calabaza deshidratada. En este aspecto es de interés caracterizar este sobrenadante ya que en el proceso propuesto representa el efluente.

El pH, acidez titulable y concentración de ácidos orgánicos se estudió en el sobrenadante obtenido después del proceso de fermentación de los subproductos de calabaza con *L. casei* en el sistema óptimo del DFC (sistema 8) pero partiendo de 10 g de calabaza en lugar de 1 g. En paralelo, se llevó a cabo un sistema control bajo las mismas condiciones de elaboración pero sin la adición del probiótico. El sistema control presentó un pH de  $5,82 \pm 0,03$ , mientras que se determinó  $0,252 \pm 0,01$  meq de ác. láctico/g calabaza deshidratada. El sistema fermentado presentó un pH de  $4,64 \pm 0,01$  y  $0,455 \pm 0,01$  mEq/g calabaza deshidratada. Mediante HPLC se identificó y corroboró que el ácido láctico fue el mayor responsable de la acidez encontrada. No se encontró ácido acético en las condiciones ensayadas. Cabe destacar que el ácido láctico tiene una amplia aplicación como insumo en la industria de alimentos como acidulante, aroma o preservante, así como en la síntesis de polímeros bio-degradables (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000; Naveena et al., 2005). Esto permitiría concluir que el proceso que se llevó a cabo genera efluentes potencialmente aprovechables, lo que reduciría la generación de nuevos subproductos, demostrando una ventaja adicional en cuanto a la sustentabilidad de la propuesta.

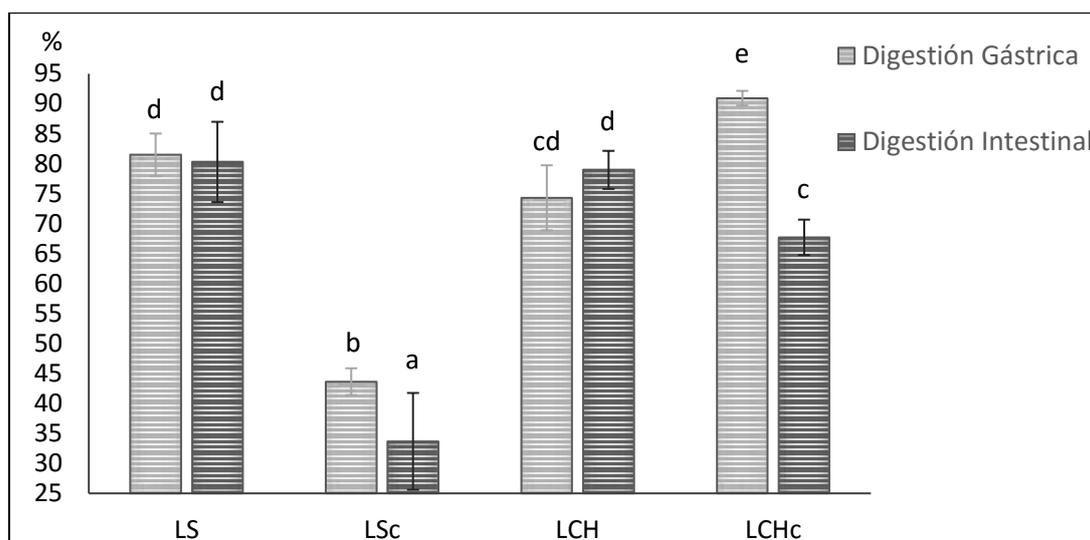
### 3.4. Evaluación del polvo de calabaza conteniendo *L. casei* como suplemento dietario

Con el objetivo de evaluar el PC como suplemento dietario, se realizó un nuevo lote de producto obteniendo una concentración final de *L. casei* de  $\approx 9 \log$  (UFC/g PC). A fin de obtener una concentración de microorganismos probióticos  $> 10^6$  UFC/g (ANMAT, 2011), las dos bebidas comerciales fueron suplementadas con 0,125 g de PC por porción de leche chocolatada (LCH) o leche de soja con jugo de manzana (LS), seguido de un proceso de homogeneización. Debido a la capacidad buffer de la LCH, el volumen inicial (15 mL) a ser digerido fue reducido respecto de la LS (20 mL) para alcanzar un  $\text{pH} < 2,5$  durante la fase gástrica usando la misma cantidad de solución gástrica para la LCH y LS.

Antes de ser suplementadas con el PC, la LCH presento un  $\text{pH}$  de 6,8, mientras que la LS mostró un valor de 4,1. En ambos casos, luego de la suplementación no se observaron cambios en el  $\text{pH}$ . En la **Figura II.4** se muestra el porcentaje de supervivencia de células *L. casei* luego de las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal en las dos matrices testeadas: Leche Chocolateada (LCH) y Leche de Soja (LS). La viabilidad de *L. casei* luego del proceso de homogeneización estuvo dentro de los valores exigidos por la regulación local (ANMAT, 2011), mostrando un recuento viable de  $7,7 \pm 0,2$ ,  $7,4 \pm 0,1$ ,  $7,9 \pm 0,2$  y  $7,5 \pm 0,2 \log$  (UFC/mL) en LS, LSc, LCH y LCHc, respectivamente. Luego de la digestión gástrica e intestinal, no se observaron diferencias ( $p \geq 0,05$ ) en el porcentaje de supervivencia del *L. casei* en LS o LCH, presentando valores  $>74\%$ . Estos resultados coinciden con Guergoletto et al., (2010), quien demostró una elevada tasa de supervivencia de *L. casei* en salvado de avena sin la adición de ningún agente protector.

En contraposición, se observó una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) cuando células libres de *L. casei* fueron adicionadas a la LCHc y LSc, donde la supervivencia fue  $44 \pm 2\%$  en la LSc y  $91 \pm 1\%$  en la LCHc después de la digestión gástrica; mientras que después de la digestión intestinal la supervivencia fue del  $34 \pm 8\%$  y  $68 \pm 3\%$  para la LSc y la LCHc, respectivamente.

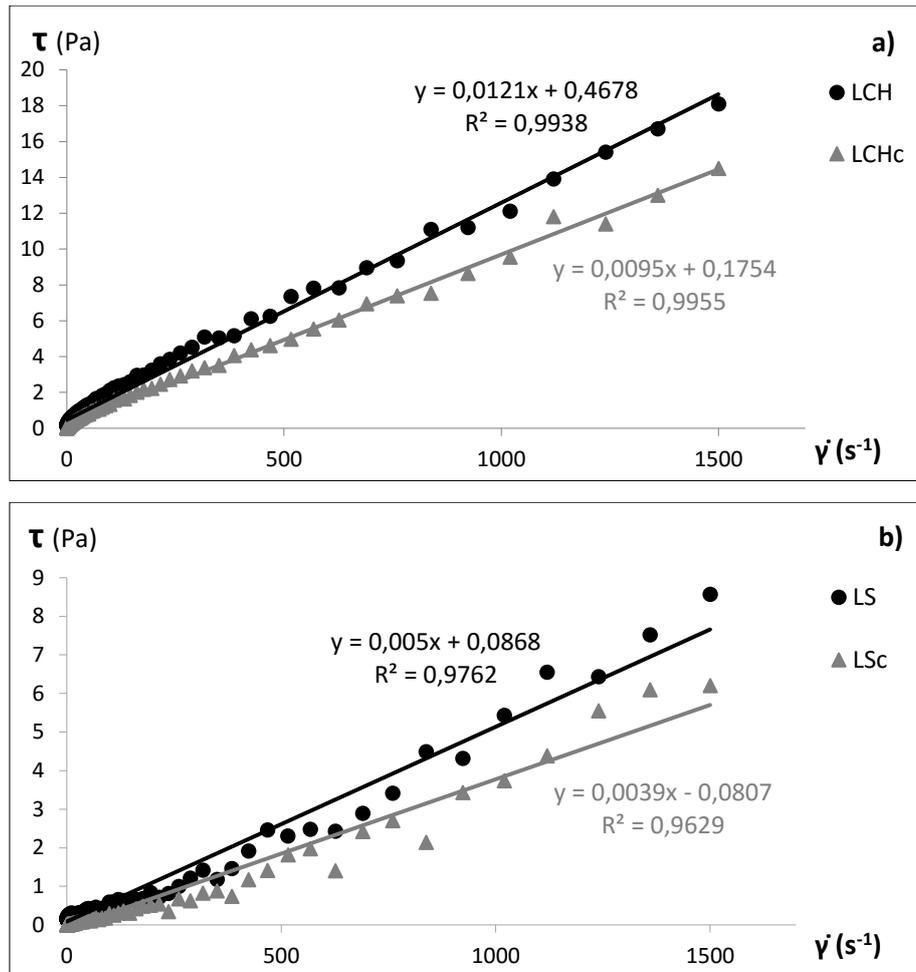
En la LSc se pudo observar una reducción drástica en la viabilidad de *L. casei* de 5 ciclos log, que podría deberse al bajo  $\text{pH}$  inicial (4,1) de la bebida. Mientras que la reducción de la viabilidad del probiótico fue de 1,3 ciclos log en la LS, posiblemente debido a la protección por parte de la microestructura de la calabaza que contribuiría a proteger a las células probióticas durante su tránsito a través de las severas condiciones del medio gastrointestinal (Senaka Ranadheera et al., 2012). Cabe destacar, que estos resultados son de importancia considerando la aplicación del PC obtenido en matrices vegetales o productos de origen animal con bajo  $\text{pH}$ .



**Figura II.4.** Porcentaje de supervivencia del *Lactobacillus casei* después de las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal en leche de soja (LS) y leche chocolatada (LCH) suplementadas con el polvo de calabaza conteniendo el probiótico. Ensayos controles con Leche de soja (LSc) y leche chocolatada (LCHc) suplementadas con células libres del *L. casei*.

Valores promedios  $\pm$  DE (n = 2). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En la **Figura II.5 a y b**, se pueden observar las curvas más representativas del comportamiento del flujo en la LCH y LS suplementada con el PC y en las bebidas sin suplementar (LSc y LCHc). Los datos experimentales ajustados a una ecuación de regresión lineal mostraron que tanto la LCH como la LS presentaron un comportamiento del fluido tipo Newtoniano, es decir que presentaron una viscosidad ( $\mu$ ) constante ante la velocidad de deformación e independiente del tiempo de aplicación del esfuerzo. La suplementación de la LCH con el PC incrementó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la  $\mu$  respecto de LCHc, presentando valores de  $11,7 \pm 0,6$  cp y  $9,2 \pm 0,5$  cp, respectivamente. Resultados similares se observaron en la LS, mostrando valores significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) en la  $\mu$  de la LS ( $5,1 \pm 0,2$  cp) respecto de la LSc ( $4,0 \pm 0,2$  cp).



**Figura II.5.** Curva de esfuerzo de corte ( $\tau$ ) en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) en **(a)** Leche Chocolatada (LCH) y **(b)** Leche de Soja con jugo de manzana (LS) suplementada con el polvo de calabaza conteniendo el *L. casei* (●) y las bebidas sin suplementar (▲) (sistemas controles).

LCH: leche chocolatada suplementada con el PC. LCHc: leche chocolatada sin suplementar. LS: leche de soja con jugo de manzana suplementada con el PC. LSs: leche de soja con jugo de manzana sin suplementar. Las líneas rectas representan los ajustes lineales de los datos experimentales.

La aceptación del consumidor es considerado una de las principales claves para el éxito de ingredientes funcionales en el mercado (Granato, Branco, Nazzaro, Cruz, & Faria, 2010). La **Tabla II.5** muestra los resultados obtenidos de los atributos evaluados en las bebidas comerciales suplementadas con el PC conteniendo *L. casei*. Ambas bebidas suplementadas, LS y LCH fueron aceptadas por los consumidores. La aceptabilidad global, en ambos casos, obtuvo 7 de 9 puntos en la escala hedónica, recibiendo una clasificación de “*gustó moderadamente*”, y resultados similares fueron obtenidos para los atributos de olor. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los atributos de las bebidas, la calificación obtenida para la textura en la LCH suplementada mostró una tendencia a valores menores comparada con la LS. Probablemente,

el mayor porcentaje de PC en la LCH fue percibido por los panelistas produciendo un efecto desagradable de textura en la boca durante la degustación, y como consecuencia reduciendo la calificación del atributo. Por lo tanto, la concentración del PC como suplemento podría ser un factor limitante a ser considerado. En este sentido, más ensayos deberían realizarse usando el PC como ingrediente en diferentes formulaciones y concentraciones.

**Tabla II.5.** Aceptabilidad sensorial de las bebidas comerciales suplementadas con el polvo de calabaza conteniendo *L. casei*.

Atributos	LS		LCH	
	Valor	Calificación	Valor	Calificación
Olor	7 ± 2 <sup>a</sup>	Gusta moderamente	7 ± 2 <sup>a</sup>	Gusta moderamente
Textura en la boca	7 ± 2 <sup>b</sup>	Gusta moderamente	6 ± 2 <sup>b</sup>	Gusta ligeramente
Aceptabilidad global	7 ± 2 <sup>c</sup>	Gusta moderamente	7 ± 2 <sup>c</sup>	Gusta moderamente

LS: leche de soja con jugo de manzana. LCH: leche chocolatada.

Valores promedios ± DE (n = 120). Letras similares denotan ausencia de diferencias significativas (p ≥ 0,05).

#### 4. Conclusiones

Los subproductos de calabaza pudieron ser satisfactoriamente utilizados como sustrato y matriz soporte de *Lactobacillus casei*. El sistema seleccionado del DFC se caracterizó por presentar la menor concentración inicial de inóculo, el menor tiempo de incubación, sin la suplementación de suero lácteo, y el menor volumen de agua adicionada. Estas condiciones fueron las más adecuadas para el crecimiento del *L. casei*, y a su vez, confirmaron que la cepa probiótica pudo eficazmente utilizar los subproductos de calabaza como sustrato para incrementar el rendimiento de su biomasa a una tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) de  $\approx 0,6 \text{ h}^{-1}$ . Por otro lado, los metabolitos originados como subproductos del proceso de fermentación podrían ser potencialmente considerados como fuente/sustrato para la producción de ácido láctico.

La supervivencia del *L. casei* adherido a la matriz de subproductos de calabaza presentó una supervivencia > 80% luego de las subsiguientes operaciones de estabilización del nuevo ingrediente. Cuando la funcionalidad del PC fue evaluado a través de la suplementación de dos bebidas comerciales, se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia de células probióticas después de las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal comparado con las células libres del *L. casei*.

La reología de las bebidas suplementadas presentó un comportamiento de fluido tipo newtoniano con un incremento significativo de la viscosidad respecto de las bebidas sin suplementar.

La evaluación sensorial de las bebidas suplementadas con el PC recibió calificaciones > 6 en una escala hedónica de 9 puntos en olor, textura, y aceptabilidad global.

Por lo tanto, se puede concluir que los subproductos de calabaza son un buen insumo para la preparación de un nuevo ingrediente funcional conteniendo *L. casei*, aportando de esta forma valor agregado a los mismos. A su vez, el secado al vacío podría ser una técnica promisoría para obtener un producto con un elevado porcentaje de supervivencia de células probióticas y funcionalmente activas. Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar la estabilidad del polvo de calabaza con *L. casei* durante el almacenamiento, completar su caracterización físico-química y estudiar su funcionalidad como ingrediente para la industria de la alimentación.

### CAPÍTULO III

**Caracterización físico-química, funcional y estudio de la estabilidad durante el almacenamiento del ingrediente obtenido a partir de subproductos de calabaza como matriz soporte de *Lactobacillus casei***

## 1. Introducción

Los residuos o subproductos agro-industriales pueden también ser utilizados como una fuente no convencional de fibra dietaria (FD). El concepto que engloba la definición de FD deriva principalmente de la parte comestible de plantas, polisacáridos, lignina y componentes asociados que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado del ser humano, y que son fermentados de forma completa o parcial por las bacterias residentes del colon (McCleary et al., 2011; Turner & Lupton, 2011). Entre estos compuestos se encuentran la celulosa, hemicelulosa, lignina, gomas, celulosa modificada, mucílagos, oligosacáridos, pectinas, y en menor proporción algunos compuestos asociados como la cutina, suberina y las ceras (McCleary et al., 2011). Luego de varios años de discusión, en el año 2009 el *Codex Alimentarius* logró armonizar el concepto de incluir dentro de los componentes de la FD a los carbohidratos con grado de polimerización de 3-9, como por ejemplo la inulina, permitiendo a las autoridades internacionales decir sobre su inclusión o exclusión (Jones, 2014). Actualmente, la mayoría de las organizaciones internacionales y países permiten la inclusión de estos compuestos como parte de la FD.

En Argentina, el C.A.A. en su artículo 1385 define como FD a todo material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto gastrointestinal humano, e incluye en este concepto a los polisacáridos no almidón, celulosa y polisacáridos no celulósicos como pectinas, almidón resistente, inulina, oligofruktosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), transgalactooligosacáridos (TOS). Cuando la FD es de origen vegetal puede incluir fracciones de lignina y/u otros compuestos asociados con los polisacáridos de la pared celular vegetal, y si tales compuestos se han cuantificado mediante métodos de la AOAC para el análisis de la FD, estas sustancias quedan incluidas en la definición de fibra dado que están efectivamente asociadas con la fracción polisacárida u oligosacárida de la FD.

Por otro lado, el artículo 1386 del C.A.A. establece las cantidades mínimas que deben contener los alimentos modificados en fibra, es decir aquellos productos a los que se les han adicionado fibras contempladas en el presente Código. Por ejemplo, los alimentos sólidos deberán contener como mínimo de FD 3 g /100 g, y los líquidos 1 g /100 mL.

La declaración del contenido de FD en el rotulado nutricional es de carácter obligatorio, considerando un valor diario de referencia (VDR) de 25g/día (C.A.A.).

Se considera que la FD no aporta calorías a la dieta, sin embargo, los metabolitos liberados por las bacterias en el colon son utilizados por los seres humanos para satisfacer sus necesidades energéticas. La variabilidad entre los individuos en su capacidad de adquirir y utilizar esta fuente

de energía es la razón por la cual no se puede asignar un valor calórico a la FD (Turner & Lupton, 2011).

El efecto fisiológico de la FD está asociado en reducir el tiempo de tránsito intestinal e incremento del volumen y el número de las deposiciones, en reducir los niveles en sangre del colesterol total y/o colesterol LDL, y en reducir los niveles de glucosa o insulina postprandial (Jones, 2014; McCleary et al., 2011).

Las propiedades de la FD en los alimentos están relacionadas con la composición, propiedades físico-químicas y la estructura química de los polisacáridos de las plantas. En este sentido, varios autores han estudiado las propiedades funcionales, tales como capacidad de hinchamiento, atrapamiento y retención de agua, unión a ácidos biliares, intercambio catiónico, viscosidad, y gelificación, junto con la composición química para el entendimiento del efecto fisiológico de las fibras y su utilización como ingredientes en la formulación de alimentos (de Escalada Pla, Ponce, Stortz, Gerschenson, & Rojas, 2007; Escalada et al., 2012; Figuerola, Estévez, Chiffelle, & Asenjo, 2005). Incluso, autores como Guergoletto, Magnani, Martin, Andrade, & Garcia (2010) y Saarela, Virkajärvi, Nohynek, Vaari, & Mättö (2006) han estudiado la factibilidad de vehiculizar y estabilizar microorganismos probióticos utilizando diferentes fibras vegetales comerciales.

Los microorganismos probióticos deshidratados pueden encontrar diferentes aplicaciones en la industria alimentaria, se pueden mezclar con otros ingredientes secos, como por ejemplo cereales de desayuno, o se pueden utilizar como *starter* de procesos de fermentación.

Los polvos deshidratados tiene la ventaja de que se pueden comercializar en distancias largas dado que son livianos y fácil de transportar (Foerst, Kulozik, Schmitt, Bauer, & Santivarangkna, 2012; Santivarangkna, 2016). Actualmente, existe un mercado creciente de consumidores de alimentos con probióticos sin la necesidad de refrigeración, por ejemplo microorganismos que son vehiculizados como suplementos en leche en polvo, cereales, productos de pastelería y chocolate. La ventaja primordial de los productos distribuidos y almacenados a temperatura ambiente reside en que los costos por la cadena de frío se reducen drásticamente (Coghetto, Hickman Flores, Bruschi Brinques, & Záchia Ayub, 2016; Makinen et al., 2012).

Los microorganismos probióticos adicionados a matrices alimentarias deben tolerar los procesos de elaboración y permanecer viables durante la vida útil del producto para garantizar el efecto benéfico en el consumidor (Tripathi & Giri, 2014). Por lo tanto, la viabilidad celular de los microorganismos probióticos es importante para determinar la funcionalidad celular, y es considerado uno de los requisitos nutricionales más importante en el diseño de alimentos funcionales.

Los estudios *in vitro* son una herramienta útil para evaluar los cambios en la funcionalidad celular, y tienen la ventaja de ser rápidos, menos complejos y costosos que los estudios *in vivo*

(Minekus et al., 2014; Vinderola et al., 2011). En Argentina, el C.A.A. en la Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011 establece las pautas mínimas a seguir en un protocolo de evaluación de cepas probióticas como ingrediente para alimentos (ANMAT, 2011).

Durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal del ser humano, los probióticos deben tolerar primero la digestión gástrica en un medio ácido (pH 1,5-3,0) y la acción antimicrobiana de la enzima pepsina, y luego la digestión intestinal en un medio alcalino con la presencia de sales biliares y enzimas pancreáticas. Finalmente, el probiótico debe ser capaz de llegar viable y en un número suficiente para lograr colonizar el colon y, de esta forma, conferir el efecto benéfico en el huésped (Pitino et al., 2010). Por lo tanto, las barreras tecnológicas sumadas a las biológicas pueden afectar notablemente la viabilidad y funcionalidad del microorganismo probiótico.

Varios autores han reportado cambios en la funcionalidad celular sin observarse cambios en la viabilidad mediante recuentos de rutina en placas. Por ejemplo, Senaka Ranadheera, Evans, Adams, & Baines (2012) reportaron que en yogurt o helado de crema a base de leche de cabra, la viabilidad de los probióticos fue afectada por las condiciones *in vitro* gástricas e intestinales, y que la matriz alimentaria soporte puede tener un efecto protector en la supervivencia. De acuerdo a Champagne & Gardner (2008), la viabilidad de varias cepas de *Lactobacillus* no mostraron cambios significativos durante el almacenamiento en jugos a base de frutas, no obstante, el tiempo de almacenamiento y el estrés a las condiciones gástrica redujeron la supervivencia de los probióticos. La misma tendencia fue observada por Saarela, Virkajärvi, Alakomi, Sigvart-Mattila, & Mättö (2006) en bebidas lácteas y a base de frutas liofilizadas conteniendo Bifidobacterias. En el Capítulo II, se pudo demostrar que cuando la cepa del *L. casei* estuvo soportada en el tejido vegetal, ésta resultó ser más estable a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal. Lo que llevó a desarrollar un nuevo ingrediente con bacterias probióticas y enriquecido en fibra dietaria proveniente de la calabaza.

Deberá entonces, estudiarse las condiciones de almacenamiento más adecuadas a los efectos de obtener un porcentaje elevado de células viables a nivel intestinal. De la misma forma, deberá llevarse a cabo una caracterización físico-química y funcional completa del nuevo producto obtenido, permitiendo mejorar la comprensión de los efectos del *L. casei* sobre la matriz soporte y viceversa. Además, el conocimiento generado será de utilidad para posteriormente buscar posibles aplicaciones y mercados de interés.

**Objetivo general:**

Estudiar la viabilidad y funcionalidad del probiótico, las propiedades físico-químicas y funcionales, y la estabilidad del polvo a base de subproductos de calabaza durante el almacenamiento.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la resistencia del probiótico a las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal en el polvo de calabaza.
- Determinar la vida útil del polvo de calabaza conteniendo el *L. casei*.
- Caracterizar las propiedades funcionales y físicas del polvo de calabaza y el efecto de la presencia del *L. casei* sobre las mismas.
- Determinar la composición química del material de pared celular del polvo de calabaza conteniendo el probiótico.
- Estudiar la estabilidad, seguridad e inocuidad microbiológica del polvo de calabaza.
- Evaluar el efecto de las condiciones de rehidratación y diferentes temperaturas sobre la viabilidad del *L. casei*.

**2. Materiales y Métodos****2.1. Materiales****2.1.1. Preparación del inóculo**

Se determinó siguiendo la metodología detallada en la sección 2.1.2 del Capítulo II.

**2.1.2. Preparación del polvo a base de subproductos de calabaza conteniendo *L. casei***

La preparación del polvo a base de subproductos de calabaza conteniendo *L. casei* se realizó siguiendo la misma metodología detallada en la sección 2.1.3 del Capítulo II, pero con las condiciones óptimas obtenidas a partir del diseño factorial completo. Luego del tratamiento de secado al vacío a 25 °C y 4,5 Pa durante 24 h, el polvo de calabaza (PC) conteniendo *L. casei* se trituró y tamizó con una malla de acero inoxidable a fin de obtener un tamaño de partícula menor a 840 µ, y finalmente se almacenó en oscuridad a 8 °C y 22 °C durante 35 días.

En paralelo, se prepararon sistemas controles bajo las mismas condiciones de preparación y almacenamiento pero sin la adición del *L. casei*.

Durante el almacenamiento, se estudió la viabilidad del *L. casei* soportado en el PC y su funcionalidad después de la digestión *in vitro*, el color y la calidad microbiológica. También se caracterizaron las propiedades físico-químicas y funcionales, y el efecto de la presencia del

probiótico en las mismas. Por último, se estudiaron los efectos de las diferentes condiciones de rehidratación del producto sobre la estabilidad del probiótico, a fin de simular los distintos usos que pudieran darle los consumidores.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Determinación de la viabilidad del *L. casei***

Se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.1 del Capítulo II.

La viabilidad del *L. casei* se expresó mediante el cociente entre el valor logarítmico del recuento viable al tiempo  $t$  ( $N_t$ ) en el PC y el recuento inicial ( $N_0$ ) en el PC [ $\log N_t / \log N_0$ ].

En los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  desvío estándar (DE) de dos mediciones independientes.

### **2.2.2. Condiciones simuladas de la digestión gastrointestinal**

Las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal se evaluaron en el PC con *L. casei*. En primer lugar,  $\sim 1,0$  g de PC fue hidratado con 10 mL de agua destilada estéril seguido de 30 min de incubación a 37 °C con agitación (Champagne et al., 2011). Luego se continuó con la simulación *in vitro* de la digestión en 3 etapas: en la boca, gástrica e intestinal, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.6 del Capítulo II.

La viabilidad del *L. casei* se expresó como porcentaje de supervivencia a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal, mediante el cociente entre el valor logarítmico del recuento viable en el PC luego de cada etapa de digestión ( $N_t$ ) al tiempo  $t$  y el recuento inicial antes de la digestión ( $N_0$ ) en el PC [ $\log N_t / \log N_0 \times 100$ ].

En los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE de dos mediciones independientes.

### **2.2.3. Medición del color**

El color de las muestras se determinó en el espacio CIE  $L^*a^*b^*$  utilizando un colorímetro (Minolta Co. Ltd., Tokio, Japón), bajo el iluminante D65 y con un ángulo de observación de 2°. La luminosidad se utilizó para cuantificar la oscuridad/claridad ( $L^*$ : 0-100), la coordenada  $a^*$  para determinar el rojo/verde (+98,233; -86,183), y la coordenada  $b^*$  para el amarillo/azul (+94,47; -107,857). Las mediciones se realizaron por triplicado a partir de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

A partir de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  se calculó el valor de chroma (Chr) (Ecuación 1), el cuál describe la intensidad del color (Olivera et al., 2008):

$$\text{Chr} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (1)$$

Los cambios de color durante el almacenamiento se ajustaron a una cinética de primer orden (Ecuación 2 y 3):

$$\ln \left( \frac{L_t^*}{L_i^*} \right) = k t \quad (2)$$

$$\ln \left( \frac{C_t}{C_i} \right) = -k t \quad (3)$$

Dónde,  $L_t^*$  y  $C_t$  corresponden al valor del parámetro de  $L^*$  y Chr,  $b^*$  o  $a^*$ , respectivamente, en el tiempo  $t$  de almacenamiento;  $L_i$  y  $C_i$  es el valor inicial del parámetro de  $L^*$  y Chr,  $b^*$  o  $a^*$ , respectivamente;  $t$  es el tiempo expresado en días;  $k$  es la constante de velocidad de cambio para el parámetro de color.

#### **2.2.4. Propiedades físico-químicas y funcionales**

Todas las determinaciones se realizaron teniendo en cuenta las técnicas descritas por de Escalada Pla, Uribe, Fissore, Gerschenson, & Rojas (2010). Se realizaron al menos por duplicado, partiendo de muestras independientes, e informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

##### **- Propiedades físicas y funcionales:**

##### **▪ Densidad aparente y volumen específico:**

La densidad aparente ( $\rho$ ) y volumen específico ( $v$ ) se determinaron midiendo el volumen de una muestra de PC pesada ( $\approx 0,5000$  g) en una probeta graduada de 5 mL. La probeta fue tapada y luego nivelada golpeando suavemente la parte inferior sobre la mesada.

La  $\rho$  se calculó como:  $\rho \text{ (g/cm}^3\text{)} = m/V$

El  $v$  se calculó como la inversa de  $\rho^{-1}$ :  $v \text{ (cm}^3\text{/g)} = V/m$

Donde,  $m$  representa los gramos de muestra y  $V$  representa el volumen ocupado por dicha muestra.

##### **▪ Contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ ):**

La humedad fue determinada en  $\approx 0,5000$  g de muestra utilizando un analizador de humedad halógeno (Ohaus MB-45, NJ, USA) hasta peso constante. La  $a_w$  fue determinada mediante un medidor de la actividad de agua AquaLab Serie 3 (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).

▪ **Capacidad de absorción de aceite (oil-holding capacity, OHC)**

Se pesó exactamente 0,2000 g de PC que fueron mezclados con 1 mL de aceite de girasol, y se dejaron en contacto a temperatura constante de 25 °C durante 18 h. Luego, se centrifugó a 3.600 rpm durante 5 min, y finalmente se descartó el sobrenadante y se pesó el pellet. La OHC se expresó como los gramos de aceite retenido por gramo de muestra usando la siguiente expresión:  $OHC (g/g) = O/R$

Donde, O representa los gramos de aceite retenidos en el residuo y R representa el residuo seco.

- **Propiedades de hidratación:**

▪ **Capacidad de hinchamiento (swelling capacity, SC):**

Se pesó exactamente 0,0500 g de PC que fueron dispuestos en una probeta graduada de 5 mL. Se adicionaron 1,5 mL de agua destilada y se dejó hidratar a temperatura controlada de 25 °C durante 18 h. Luego, se midió el volumen total alcanzado por la fibra hidratada. La fracción de la SC se calculó usando la siguiente expresión:  $SC (ml/g) = V_h/m_s$

Donde,  $V_h$  es el volumen ocupado por la muestra hidratada y  $m_s$  es el peso de la muestra seca.

▪ **Capacidad de atrapamiento de agua (water-holding capacity, WHC):**

Se pesaron exactamente 0,0500 g de PC y se colocaron en un tubo de vidrio con marcación volumétrica y fondo cónico. Se adicionaron 1,25 mL de agua destilada y se dejó hidratar durante 18 h a temperatura controlada de 25 °C. Luego, se dejó decantar, se separó el sobrenadante, y la muestra fue transferida a un filtro de vidrio fritado (Borosilicate glass, IVA, Buenos Aires, Argentina), previamente pesado, dejándola escurrir a presión atmosférica. Se registró el peso del residuo hidratado, y luego se liofilizó durante 48 h para finalmente obtener el peso del residuo seco. La WHC se calculó usando la siguiente expresión:  $WHC(g/g) = (m_h - m_s)/(m_s)$   
Donde,  $m_h$  es el peso del residuo hidratado y  $m_s$  es el peso del residuo liofilizado.

▪ **Capacidad de retención de agua (water retention capacity, WRC):**

Exactamente 0,0500 g de PC fueron hidratados con 2 mL de agua destilada en un tubo Eppendorf de 2 mL, y se dejó hidratar a temperatura constante de 25 °C durante 18 h. Luego, la muestra se centrifugó a 4800 rpm durante 30 min, se separó el sobrenadante, se pesó el pellet húmedo (W) retenido en el tubo Eppendorf y luego se liofilizó durante 48 h. Finalmente, se pesó el residuo seco (R) y la WRC se calculó con la siguiente expresión:  $WRC (g/g) = W/R$

Donde, W representa los gramos de agua y R representa el residuo seco.

- **Determinación de la temperatura de transición vítrea**

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) en el PC se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un equipo Mettler-Toledo 822 (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Uster, Suiza) provisto de un sistema de análisis térmico STARe software versión 3.1 (Mettler-Toledo). El instrumento fue calibrado usando estándares (indio y zinc) de punto de fusión y calor de fusión definidos. Aproximadamente 6 a 10 mg de muestra fueron cuidadosamente colocados en una cubeta de aluminio de 0,04 mL de volumen interno (Mettler-Toledo). Las muestras fueron enfriadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  y luego calentadas hasta  $140\text{ }^\circ\text{C}$  a una velocidad de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ; se utilizó como referencia un recipiente vacío. La  $T_g$  se consideró en el punto medio de la temperatura de transición vítrea. El intervalo de confianza estimado para la temperatura fue de  $2\text{ }^\circ\text{C}$ .

- **Composición química:**

▪ **Residuo insoluble en alcohol (AIR):**

La obtención del AIR se realizó según la metodología explicada por de Escalada Pla, Ponce, Stortz, Gerschenson, & Rojas (2007). Brevemente,  $\approx 2,0\text{ g}$  del PC se mezclaron con 70 ml de solución de etanol (80%, v/v) y se llevó a ebullición durante 30 min sobre una platina calefactora con agitación constante. Luego, la suspensión se filtró y el solvente se descartó. Este mismo procedimiento se volvió a repetir pero con un tiempo de ebullición de 15 minutos. Luego, el residuo insoluble se mezcló con 50 mL de solución de etanol (80%, v/v) y se llevó a ebullición durante 15 minutos. La suspensión se filtró para separar el residuo insoluble y el solvente se descartó. Este mismo procedimiento se repitió 2 veces. Finalmente, el residuo insoluble se lavó con 20 mL de solución de etanol 80% (v/v) y luego con 20 mL de solución de etanol 96% (v/v). El material se dejó bajo campana durante 18 h para la eliminación del etanol, luego se lo congeló con nitrógeno líquido, y finalmente fue liofilizado durante 48 h. El AIR obtenido fue utilizado para cuantificar ácidos urónicos, carbohidratos totales (no celulósicos), celulosa y lignina.

La hidrólisis de la celulosa y polisacáridos no celulósicos en el AIR se realizó de acuerdo a la metodología descrita por de Escalada Pla et al., (2007) por dispersión de  $\approx 0,3000\text{ g}$  de muestra en  $2.080\text{ }\mu\text{L}$  de solución de ácido sulfúrico al 72% (v/v) durante 3 h. Luego, la dispersión se llevó a  $1\text{ M H}_2\text{SO}_4$  mediante la adición de agua deionizada hasta completar un volumen final de 25 mL y se llevó a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño de agua durante 2,5 h. Finalmente las muestras fueron enfriadas, centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se separó cuidadosamente y se neutralizó con NaOH. El residuo se lavó tres veces con agua deionizada, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y finalmente se liofilizó para determinar gravimétricamente el contenido de lignina. El contenido de proteínas se determinó en el sobrenadante por el método de Folin-

Ciocalteau utilizando un estándar de proteína (albúmina de suero bovino, ASB, Sigma-Aldrich, USA) como curva de calibración (Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall, 1951).

Un segundo procedimiento se llevó a cabo, dónde se dispersó  $\approx 0,3000$  g en  $2080 \mu\text{L}$  de solución de ácido sulfúrico al 72% (v/v) e inmediatamente se añadió agua deionizada hasta una concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M seguido de 2,5 h de calentamiento a  $100^\circ\text{C}$ . El residuo final se expresó como celulosa + lignina, mientras que el sobrenadante fue constituido por polisacáridos no celulósicos. El contenido de carbohidratos totales se determinó por el método de fenol-sulfúrico usando un estándar de glucosa como curva de calibración (Dubois, Gilles, Hamilton, Roberts, & Smith et al., 1956).

El tercer procedimiento se realizó de igual forma que la técnica descrita en la segunda hidrólisis, pero con 1 h de calentamiento a  $100^\circ\text{C}$  en baño de agua. Luego de la centrifugación, el sobrenadante se separó y neutralizó para determinar la concentración de ácidos urónicos por el método espectrofotométrico descrito por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991).

#### **2.2.5. Calidad microbiológica**

Durante el almacenamiento del PC conteniendo el *L. casei* se llevó a cabo el recuento de bacterias coliformes, hongos y levaduras para garantizar la seguridad, estabilidad e inocuidad microbiológica del producto. Las diluciones seriadas se realizaron en agua peptona al 0,1% (p/v) (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia) y se plaquearon alícuotas de 0,1 mL de muestra de las diluciones seleccionadas. El recuento de coliformes se realizó en profundidad con AVRB-L (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia), incubando las placas a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas en condiciones aeróbicas. Mientras que el recuento de hongos y levaduras se realizó en superficie utilizando agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, OI, Francia), incubando las placas a  $25^\circ\text{C}$  durante 5 días en condiciones aeróbicas.

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado a partir de muestras independientes, informando el valor promedio  $\pm$  DE. Los resultados fueron expresados como UFC/g de PC.

#### **2.2.6. Resistencia térmica del *L. casei* soportado en el PC**

La resistencia térmica del *L. casei* se evaluó en leche chocolatada suplementada con el PC con *L. casei* (LCH, 0,8% p/v) en diferentes condiciones de rehidratación. La bebida chocolatada se adquirió en el mercado local y por razones de confidencialidad la marca comercial no se revelará. Luego de adicionar el PC con *L. casei*, la bebida láctea fue homogeneizada (T25 Ultra-Turrax® IKA, Guangzhou, Cantón, China) durante 30 segundos a una velocidad de 9.500 rpm. Inmediatamente, la bebida se colocó en un baño termostático de agua y, una vez que la muestra

llegó a la temperatura deseada ( $t = 0$ ), se determinó la viabilidad del *L. casei* en intervalos de 15 min por un lapso de 90 min.

La reducción logarítmica del *L. casei* durante la rehidratación en caliente fue calculada como el cociente entre el valor logarítmico del recuento viable al tiempo  $t$  e inicial [ $\text{Log} (N_t/N_0)$ ], y representada en función del tiempo en minutos. El  $N_0$  correspondió al recuento inicial viable del *L. casei* en la LCH una vez que la bebida alcanzó la temperatura de estudio ( $t = 0$ ), eliminando el efecto de calentamiento. El  $N_t$  correspondió al recuento final viable del probiótico al tiempo  $t$  del tratamiento de rehidratación en caliente.

En paralelo, se llevó a cabo un sistema control (LCHc) bajo las mismas condiciones de preparación pero adicionando células libres de *L. casei*. Las células probióticas fueron previamente activadas en caldo MRS a 37 °C con agitación durante 20 h, luego lavadas con solución fisiológica, centrifugadas, y finalmente el pellet fue re-suspendido en agua destilada estéril.

Los ensayos se realizaron por duplicado, partiendo de muestras independientes e informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

Basándose en las curvas de supervivencia del *L. casei* [ $\text{Log} (N/N_0)$ ] vs tiempo (min), los datos experimentales de la resistencia al tratamiento de rehidratación en caliente del probiótico suplementado en la bebida láctea fueron ajustados al modelo de distribución de Weibull (Ecuación 4).

$$\text{Log} \frac{N_t}{N_0} = -b t^n \quad (4)$$

Donde,  $N_0$  corresponde a número de inicial de microorganismos (UFC/mL);  $N_t$  es el número de microorganismos al tiempo  $t$ ;  $b$  (factor escala) es el parámetro de velocidad, el cual está relacionado a la cinética de inactivación del microorganismo ( $\text{min}^{-n}$ );  $t$  es el tiempo de tratamiento térmico expresado en min;  $n$  es un parámetro adimensional que describe la forma de la curva de supervivencia del microorganismo al tratamiento térmico:  $n < 1$  y  $> 1$  corresponden a curvas de supervivencia cóncavas hacia arriba (con cola) y cóncavas hacia abajo (con hombros), respectivamente. Cuando  $n = 1$ , la curva de supervivencia es lineal y el modelo de distribución Weibull se reduce a una cinética de primer orden  $\text{Log} \frac{N}{N_0} = -k_d t$  (Van Boekel, 2002).

### 2.2.7. Análisis estadístico

Los parámetros de ajuste de las diferentes ecuaciones analizadas se determinaron mediante un análisis de regresión no lineal. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{aj}$ ) con valor  $\geq 0,80$ , y el estadístico de Durbin-Watson (DW) con valor  $\geq 1,0$  fueron utilizados para validar la bondad de ajuste de los modelos propuestos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un ANOVA con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) del 0,05 seguido de un Test de Fisher (LSD) para establecer diferencias significativas entre las muestras.

Para el análisis de los modelos de regresión y los análisis estadísticos de los resultados se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV (V 2.15.06, 2007, Warrenton, VA, USA).

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Viabilidad del *L. casei* contenido en el polvo de calabaza durante el almacenamiento

Durante el proceso de secado y posterior almacenamiento, existen diversos factores del alimento que pueden afectar la supervivencia de los microorganismos probióticos (Guergoletto et al., 2012). Dentro de los factores que pueden alterar la viabilidad del probiótico, podemos mencionar las condiciones de almacenamiento tales como la temperatura, el contenido de humedad y oxígeno, y la exposición a la luz (Burgain et al., 2014; Tripathi & Giri, 2014).

La información obtenida del recuento de células viables permite estimar la magnitud de pérdida celular durante el almacenamiento, información de interés para la industria alimentaria ya que se debe garantizar un mínimo recuento de células viables al final de la vida útil para cumplir con la regulación vigente, y por otro lado, reducir la sobredosificación inicial de probióticos en el producto y mantener el costo de la producción en niveles económicamente aceptables (Makinen et al., 2012).

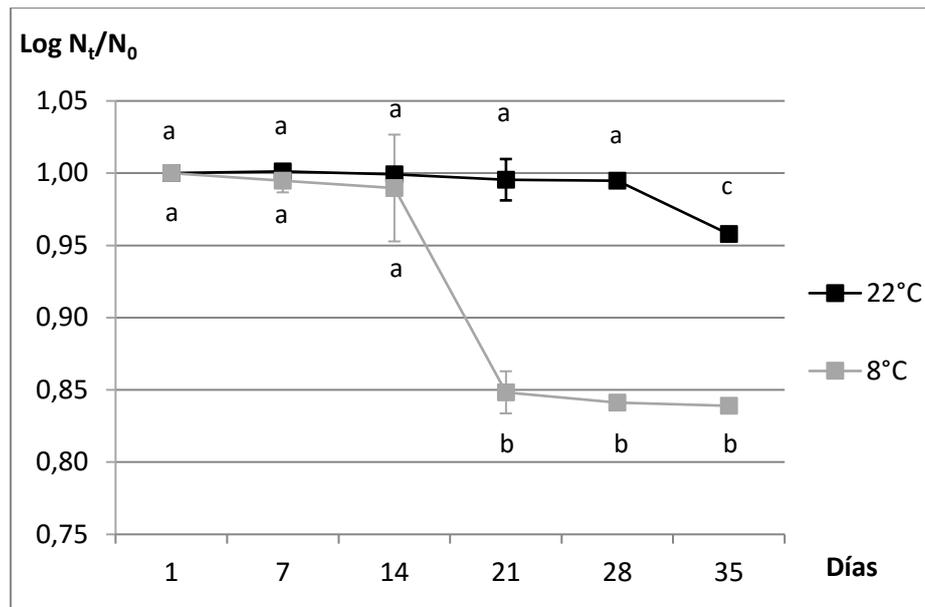
La viabilidad del *L. casei* contenido en el PC fue estudiada bajo condiciones controladas a dos temperaturas de almacenamiento, refrigeración (8 °C) y temperatura ambiente (22 °C), durante 35 días como se observa en la **Figura II.1** Al inicio del almacenamiento, el recuento viable del *L. casei* en el PC fue de  $7,9 \pm 0,2$  y  $7,67 \pm 0,06$  log (UFC/g PC) en el sistema a 8 y 22 °C, respectivamente. Durante el almacenamiento a 22 °C, la viabilidad del probiótico no mostró cambios significativos ( $p \geq 0,05$ ) hasta los 28 días, mostrando una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) a los 35 días. Mientras que, el sistema a 8 °C presentó una pérdida significativa ( $p \leq 0,05$ ) de la viabilidad del *L. casei* a partir de los 21 días de almacenamiento. La reducción final del *L. casei* en el PC almacenado a 8 y 22 °C fue 1,30 y 0,34 ciclos log, respectivamente. Estos valores se traducen en un recuento final de  $6,61 \pm 0,04$  y  $7,3 \pm 0,1$  log (UFC/g PC), respectivamente. Autores como Higl et al., (2007) han observado que tanto la temperatura de almacenamiento

como la  $a_w$  afectaron la viabilidad de *L. paracasei* ssp. *paracasei* liofilizado en una matriz de lactosa, siendo mayor la tasa de inactivación del polvo en estado amorfo ( $T > T_g$ ) respecto del estado cristalino ( $T < T_g$ ). Incluso, Ying et al., (2010) han reportado que existe una relación directa entre el incremento de la  $a_w$  del medio y la pérdida de viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG en polvos liofilizados o secados por spray.

En el presente trabajo, la  $a_w$  inicial del PC presentó un valor promedio de  $0,12 \pm 0,05$ . Durante el almacenamiento la  $a_w$  incrementó ( $p \leq 0,05$ ) respecto del valor inicial, presentando valores de  $0,36 \pm 0,01$  y  $0,30 \pm 0,06$  en el PC a 8 y 22 °C, respectivamente, a los 35 días. Si bien ambos sistemas no presentaron diferencias significativas en los valores de  $a_w$  al final del almacenamiento, el PC a 8 °C mostró una tendencia no significativa ( $p \geq 0,05$ ) a mayores valores, lo que podría explicar, en parte, la mayor pérdida de viabilidad de este sistema (**Figura III.1**). El aumento en la tasa de movilidad de agua podría causar desestabilización de los sistemas biológicos y, en consecuencia, la pérdida de viabilidad celular.

Bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo, se pudo observar que la temperatura de almacenamiento presentó un efecto significativo sobre la viabilidad del *L. casei* soportado en el polvo a base de subproductos de calabaza, siendo la temperatura a 22 °C la que menor pérdida de viabilidad presentó. En este contexto es de interés resaltar que la distribución y almacenamiento de alimentos con microorganismos probióticos que no requieren cadena de frío reducen notablemente los costos de transporte y facilitan su accesibilidad a la población en general, especialmente en países de bajos recursos (Coghetto et al., 2016).

Con respecto a las exigencias regulatorias, el recuento viable del *L. casei* en el PC almacenado a 22 °C durante 35 días de almacenamiento estuvo por encima de la concentración mínima establecida ( $> 10^6$  UFC/g), cumpliendo con las exigencias locales (C.A.A., ANMAT, 2011), y las internacionales (Codex Alimentarius, 2003; FDA; EFSA) para que un producto sea considerado probiótico al momento del consumo .



**Figura III.1.** Viabilidad del *L. casei* en el polvo de calabaza durante el almacenamiento.

Valores promedios  $\pm$ DE (n = 2). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre temperaturas y tiempo de almacenamiento.

### 3.2. Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la funcionalidad del *L. casei* soportado en el polvo de calabaza

El beneficio en la salud del huésped se obtiene solamente cuando una cepa probiótica alcanza el sitio de acción en un estado metabólicamente activo y en un número suficiente (Saad et al., 2013). Por lo tanto, la capacidad de los microorganismos probióticos de permanecer funcionalmente activos durante almacenamientos prolongados es uno de los requisitos nutricionales más importantes en la preservación de alimentos funcionales. Incluso, los procesos de conservación y las condiciones de almacenamiento pueden afectar negativamente la funcionalidad del probiótico sin observarse cambios en la viabilidad (Saarela, Virkajärvi, Alakomi, et al., 2006; Vinderola et al., 2011).

En este contexto, se llevaron a cabo ensayos de digestión *in vitro* para analizar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la resistencia del *L. casei* a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal.

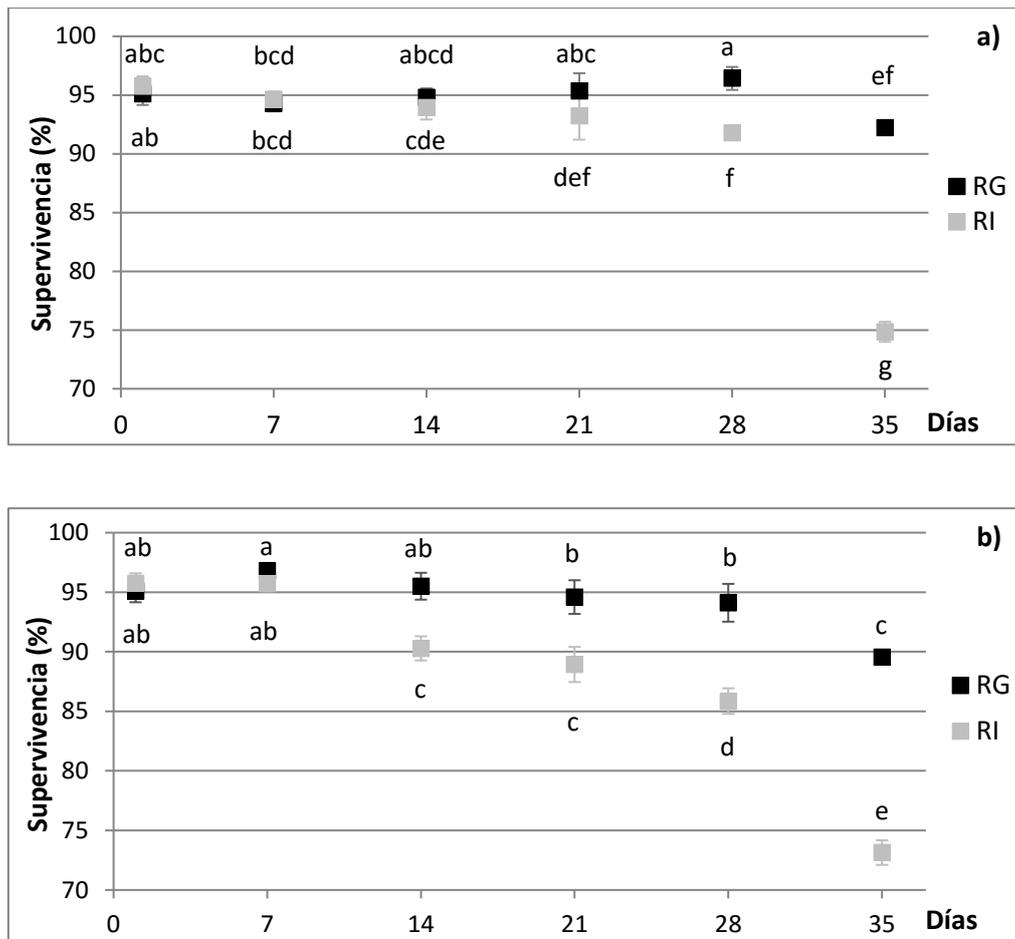
En la **Figura III.2 a** se muestra la supervivencia del *L. casei* a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal en el polvo de calabaza almacenado a 8 °C durante 35 días. La resistencia del probiótico a las condiciones gástricas presentó una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) a los 35 días de almacenamiento respecto del recuento inicial. Mientras que, la resistencia del probiótico a las sales biliares (fase intestinal) se mantuvo sin cambios ( $p \geq 0,05$ ) hasta los 14 días de almacenamiento, con una supervivencia del  $94 \pm 1\%$  [ $6,1 \pm 0,1$  log (UFC / g PC)].

La resistencia del *L. casei* a la digestión *in vitro* en el PC almacenado a 22 °C (**Figura III.2 b**) presentó el mismo comportamiento que el almacenamiento a 8 °C. La tolerancia del probiótico al medio gástrico se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a los 35 días de almacenamiento, mientras que la resistencia al medio intestinal se mantuvo estable ( $p \geq 0,05$ ) hasta los 7 días con una supervivencia del  $95,7 \pm 0,6\%$  [ $7,3 \pm 0,1 \log$  (UFC /g PC)].

Tanto el sistema almacenado a 8 °C como a 22 °C, no mostraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) en la supervivencia del *L. casei* al inicio y al final del almacenamiento (>73%), sugiriendo que la temperatura de almacenamiento no afectó la funcionalidad del probiótico. Sin embargo, la resistencia del *L. casei* a la digestión *in vitro* se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) con el tiempo de almacenamiento. A los 35 días de almacenamiento, la carga de microorganismos probióticos después de la digestión gastrointestinal se redujo a valores de  $5,01 \pm 0,08$  y  $5,36 \pm 0,08 \log$  (UFC /g PC) en el sistema almacenado a 8 °C y 22 °C, respectivamente.

Autores como Vinderola et al. (2011) quienes estudiaron la tolerancia del *Lactobacillus casei* a las condiciones gástricas en distintas leches fermentadas comerciales, también reportaron que el tiempo de almacenamiento afectó la funcionalidad del probiótico.

Con la finalidad de garantizar la funcionalidad esperada y cubrir la dosis recomendada de microorganismos probióticos ( $>10^6$  UFC/g), el fin de la vida útil del PC conteniendo *L. casei* se estableció a los 28 días de almacenamiento a 22 °C, con un recuento de células viables de  $7,63 \pm 0,05 \log$  (UFC /g PC) (ANMAT, 2011).



**Figura III.2.** Supervivencia a la digestión *in vitro* del *L. casei* contenido en el polvo de calabaza almacenado a 8 °C (a) y 22 °C (b).

RG: resistencia gástrica. RI: resistencia intestinal. Valores promedios  $\pm$ DE (n = 2). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas y tiempos de almacenamiento.

### 3.3. Evaluación del color del polvo de calabaza durante el almacenamiento

El color de los alimentos deshidratados es uno de los atributos de calidad más relevantes e influye directamente en la decisión del consumidor al elegir un nuevo producto (Bonazzi & Dumoulin, 2011). Los pigmentos carotenoides, presentes en la calabaza *Cucúrbita moschata*, son considerados los principales compuestos responsables de la coloración que va desde el rojo al amarillo (Rodríguez-Amaya, 1997). Existen varios factores que pueden provocar cambios en el color de la calabaza durante el procesamiento y almacenamiento, y también pueden afectar el contenido de carotenoides y su actividad biológica (Provesi & Amante, 2015).

En la **Tabla III.1** se muestran los parámetros de ajuste de los cambios de color a una cinética de primer orden. Los datos experimentales ajustaron adecuadamente, obteniendo valores de  $R^2$  y  $R^2_{aj} > 0,84$ . El estadístico de DW fue  $> 1,0$ , determinando la ausencia de correlaciones significativas en los residuos basados en el orden en que aparecieron los datos. El parámetro  $k$

indica la velocidad del cambio observado en el color de las muestras, y corresponde a las respectivas pendientes que se observan en las **Figuras III.3 a, b, c y d**.

**Tabla III.1.** Parámetros de ajuste al modelo de cinética de primer orden del cambio de color en el polvo de calabaza conteniendo *L. casei* y el sistema control almacenados a distintas temperaturas.

Parámetros de Color	k ± DE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	DW	
Chr	22 °C	0,020±0,001 <sup>a</sup>	0,94	0,94	1,55
	22 °C control	0,0186±0,0009 <sup>a</sup>	0,97	0,97	1,83
	8 °C	0,010±0,001 <sup>b</sup>	0,89	0,89	1,27
	8 °C control	0,010±0,001 <sup>b</sup>	0,91	0,91	1,15
b*	22 °C	0,0198±0,001 <sup>c</sup>	0,94	0,94	1,57
	22 °C control	0,0182± 0,0009 <sup>c</sup>	0,97	0,97	1,82
	8 °C	0,0098±0,0008 <sup>e</sup>	0,95	0,95	1,00
	8 °C control	0,0119±0,0007 <sup>d</sup>	0,96	0,96	1,01
a*	22 °C	0,039±0,004 <sup>g</sup>	0,84	0,84	1,17
	22 °C control	0,044±0,002 <sup>h</sup>	0,97	0,97	1,81
	8 °C	0,027±0,001 <sup>f</sup>	0,97	0,97	2,62
	8 °C control	0,029±0,001 <sup>f</sup>	0,99	0,99	1,33
L*	22 °C	0,0023±0,0001 <sup>i</sup>	0,94	0,94	1,27
	22 °C control	0,00217±0,00008 <sup>i</sup>	0,98	0,98	1,36
	8 °C	0,0034±0,0001 <sup>j</sup>	0,98	0,98	1,35
	8 °C control	0,0039±0,0004 <sup>k</sup>	0,84	0,84	1,95

Cinética de primer orden:  $\ln(L_t^*/L_i^*) = kt$  o  $\ln(C_t/C_i) = -kt$ . L\*: luminosidad. C: Chr, b\* o a\*. k: velocidad de cambio del parámetro de color expresado como día<sup>-1</sup>. R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación. R<sup>2</sup><sub>aj</sub>: coeficiente de determinación ajustado. DW: estadístico de Durbin-Watson. Valores promedios ±DE (n = 3). Letras diferentes denotan diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre sistemas.

La intensidad de la cromaticidad (Chr) en el PC se redujo conforme el avance del tiempo de almacenamiento (**Figura III.3 b**). Esta reducción fue consecuente con la disminución de los componentes de color a\* y b\*, indicando la pérdida de rojo y amarillo en el PC, respectivamente (**Figura III.3 c y d**). La componente a\* duplicó (p ≤ 0,05) la velocidad en la pérdida de color respecto de b\*. Sin embargo, la velocidad de reducción de la intensidad de color, Chr, durante el almacenamiento se encuentra en el mismo orden de b\*. Por lo que se infiere que b\* sería el parámetro que controla la disminución que se registra en Chr (**Tabla III.1**). Los cambios en el

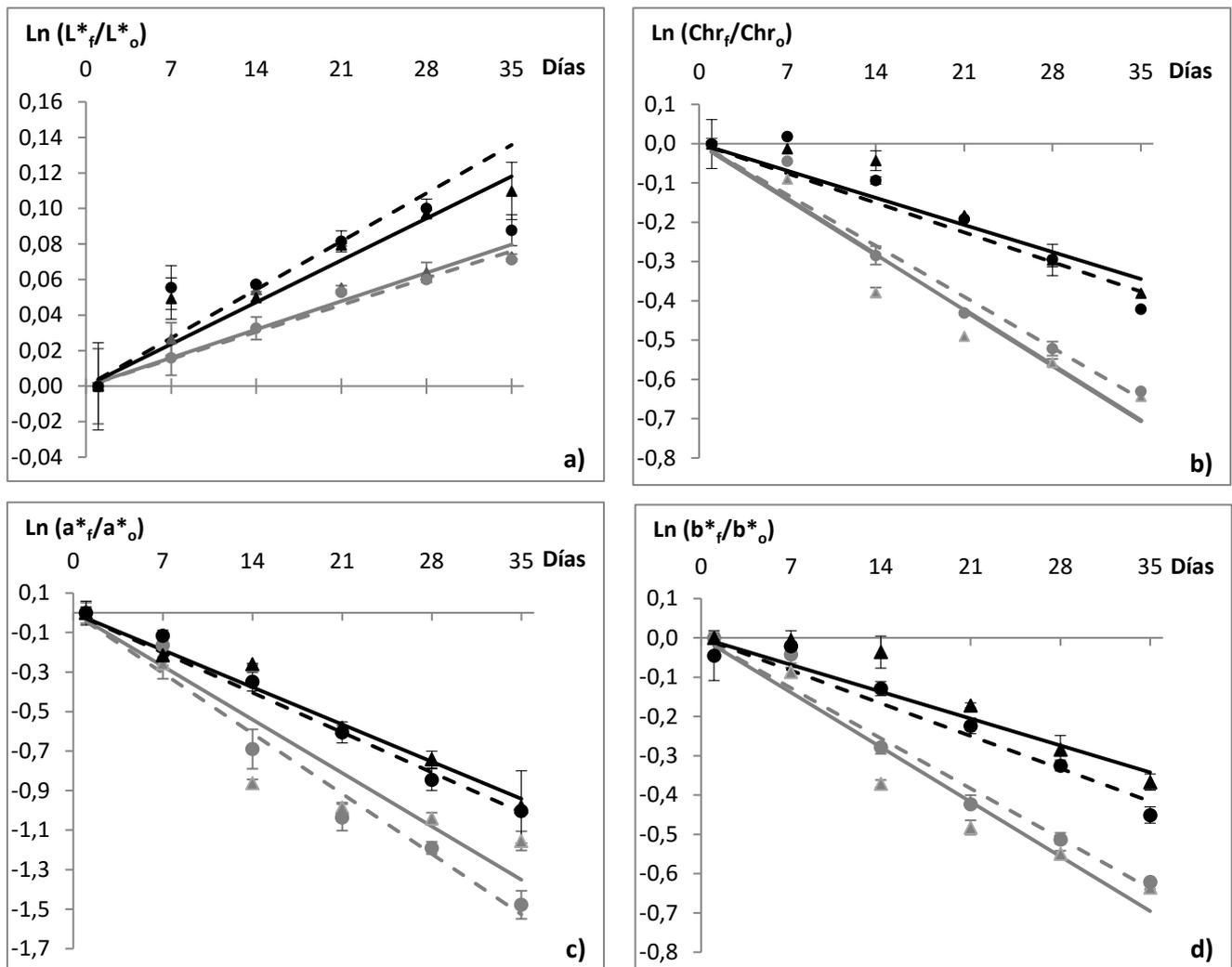
color del PC podrían explicarse debido a la degradación de los pigmentos carotenoides responsables del color del vegetal (Provesi & Amante, 2015). De acuerdo a Nawirska, Figiel, Kucharska, Sokół-Łetowska, & Biesiada (2009), existe una correlación directa entre el contenido de carotenoides en la calabaza y el parámetro de color  $a^*$ . Con respecto a la temperatura de almacenamiento, se observó una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la velocidad de cambio de color en los parámetros de Chr,  $a^*$  y  $b^*$  del producto almacenado a 8 °C respecto al de 22 °C (**Figura III.3 a, b y c**). Este efecto podría deberse, en parte, a que las reacciones de deterioro ocurren más rápido a mayores temperaturas de almacenamiento. Incluso, autores como Roongruangsri & Bronlund (2016) han reportado mayores pérdidas del contenido de carotenos en polvo de calabaza conforme se incrementó la temperatura de secado al vacío.

La luminosidad ( $L^*$ ) es un parámetro que describe la claridad (100) u oscuridad (0). Durante el almacenamiento, en general las reacciones bioquímicas responsables de cambios en la  $L^*$  de los alimentos deshidratados, de deben a las pérdidas de vitaminas y a las reacciones no enzimáticas o de Maillard. En este último caso, se producen compuestos pardos como consecuencia de la interacción entre aminoácidos y grupos carbonilos de los azúcares que podrían oscurecer la matriz vegetal deshidratada (Bonazzi & Dumoulin, 2011). En la **Figura III.3 a** puede observarse el aclaramiento que sufre el PC durante el almacenamiento; lo que permitiría inferir que si ocurriesen reacciones indeseables de pardeamiento no enzimático, estas se encuentran contrarrestadas por otras reacciones, posiblemente relacionadas a pérdidas de vitaminas. Por ejemplo, Lago-Vanzela et al. (2013), reportaron un incremento de la isomerización *trans/cis* de los dobles enlaces de los  $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos durante el almacenamiento de trozos de calabaza deshidratados, lo cual estaría asociado a la pérdida de pro Vitamina A y la disminución de la bioaccesibilidad y bioconversión de estos compuestos. Por otro lado, la constante de velocidad de cambio en la  $L^*$  fue un orden de magnitud menor comparada con las correspondientes a Chr,  $a^*$  y  $b^*$ ; y a su vez, fue significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menor en el PC almacenado a temperatura ambiente (**Tabla III.1**). Nuevamente la hipótesis de la superposición de reacciones de pardeamiento no enzimático con reacciones de pérdidas de vitaminas que tengan efecto contrario sobre la  $L^*$  podrían llegar a explicar lo observado. Cabe señalar, que si bien existe amplia bibliografía respecto a la relación de la  $L^*$  con reacciones de pardeamiento y el Chr con reacciones vinculadas a la concentración de carotenoides, no se han encontrado datos que reporten efecto simultáneo de estas diferentes reacciones sobre  $L^*$ .

Por otro lado, comparando el color del PC conteniendo *L. casei* y su respectivo sistema control, es decir el PC sin la adición de *L. casei*, se pudo observar que la presencia del probiótico en la matriz de calabaza no afectó significativamente ( $p \geq 0,05$ ) la intensidad del color (Chr). Si bien se observaron mejoras significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la retención de la  $L^*$  y del componente  $b^*$  del

sistema almacenado a 8 °C, y en a\* del sistema almacenado a 22 °C cuando el *L. casei* estuvo presente en el PC; éstas mejoras fueron muy leves y en el caso de a\* y b\* no llegaron a modificar el valor de Chr.

En líneas generales los resultados reportados en el presente trabajo están de acuerdo con aquellos reportados por Costa, Fonteles, De Jesus, & Rodrigues (2013) y Randazzo & Pitino (2013); quienes han informado que la presencia de microorganismos probióticos en matrices vegetales, tales como jugo de ananá o mermelada de durazno, no tienden a modificar el color del producto durante el almacenamiento. A modo de referencia se muestra en la **Figura III.4** una imagen del PC con *L. casei*.



**Figura III.3.** Parámetros de color de (a) luminosidad ( $L^*$ ), (b) chroma, (c)  $a^*$ , y (d)  $b^*$  en el polvo de calabaza en función del tiempo de almacenamiento.

Líneas negras y grises corresponden al almacenamiento a 8 y 22 °C, respectivamente. Líneas continuas y de punto representan el ajuste al modelo cinético de primer orden [ $\ln(L^*_t/L^*_i) = kt$ ] o [ $\ln(C_t/C_i) = -kt$ ] de los datos experimentales del PC conteniendo *L. casei* y sin la adición del probiótico (control), respectivamente; siendo  $L^*$ : luminosidad y C: Chr,  $b^*$  o  $a^*$ . Los triángulos representan los datos experimentales del PC con *L. casei* y los círculos el sistema control. Valores promedios  $\pm$  DE (n = 3).



**Figura III.4.** Imagen del polvo a base subproductos de calabaza como matriz soporte del *L. casei*.

### 3.4. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del polvo de calabaza obtenido y efecto de la presencia del *L. casei* sobre las mismas

El PC presentó valores promedio de  $a_w$  de  $0,21 \pm 0,01$  y contenido de humedad de  $7,0 \pm 0,2\%$ , lo cual asegura la estabilidad microbiológica durante el almacenamiento a temperatura ambiente (Bonazzi & Dumoulin, 2011).

Los resultados correspondientes a las características físicas y funcionales del PC con *L. casei*, almacenado a distintas temperaturas se detallan en la **Tabla III.2**. Con propósitos comparativos, también se incluyen en la **Tabla III.2** valores obtenidos en fracciones ricas en FD de distintas fuentes vegetales reportados por otros autores.

Como se puede observar, la densidad aparente ( $\rho$ ), que representa la cantidad de masa contenida en un determinado volumen, no presentó diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los sistemas almacenados a 22 y 8 °C. Tampoco se observó un efecto significativo ( $p \geq 0,05$ ) debido a la presencia del *L. casei* en el PC. Consecuentemente, el volumen específico ( $u$ ) no presentó diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los sistemas a distintas temperaturas de almacenamiento y sus respectivos sistemas controles. De acuerdo a los resultados reportados en otras fracciones ricas en fibra obtenidas a partir de calabaza, membrillo y durazno la  $\rho$  fue mayor mientras que para el  $u$  se obtuvieron valores menores a los reportados en el PC con *L. casei* (de Escalada Pla et al., 2007; 2010; 2012). Esto podría deberse, en parte, al hecho de que en el presente trabajo se utilizó un tratamiento de secado bajo vacío, mientras que en los resultados reportados por de Escalada Pla (2007; 2010; 2012) se aplicó un tratamiento de deshidratación convencional por convección (**Tabla III.2**).

La capacidad de absorción de aceite (OHC) depende de las propiedades de superficie y de la naturaleza hidrofóbica de los componentes de la matriz vegetal (Figuerola et al., 2005). El PC con o sin la presencia del probiótico, presentó valores leves pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menores de OHC a 22 °C respecto del almacenamiento a 8 °C. Mientras que, la presencia de *L. casei* redujo leve pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la OHC respecto del sistema control almacenado a temperatura ambiente. Estos resultados fueron similares a los reportados por Roongruangsri & Bronlund (2016) en polvos de calabaza secados por convección, presentando valores de 3,9-4,4 g/g. Mientras que otras fracciones ricas en fibra, como por ejemplo membrillo y durazno, la OHC reportada fue menor (de Escalada Pla et al. 2010; 2012) (**Tabla III.2**). Cabe destacar, que esta propiedad es de interés en la formulación de alimentos donde formen parte, y está asociada a la adsorción y retención de grasas en el tracto gastrointestinal (Mora et al., 2013).

Las propiedades de hidratación de fracciones vegetales ricas en fibra describen la habilidad de retener agua en su estructura, y están asociadas al incremento del peso de las heces durante el

tránsito intestinal y a la reducción en la velocidad de absorción de nutrientes (Figuerola et al., 2005). El agua fuertemente unida a la matriz no tiene efecto en el peso de las heces, mientras que, el agua débilmente asociada aumenta fácilmente el peso de las heces. La máxima cantidad de agua que una matriz rica en fibra puede contener está asociada a su composición química, características físicas y de micro-estructura (Raghavendra, Rastogi, Raghavarao, & Tharanathan, 2004).

La capacidad de hinchamiento (SC) se define como la relación del volumen ocupado por unidad de masa después de la inmersión en exceso de agua y su equilibrio al peso real (Raghavendra et al., 2004). Por lo tanto, este parámetro indica cuánta agua es retenida débilmente en las estructuras capilares de la fibra a través de fuerzas de tensión superficial y uniones con componentes moleculares mediante enlaces de hidrógeno o dipolo (Figuerola et al., 2005). La SC presentó valores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más altos en el PC almacenado a 8 °C respecto del de 22 °C. La presencia de *L. casei* en el PC no mostró un efecto significativo ( $p \geq 0,05$ ) cuando el sistema fue almacenado a 8 °C. Mientras que, la presencia del probiótico redujo ( $p \leq 0,05$ ) la SC en el PC con *L. casei* almacenado a 22 °C.

La capacidad de atrapamiento de agua (WHC) se define como la cantidad de agua retenida por la matriz vegetal rica en fibra sin la aplicación de una fuerza externa, excepto de la gravedad y la presión atmosférica. Este parámetro también estudia la proporción de agua asociada débilmente a la matriz vegetal (Raghavendra et al., 2004). La WHC de los sistemas estudiados no se vio afectada por la temperatura de almacenamiento ni por la presencia del *L. casei* en el PC, presentando un valor promedio de  $24 \pm 2$  g/g.

En cuanto a la capacidad de retención de agua (WRC), esta propiedad describe la cantidad de agua que permanece en la fibra hidratada después de la aplicación de una fuerza externa (presión o centrifugación), por lo tanto, incluye la proporción de agua fuertemente asociada a la matriz (Raghavendra et al., 2004). En el almacenamiento a 22 °C se registraron valores de WRC significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) respecto de los sistemas almacenados a 8 °C. La presencia del probiótico no afectó significativamente ( $p \geq 0,05$ ) ni la WHC ni la WRC en el PC almacenado a 22 °C, a diferencia de lo observado en las propiedades OHC y SC, donde se observó una leve pero significativa reducción ( $p \leq 0,05$ ) de estas propiedades.

Los valores de las SC, WHC y WRC en el PC se encontraron en el orden de aquellos reportados para fracciones ricas en fibra de calabaza y durazno por de Escalada Pla et al. (2007; 2012) (**Tabla III.2**). La SC y WHC son propiedades de interés para la industria alimentaria porque pueden ser utilizados como ingredientes o aditivos alimentarios como agentes espesantes en formulaciones. Además, están asociados a la salud ya que producen un efecto de saciedad e incremento del volumen fecal (Escalada et al., 2012; Mora et al., 2013). Es de resaltar, que

cuando el PC fue testeado como suplemento dietario se observó un incremento significativo en la viscosidad tanto de la leche de soja con jugo de manzana como en la leche chocolatada (Sección 3.4, Capítulo II). Resumiendo en esta sección, se puede concluir que no se observaron diferencias importantes en las propiedades funcionales debidas a la presencia del *L. casei* o a la temperatura de almacenamiento. En general, para algunas propiedades se observó una significativa ( $p \leq 0,05$ ) pero leve diferencia a favor de las muestras almacenadas a 8 °C respecto de las conservadas a 22 °C. Mientras que el efecto de la presencia de probióticos se observó a 22 °C solo en la OHC y SC.

**Tabla III.2.** Propiedades físicas, funcionales y de hidratación del polvo de calabaza almacenado a 22 y 8 °C.

Sistemas	Propiedades físicas-funcionales			Propiedades de hidratación		
	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$u$ (cm <sup>3</sup> /g)	OHC (g/g)	SC (mL/g)	WHC (g/g)	WRC (g/g)
PC con LC 22 °C	0,181 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,55 ± 0,06 <sup>c</sup>	13,9 ± 0,1 <sup>f</sup>	23 ± 1 <sup>i</sup>	17,1 ± 0,7 <sup>j</sup>
PC control 22 °C	0,190 ± 0,008 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,2 <sup>d</sup>	15,90 ± 0,04 <sup>g</sup>	23 ± 1 <sup>i</sup>	17,8 ± 0,5 <sup>j</sup>
PC con LC 8 °C	0,183 ± 0,004 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	5,45 ± 0,06 <sup>e</sup>	19,90 ± 0,03 <sup>h</sup>	23 ± 1 <sup>i</sup>	20 ± 1 <sup>k</sup>
PC control 8 °C	0,168 ± 0,009 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,1 <sup>e</sup>	19,82 ± 0,08 <sup>h</sup>	25 ± 1 <sup>i</sup>	20,6 ± 0,8 <sup>k</sup>
Calabaza <sup>1</sup>	NR	1,10 ± 0,02	NR	25,0 ± 0,2	24 ± 6	23 ± 6
Membrillo <sup>2</sup>	0,558 ± 0,007	1,79 ± 0,02	1,26 ± 0,02	6,40 ± 0,09	13 ± 1	5,6 ± 0,3
Durazno <sup>3</sup>	0,486 ± 0,009	2,06 ± 0,04	1,81 ± 0,02	29 ± 2	24 ± 2	14,3 ± 0,4

PC con LC: polvo de calabaza conteniendo *L. casei*. PC control: polvo de calabaza sin la presencia del probiótico. Resultados expresados como valor promedio ± DE (n = 2). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas.

NR: no reportado. <sup>1</sup>Concentrado de fibra obtenido a partir de pulpa de calabaza prensada y posterior secado con convección a 50 °C durante 4 h (de Escalada Pla et al., 2007). <sup>2</sup>Concentrado de fibra de membrillo obtenido a partir de subproductos secados con convección a 80 °C durante 4 h (de Escalada Pla et al., 2010). <sup>3</sup>Concentrado de fibra de durazno obtenido a partir de pulpa prensada, con un tratamiento térmico con etanol y posterior secado con convección a 30 °C durante 7 h (de Escalada Pla et al., 2012).

El almacenamiento a temperatura ambiente reduce notablemente los costos de almacenamiento y el transporte, especialmente para los elaboradores industriales y, además, aporta conveniencia a los consumidores (Keivani et al., 2014; Santvarangkna, 2015).

La temperatura de almacenamiento más adecuada en términos de pérdida de viabilidad celular del *L. casei* fue la de 22 °C; de manera que, la caracterización química del material de pared celular del PC con *L. casei* se realizó en estas condiciones.

Los resultados correspondientes a la caracterización química del residuo insoluble en alcohol (AIR) del PC almacenado a temperatura ambiente y su respectivo sistema control se detalla en la **Tabla III.3**. La fracción del AIR obtenido en el PC con *L. casei* presentó un contenido significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menor [ $46,6 \pm 3$  g/100 g de PC (base seca)] comparado con el PC sin la adición del probiótico [ $52 \pm 1$  g/100 g de PC (base seca)], en ambos casos las muestras estuvieron constituidas principalmente por polímeros de pared celular.

La fracción rica en material de pared celular del PC con *L. casei* estuvo constituida por un contenido de proteínas de  $12,2 \pm 0,1$  g/100 g de PC (base seca), este valor fue significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mayor que el PC sin el probiótico que presentó un contenido de  $10,8 \pm 0,4$  g/100 g de PC (base seca). El mayor contenido de proteínas en el PC con *L. casei* podría deberse al incremento de la biomasa del probiótico durante el proceso de fermentación.

El contenido de lignina y celulosa no mostró diferencias entre el PC con o sin la adición del probiótico, presentando valores promedios de  $5,6 \pm 0,3$  y  $5,6 \pm 0,5$  g/100 g de PC (base seca), respectivamente. La presencia de lignina en la pared celular vegetal se caracteriza por reemplazar el agua de la red celular transformando el medio hidrofílico en hidrofóbico. El entorno hidrofóbico produce aumento y mayor resistencia de las uniones de celulosa-hemicelulosa por la pérdida del efecto plastificante del agua en la red de la pared celular (hidrofílica), creando una pared celular más rígida e impermeable (de Escalada Pla et al., 2007). Los carbohidratos no celulósicos del material de pared celular, que representan la fracción soluble de la FD (hemicelulosas,  $\beta$ -glucanos y pectinas), no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el PC con y sin el *L. casei*, presentando un contenido promedio de  $59 \pm 4$  g/100 g de PC (base seca). Sin embargo, se observó una tendencia no significativa a un contenido mayor en polisacáridos no celulósicos en el PC con *L. casei*. Esta tendencia a un elevado contenido de estos carbohidratos revela la naturaleza química hidrofílica de la matriz vegetal, que a su vez, es consecuente con los resultados obtenidos en las propiedades de hidratación del PC.

Con respecto al contenido de ácidos urónicos, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el PC con *L. casei* y sin la adición del probiótico, presentando un valor promedio  $16 \pm 0,5$  g/100 g de PC (base seca). El contenido de ácidos urónicos en el material de pared celular es considerado un buen indicador de la calidad de la pectina. Las pectinas son de interés para la industria alimentaria por sus propiedades gelificantes, espesantes y estabilizantes (Müller-Maatsch et al., 2016). Además, existe evidencia de que retrasan el vaciamiento gástrico y la velocidad de absorción de los nutrientes en el intestino delgado, poseen moderado índice glucémico y reducido aporte calórico. Durante el tránsito intestinal, las pectinas pueden ser fermentadas por las bacterias del colon, dando origen a ácidos grasos de cadena corta. Estas

propiedades son de especial interés en patologías como diabetes mellitus, dislipemias y obesidad (de Escalada Pla et al., 2007; Wicker & Kim, 2016).

El contenido de proteínas, polisacáridos no celulósicos y ácidos urónicos presentes en el material de pared celular se encuentran en el orden de aquellos reportados por de Escalada Pla y col., (2007) en concentrado de fibra de calabaza.

En conclusión se podría inferir que si bien la presencia de probióticos reduce levemente el contenido de AIR, y aumenta el contenido proteico en el AIR; no modifica sustancialmente la composición química de la FD, manteniéndose de este modo la calidad nutricional de la misma.

**Tabla III.3.** Composición química de la fracción rica en material de pared celular (AIR) en el polvo de calabaza con y sin la adición de *L. casei*.

g/100 g de AIR	PC control	PC con <i>L. casei</i>
Proteínas	10,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
Lignina	5,5 ± 0,7 <sup>c</sup>	5,5 ± 0,5 <sup>c</sup>
Celulosa	5,14 ± 0,08 <sup>d</sup>	5,3 ± 0,5 <sup>d</sup>
Polisacáridos no celulósicos	58 ± 3 <sup>e</sup>	61 ± 5 <sup>e</sup>
Ácidos urónicos	17 ± 1 <sup>f</sup>	15,8 ± 0,7 <sup>f</sup>

PC con *L. casei*: polvo de calabaza conteniendo *L. casei*. PC control: polvo de calabaza sin la presencia del probiótico. AIR: residuo insoluble en alcohol. Valor promedio ± DE (n = 2). Letras similares denotan ausencia de diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre sistemas.

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es la temperatura de transición de un sistema en estado vítreo al gomoso, o a la inversa, debido a cambios de temperatura y/o humedad. El almacenamiento de un polvo deshidratado por debajo de su  $T_g$  reduce notablemente las reacciones de deterioro, y se ha demostrado que bajo estas condiciones de estabilidad se reduce la pérdida de viabilidad de los microorganismos probióticos (Santivarangkna, 2016). Durante el almacenamiento, los polvos deshidratados pueden adsorber agua del medio, reduciendo la  $T_g$ , lo cual provoca que la matriz pase del estado vítreo al gomoso. Esta transición de fase, está asociada a varias transformaciones estructurales como consecuencia de la disminución de la viscosidad y el aumento de la movilidad molecular (Telis & Martínez-Navarrete, 2010). Por lo tanto, el conocimiento de la  $T_g$  es una herramienta útil para determinar las condiciones más adecuadas de almacenamiento a los efectos de evitar los cambios físico-químicos debido a los fenómenos de transición vítrea que podrían estar asociados, en parte, a la pérdida de viabilidad del probiótico durante el almacenamiento.

La Tg se determinó en el PC con *L. casei*, el PC sin la presencia del probiótico, y en las células aisladas del *L. casei* deshidratadas al vacío. Los parámetros característicos de la Tg determinados por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y valores de  $a_w$  se muestran en la **Tabla III.4**.

**Tabla III.4.** Parámetros de temperatura de transición vítrea y  $a_w$  en el polvo de calabaza conteniendo *L. casei*.

Sistemas	$a_w$	Temperatura de transición vítrea			
		Inicio (°C)	Punto medio (°C)	Punto final (°C)	Delta cp (Jg <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
PC con LC	0,12 ± 0,03	-17,60	-6,84	5,77	0,674
PC control	0,10 ± 0,02	-31,63	-23,21	-12,96	0,282
<i>L. casei</i>	ND	-13,18	2,64	10,65	0,540

ND: valor no determinado.

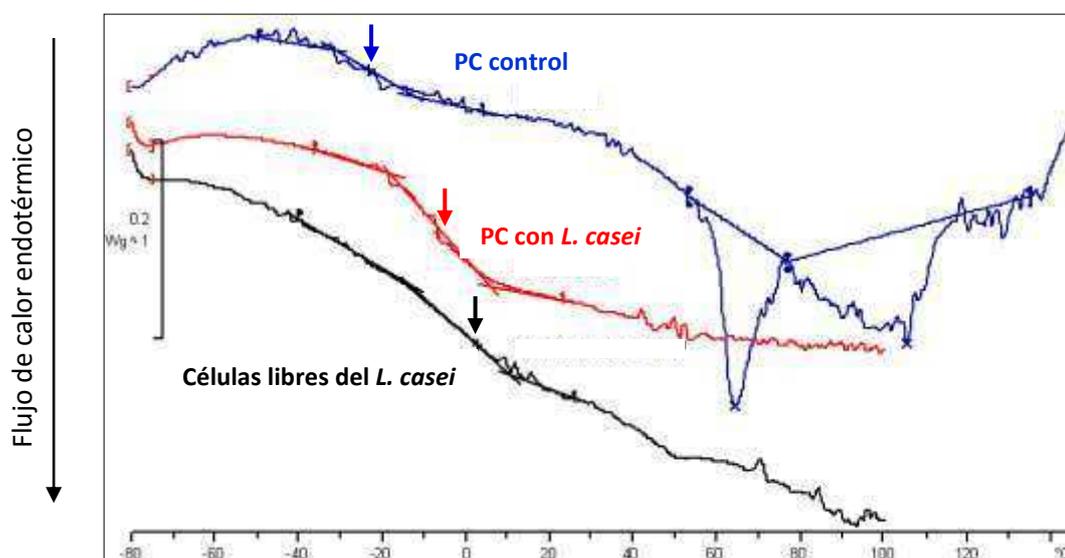
La  $a_w$  y el contenido de humedad del PC con *L. casei* y el sistema control presentaron valores menores a 0,20 y 7,0%. Estas condiciones mejoran la estabilidad del PC durante el almacenamiento dado que el reducido contenido de agua libre disminuye la movilidad molecular y el crecimiento microbiano (Santivarangkna, 2016).

En la **Tabla III.4**, también se puede observar que el punto medio de la Tg incrementó de -23,21 a -6,84 °C cuando el *L. casei* estuvo presente en el PC respecto del sistema control. Este incremento en los valores de Tg representa una ventaja desde el punto de estabilidad del polvo deshidratado durante el almacenamiento. En cuanto al delta de la capacidad calorífica ( $\Delta cp$ ), se pudo observar que los valores observados en el PC con *L. casei* se asemejaron a los obtenidos en las células libres del probiótico, mientras que el PC sin la presencia del microorganismo presentó valores menores.

En la **Figura III.5** se muestra el termograma de las curvas de Tg del PC con *L. casei*, dónde se puede observar que la curva del PC con *L. casei* fue muy similar al obtenido a partir de las células libres del probiótico. En el sistema control, se observó la presencia de un pico endotérmico a 64,21 °C, que podría deberse a la gelatinización del almidón (Donovan, Lorenz, & Kulp, 1983). La ausencia del pico endotérmico del polímero en la matriz vegetal con el *L. casei* inmovilizado nos permite inferir que posiblemente fue utilizado como fuente de carbono y energía por los microorganismos probióticos durante el período de incubación (Gänzle & Follador, 2012; Petrova, Petrov, & Stoyancheva, 2013). Incluso, autores como Petrova & Petrov (2012) han

logrado identificar la presencia de enzimas amilolíticas extracelulares en *Lactobacillus Paracasei* B41, perteneciente al grupo *Lactobacillus casei*.

Hasta el momento, no existen reportes de Tg en matrices vegetales ricas en fibras y con probióticos. Autores como Foerst et al. (2012), han reportado que la Tg de un polvo de *L. paracasei ssp. paracasei* deshidratado al vacío mejoró con sorbitol como agente protector, y se observó buena estabilidad en  $a_w$  de 0,07 y con una temperatura de almacenamiento de 37 °C. En el presente trabajo, la presencia del probiótico en la matriz de calabaza incrementó la Tg, aportando mayor estabilidad al polvo deshidratado. Sin embargo, se requieren más estudios sobre su estabilidad durante el almacenamiento y en el envase que se comercializará.



**Figura III.5.** Termograma de las curvas de flujo de calor en función de la temperatura.

Las flechas indican el valor medio del punto de inflexión de la Tg.

### 3.5. Calidad microbiológica del polvo de calabaza conteniendo *L. casei*

En todas las etapas de preparación del PC conteniendo *L. casei* se aplicaron buenas prácticas de manufactura, contribuyendo de esta forma a la estabilidad e inocuidad del producto desde un punto de vista microbiológico.

El recuento de bacterias coliformes en alimentos es un indicador de la eficiencia del tratamiento térmico y de la higiene ambiental. Mientras que, el recuento de hongos y levaduras es un indicador de la estabilidad del producto desde un punto de vista del deterioro microbiológico al que pudiera verse sometido durante el almacenamiento.

Después de 35 días de almacenamiento a temperatura ambiente, el recuento de bacterias coliformes, y de hongos y levaduras en el PC con *L. casei* fue menor a 100 UFC/g, cumpliendo de esta forma con las exigencias para *productos listos para consumo* en el artículo 1340 del C.A.A..

Por lo tanto, se puede inferir que el PC a base de subproductos de calabaza conteniendo probióticos resulta apto para ser consumido sin preparación previa, por ejemplo como suplemento dietario, garantizando la calidad del mismo desde el punto de vista microbiológico y nutricional.

### **3.6. Resistencia térmica del *L. casei* soportado en el polvo de calabaza como suplemento de una bebida láctea**

El estrés térmico afecta la actividad de los microorganismos causando daño en membranas, desnaturalización y agregación de proteínas, y desestabilización de ribosomas y ácido ribonucleicos. Si bien la tolerancia térmica es especie y cepa dependiente, en general, temperaturas superiores a 50 °C causan estrés térmico en las bacterias ácido lácticas (Capozzi, Arena, Russo, Spano, & Fiocco, 2016). Por lo tanto, el conocimiento de la resistencia térmica del *L. casei* soportado en el PC es de utilidad para permitir su adecuado uso como ingrediente y/o aditivo en la industria alimentaria o como suplemento dietario en una bebida que se consumirá o rehidratará en caliente. Para ello, se llevó a cabo el estudio de la viabilidad del probiótico bajo condiciones de rehidratación en caliente en una bebida láctea

La resistencia térmica del *L. casei* fue evaluada en leche chocolatada, la cual fue suplementada con el PC conteniendo el *L. casei* (LCH). De igual forma se llevó a cabo un sistema control, adicionando células re-suspendidas en caldo MRS a la leche chocolatada (LCHc). Las temperaturas estudiadas fueron a 50, 63 y 75 °C, sin embargo, sólo se mostrarán los resultados obtenidos a 50 y 63 °C dado que a 75 °C no se registraron células viables del *L. casei* al final del ensayo tanto en la bebida suplementada con el PC como en el sistema control.

La bebida láctea suplementada requirió entre 3 y 4,5 min para llegar a una temperatura de 50 y 63 °C, respectivamente. Para describir la resistencia del probiótico soportado en el PC suplementado a la bebida se utilizó el modelo de distribución de Weibull. Los parámetros del modelo de Weibull se detallan en la **Tabla III.5**.

**Tabla III.5.** Parámetros de ajuste obtenidos del modelo de Weibull de la resistencia térmica del *L. casei* suplementado a una bebida láctea.

Parámetros	50 °C		63 °C	
	PC con <i>L. casei</i>	Control	PC con <i>L. casei</i>	Control
<b>b</b>	0,062 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>n</b>	0,30 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,08 <sup>c</sup>	1,12 ± 0,07 <sup>d</sup>
<b>R<sup>2</sup></b>	99,3	93,6	87,0	98,9
<b>R<sup>2</sup><sub>aj</sub></b>	99,3	92,3	84,9	98,8
<b>DW</b>	2,3	2,3	2,1	3,5

Modelo de Weibull:  $\log N_t/N_0 = -b t^n$ . *b*: cinética de inactivación del microorganismo ( $\text{min}^{-n}$ ). *n*: parámetro forma de la curva de inactivación del microorganismo al tratamiento térmico.  $R^2$ : coeficiente de determinación (%).  $R^2_{aj}$ : coeficiente de determinación ajustado (%). DW: estadístico de Durbin-Watson. PC con *L. casei*: polvo de calabaza conteniendo *L. casei*; Control: células libres de *L. casei*. Valores promedios ± DE ( $n = 2$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas para un mismo parámetro.

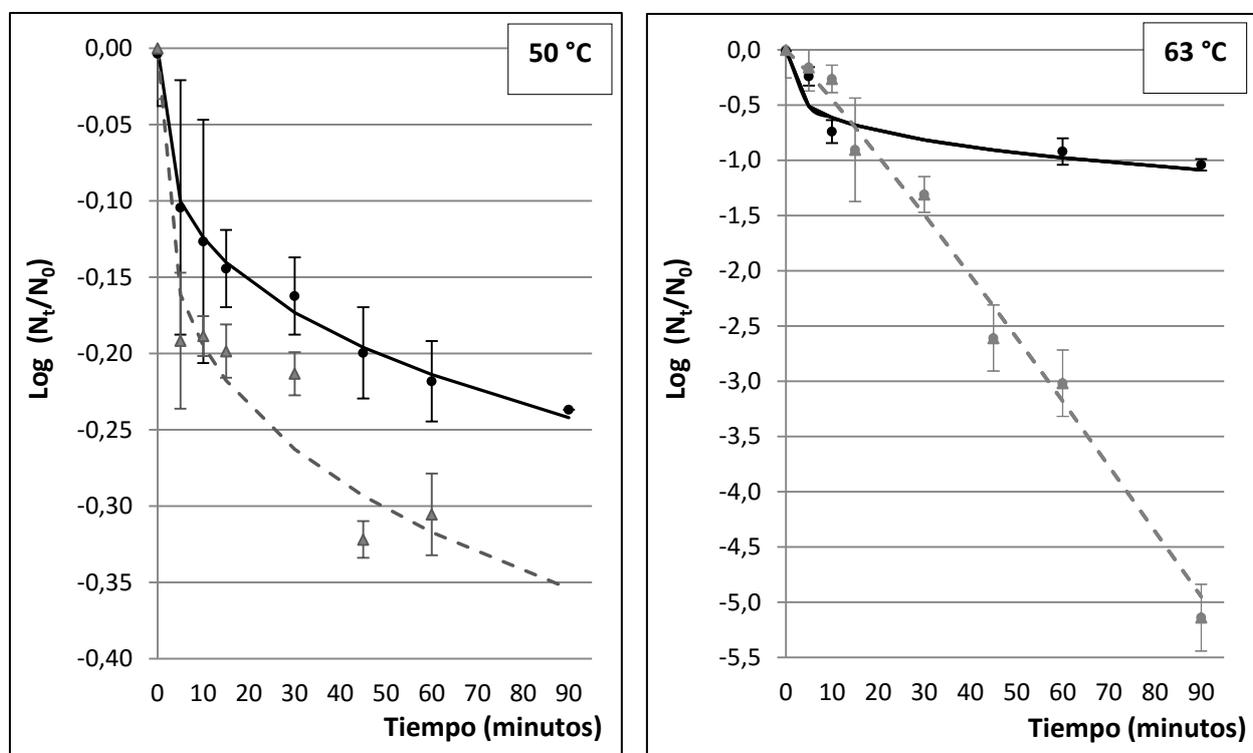
Como se observa en la **Tabla III.5**, los datos experimentales ajustaron adecuadamente al modelo de distribución de Weibull, obteniendo  $R^2 > 87\%$ ,  $R^2_{aj} > 84\%$  y valores del estadístico DW  $> 2,1$ . El parámetro de *b* en el modelo de Weibull simboliza el factor de escala dependiente de la temperatura, por lo tanto, presenta igual analogía al *valor D* que representa el tiempo de reducción decimal necesario para disminuir el 90% de una población de microorganismos a una temperatura específica (Van Boekel, 2002). En las muestras tratadas térmicamente a 50 °C, el parámetro de *b* presentó una tendencia a mayor velocidad de inactivación en el sistema control (LCHc), células libres, respecto del sistema suplementado con *L. casei* soportado en el PC (LCH). Por otra parte, se observó que el valor de *b* incrementó conforme incrementó la temperatura de tratamiento térmico, demostrando que la velocidad de inactivación se quintuplicó ( $p \leq 0,05$ ) a 63 °C en la bebida suplementada con el PC con *L. casei* (**Tabla III.5**).

El valor de *n* en la distribución de Weibull describe el tipo de concavidad de la curva de inactivación del microorganismo y su desviación de la linealidad. En la LCH y LCHc sometidas a 50 °C el valor de *n* fue menor a 1, indicando que la curva de resistencia térmica al tratamiento térmico fue cóncava hacia arriba (con cola) (**Figura III.6**). Este tipo de concavidad sugiere que existe una dependencia entre la inactivación celular y el tiempo, en donde las células más sensibles son inactivadas rápidamente, seguido de una disminución de la velocidad de inactivación de las células que son más resistentes al tratamiento térmico y, probablemente, con mejor adaptación al estrés térmico (Evelyn & Silva, 2015) (**Figura III.6**).

Los valores de *n* de bebidas suplementadas y tratadas térmicamente a 63 °C fueron de 0,26 y 1,12 para la LCH y LCHc, respectivamente, sugiriendo diferentes susceptibilidades al tratamiento

térmico, lo cual impidió la comparación del parámetro  $b$  entre ambos sistemas (**Tabla III.5**). En el caso de la LCHc, el valor de  $n \approx 1$  indica que la cinética de inactivación se ajustó al modelo de primer orden, donde cada célula es igual de susceptible a la inactivación por el tratamiento térmico (Evelyn & Silva, 2015). Mientras que, la LCH a 63 °C presentó un valor de  $n < 1$  representando una curva cóncava con cola (**Figura III.6**). La mayor resistencia del *L. casei* al tratamiento térmico a 63 °C podría deberse al efecto protector de la matriz de calabaza.

Por otra parte, se sabe que la termorresistencia de los microorganismos depende del medio donde son vehiculizados. En este contexto, es de interés resaltar que la reducción de la viabilidad del *L. casei* soportado en el PC suplementado a la LCH fue de  $0,24 \pm 0,01$  y  $1,04 \pm 0,05$  ciclos log después de 90 min de tratamiento térmico a 50 y 63 °C, respectivamente.



**Figura III.6.** Reducción logarítmica de la viabilidad del *L. casei* soportado en el polvo de calabaza suplementado a una bebida láctea tratada térmicamente a 50 °C (izquierda) y 63 °C (derecha).

Línea continua y de punto corresponden al ajuste del modelo de Weibull ( $\text{Log } N_t/N_0 = -b t^n$ ) de la leche chocolatada suplementada con el polvo de calabaza conteniendo *L. casei* (LCH) y con las células libres del probiótico (LCHc), respectivamente. Círculos negros (●) y triángulos grises (▲) pertenecen a los datos experimentales de la LCH y LCHc, respectivamente. Valores promedios  $\pm$  DE ( $n = 2$ ).

#### 4. Conclusiones

Luego del desarrollo del nuevo ingrediente funcional en el Capítulo II, fue necesario realizar una caracterización completa a fin de tener un conocimiento más acabado del producto final. En

este Capítulo pudo llevarse a cabo el ensayo de diferentes condiciones de almacenamiento así como la caracterización fisicoquímica y funcional del ingrediente previamente obtenido.

En términos de viabilidad del *L. casei* soportado en el PC, las condiciones de almacenamiento más adecuadas se observaron a temperatura ambiente. Mientras que, el tiempo de almacenamiento en ambas temperaturas ensayadas afectó la funcionalidad del *L. casei*. Por lo tanto, el estudio de la viabilidad junto con el análisis de la resistencia a la digestión *in vitro*, aportaron información de la concentración real del probiótico que llegaría metabólicamente activo al intestino, y del potencial efecto benéfico al momento del consumo del producto.

La velocidad de cambio de color de la matriz vegetal durante el almacenamiento no fue afectada por la presencia del *L. casei*, sin embargo, el almacenamiento a temperatura de refrigeración redujo significativamente la pérdida de color.

Con respecto a las características físicas y funcionales del PC, no se observaron diferencias sustanciales debido a la presencia de probióticos o a la temperatura de almacenamiento. En general, para algunas propiedades se observó una leve pero significativa ( $p \leq 0,05$ ) diferencia a favor de las muestras almacenadas a 8 °C respecto de las conservadas a 22 °C. Mientras que el efecto de la presencia de probióticos se observó solo en las propiedades de OHC y SC del PC almacenado a 22 °C. En general, se podría decir que el PC con *L. casei* presentó buenas propiedades físicas y funcionales en comparación con datos de bibliografía.

El PC con *L. casei* presentó un elevado contenido de material de pared celular (AIR,  $46,6 \pm 3\%$ ); constituido por un  $12,2 \pm 0,1\%$  de proteínas,  $5,5 \pm 0,5\%$  de lignina,  $5,3 \pm 0,5\%$  de celulosa y  $61 \pm 5\%$  de polisacáridos no celulósicos, donde el  $15,8 \pm 0,7\%$  correspondió a ácidos urónicos.

La Tg incrementó con la presencia del *L. casei* en el PC, y se suprimió el pico endotérmico correspondiente a la gelatinización del almidón en el termograma en comparación con el PC control.

La calidad microbiológica durante la vida útil del PC con *L. casei* estuvo dentro de los límites establecidos por el C.A.A. para productos listos para consumir; garantizando de esta forma la inocuidad y seguridad del PC conteniendo el probiótico.

La resistencia térmica del *L. casei* soportado en el PC y suplementado a una bebida láctea pudo ajustarse adecuadamente a una distribución de Weibull. Los resultados sugirieron una mejor adaptación al estrés térmico por parte de las células cuando estaban soportadas en el PC y un efecto protector de la matriz de calabaza.

La obtención del PC conteniendo *Lactobacillus casei* podría ser una alternativa interesante para la vehiculización de bacterias probióticas en alimentos que no requieren temperaturas de refrigeración para su almacenamiento, reduciendo los costos de almacenamiento y transporte.

Además la posibilidad de rehidratar este producto en caliente amplía la gama de formulaciones alimentarias donde podría ser vehiculizado.

Por otro lado, es de interés estudiar el PC como ingrediente para la formulación de alimentos no deshidratados, como por ejemplo bebidas o postres fermentados, dado que sus propiedades funcionales sugieren su potencial utilización como agente espesante.

## **CAPÍTULO IV**

**Formulación de un postre a base de leche de soja  
utilizando el nuevo ingrediente conteniendo**

***Lactobacillus casei***

## 1. Introducción

Los microorganismos probióticos son generalmente vehiculizados en matrices de alimentos lácteos, siendo el yogur el alimento probiótico más popular (Mishra Pandey & Mishra, 2015). Sin embargo, las nuevas tendencias y la diversificación de los gustos en los consumidores han llevado a la industria alimentaria a ampliar el abanico de alimentos probióticos buscando utilizar distintas matrices vehículo, como por ejemplo chocolate, panificados, productos cárnicos y bebidas a base de frutas y vegetales (Capozzi et al., 2016). A su vez, existe una creciente demanda de alimentos probióticos no lácteos que puedan ser consumidos por personas intolerantes a la lactosa o proteínas lácteas, dislipémicos, o personas con nuevos hábitos alimentarios como veganos o vegetarianos (Ferragut, Cruz, Trujillo, Guamis, & Capellas, 2009). Entre los alimentos de origen vegetal libres de lactosa y proteínas lácteas, podemos mencionar la soja (*Glycine max*) y sus productos derivados, como por ejemplo el tofu, la leche de soja o la leche de soja fermentada. Estos productos son extensamente consumidos en todo el mundo, especialmente en países del este y sur de Asia, China, Singapur, Tailandia y Corea, siendo considerados la principal fuente de proteínas de la dieta. Cabe destacar que, la producción mundial de semillas de soja creció un 44% en los últimos 10 años, posicionando a la Argentina como el tercer país productor de soja con 58,5 millones de toneladas anuales (Ybran & Lacelli, 2016).

El valor nutricional de la soja se caracteriza por presentar un contenido de proteínas superior (36,5%) respecto de otras legumbres, presentando un perfil de aminoácidos y digestibilidad adecuada. El Score de Aminoácidos Corregidos por Digestibilidad Proteica (PDCAAS) de la soja es igual a 1, siendo este valor en términos de calidad igual al de las proteínas de clara de huevo y leche. También se caracteriza por contener un elevado porcentaje de lípidos (18-22%), donde el 55% del total corresponde al ácido linoleico ( $\omega$ -6) (Choi & Rhee, 2006; İçier, Gündüz, Yılmaz, & Memeli, 2015). Por lo tanto, se puede decir que la soja y los productos derivados son fuente de proteínas de alto valor biológico y ácidos grasos esenciales.

Por otro lado, dentro de los compuestos activos de interés de la soja, se encuentran presentes las isoflavonas, que son estructuralmente y funcionalmente similares a los estrógenos (estradiol) del ser humano, y por esta razón son denominados fitoestrógenos. Las isoflavonas se encuentran en formas libres como agliconas (genisteína, daidzeína y gliciteína) o como glucósidos (genistina, daidzina y glicitina). En el tracto intestinal, las isoflavonas glucosiladas pueden ser hidrolizadas por las bacterias del intestino a las formas agliconas, siendo éstas mejor absorbidas que las isoflavonas glicosiladas que presentan mayor hidrofobicidad y menor peso molecular (Horáčková, Mühlhansová, Sluková, Schulzová, & Plocková, 2015). Existe evidencia

científica de que los fitoestrógenos ayudan a prevenir la osteoporosis y reducen el riesgo de padecer cáncer de mama y útero (Song et al., 2007).

El consumo de productos a base de soja fermentados pueden proveer beneficios adicionales al consumidor debido a propiedades funcionales tales como hipocolesterolémico, anticolesterolémico, antiaterogénico, y alergenicidad reducida (Donkor, Henriksson, Vasiljevic, & Shah, 2007; Mishra Pandey & Mishra, 2015). La fermentación es un método de preservación que ha sido utilizado por miles de años para prolongar la vida útil de los alimentos percederos e incrementar el aroma y olor, y mejorar el valor nutricional del producto final. Algunos de los productos fermentados a partir de la soja son: salsa de soja, miso, temph, natto, sufu y leche de soja fermentada (Prajapati & Nair, 2003).

La leche de soja fermentada se prepara a partir de la obtención del extracto acuoso de la semilla de soja mediante la adición de microorganismos como *starter* del proceso de fermentación. La fermentación de los carbohidratos por parte de las bacterias produce el descenso del pH del medio, modificando la carga superficial de las proteínas que se agregan para construir una red tridimensional que retiene la fase líquida y pequeñas gotas de lípidos. Entre los microorganismos más estudiados en el proceso fermentativo y su habilidad de crecer en esta matriz vegetal se encuentran: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacteria infantis*, *Bifidobacteria longum* (Champagne, Green-Johnson, Raymond, Barrette, & Buckley, 2009; Ferragut et al., 2009; Wang, Yu, Yang, & Chou, 2003).

Desde un punto de vista tecnológico, el proceso de fermentación de leche de soja es similar al de leche de vaca para elaborar yogur. Sin embargo, estos productos presentan baja tasa de acidificación y de crecimiento de los microorganismos adicionados, lo cual incrementa el tiempo de fermentación. En general, el tiempo para reducir el pH a 4,5 requiere de 10 a 24 horas a 37 °C (Ferragut et al., 2009; Mishra Pandey & Mishra, 2015). Autores como Champagne, Green-Johnson, Raymond, Barrette, & Buckley (2009) han estudiado la cinética de acidificación con varias cepas de bacterias ácido lácticas, concluyendo que la tasa de acidificación es dependiente de la cepa utilizada y de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -galactosidasa.

Una de las principales propiedades de interés para la industria alimentaria es la estabilidad física durante el almacenamiento en los productos lácteos debido a su impacto en la aceptabilidad por parte de los consumidores dado que está relacionada a su apariencia. Una de las estrategias más utilizadas por la industria alimentaria para prevenir la sinéresis es a través del incremento en el contenido de sólidos o la adición de agentes estabilizantes (Granato, Bigaski Ribeiro, Castro, & Masson, 2010). En este contexto, sería interesante evaluar la potencial aplicación del

nuevo ingrediente como agente espesante en la formulación de productos alimenticios, considerando los resultados obtenidos en las propiedades de hidratación caracterizadas en el Capítulo III de la presente tesis.

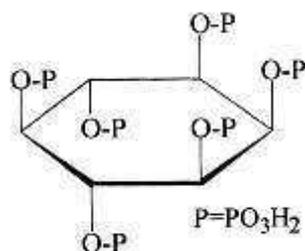
Por otro lado, la aceptabilidad de los productos a base de soja muchas se ve obstaculizado por el flavour a poroto y por la presencia de compuestos no deseables como el ácido fítico, rafinosa y estaquiosa (Donkor et al., 2007). Sin embargo, algunos autores han propuesto al proceso de fermentación de la leche de soja con bacterias ácido lácticas como estrategia para mejorar la digestibilidad y palatabilidad, y la adición de pulpa o jugos de frutas para aumentar la aceptabilidad del producto final (Içier et al., 2015; Shilpi & Kumar, 2013).

La lipoxigenasa es la enzima responsable del flavour a poroto en los productos a base de soja que se forma durante la oxidación catalítica de los ácidos grasos poliinsaturados conteniendo unidades *cis,cis*-1-4 pentadieno que corresponden al hidroperoxidieno conjugado proveniente de la adición de oxígeno molecular (Yang & Li, 2010). Sin embargo, el tratamiento térmico inmediato a la molienda del grano de soja o la adición de agua caliente durante la molienda húmeda reducen la formación de estos compuestos volátiles por inactivación de la enzima lipooxigenasa (Hou & Chang, 2003).

El inositol hexafosfato ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ), también conocido como ácido fítico (AF), se encuentra predominantemente en cereales y legumbres, y principalmente en los alimentos no procesados (**Figura IV.1**). Su ingesta está estimada en promedio entre 0,180 y 4,569 mg/día, y depende fuertemente del tipo de dieta, por ejemplo su ingesta es mayor en personas con hábitos alimentarios vegetarianos (Schlemmer, Frølich, Prieto, & Grases, 2009).

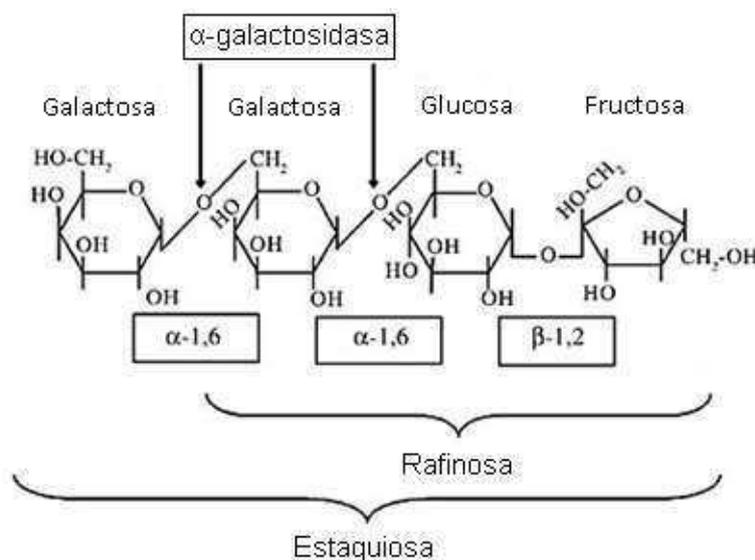
En los alimentos, el AF puede formar complejos insolubles con proteínas o iones metales (hierro, zinc, calcio), y en consecuencia reducir la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los mismos durante el pasaje por el tracto gastrointestinal. La interacción del AF con las proteínas es pH-dependiente, mientras que con los cationes la interacción es exclusivamente con los grupos fosfato; éstos pueden unirse a un sólo grupo fosfato, a dos grupos fosfato de una misma molécula o a grupos fosfato de distintas moléculas de AF. Paradójicamente, se ha encontrado evidencia de que a bajas dosis presenta efectos positivos sobre la salud, como por ejemplo su acción protectora frente al cáncer, reducción de la formación de cálculos renales y prevención de enfermedades cardiovasculares (Sathe & Venkatachalam, 2005).

Es de interés resaltar, que algunas bacterias ácido lácticas pueden sintetizar fitasas que degradan el AF por desfosforilación e hidrólisis, dando lugar a formación de mio-inositol y fósforo orgánico, mejorando de esta forma la bioaccesibilidad de los minerales (Tang et al., 2010).



**Figura IV.1.** Estructura molecular del inositol hexafosfato.

El ser humano carece de la enzima pancreática  $\alpha$ -galactosidasa, la cual es necesaria para la hidrólisis de los  $\alpha$ -galactooligosacáridos ( $\alpha$ -GOS), tales como la rafinosa y estaquiosa (**Figura IV.1**). Estos compuestos pueden ser fermentados por los microorganismos produciendo gases en el colon, los cuales inducen a la flatulencia y otros desórdenes gastrointestinales en personas sensibles (LeBlanc et al., 2004). Los  $\alpha$ -GOS pueden ser hidrolizados por la enzima  $\alpha$ -galactosidasa presente en bacterias ácido lácticas, previniendo el efecto de distensión abdominal sin eliminar el efecto probiótico (Gänzle & Follador, 2012). Algunos estudios llevados a cabo en leche de soja fermentada con bacterias ácido lácticas han revelado que el proceso de fermentación reduce notablemente estos compuestos; no obstante, poca información existe acerca del contenido durante el tiempo de almacenamiento (Wang et al., 2003).



**Figura IV.2.** Estructura molecular de la rafinosa y estaquiosa.

Desde una perspectiva tecnológica y nutricional, una alternativa simple y económica para reducir la presencia de AF, rafinosa y estaquiosa es utilizar bacterias que sean capaces de

sintetizar fitasas y  $\alpha$ -galactosidasa, y de esta forma reducir el contenido de estos compuestos en el producto final.

En un estudio llevado a cabo en adulto danos, se pudo evidenciar que el consumo diario de leche de soja fermentada incrementó la población de *Bifidobacterium ssp.* y *Lactobacillus ssp.*, y disminuyó el número de *Clostridium perfringens*, mejorando significativamente el ecosistema del tracto intestinal (Cheng et al., 2005).

En el Capítulo III se pudo determinar la vida útil del nuevo ingrediente a partir de subproductos de calabaza y conteniendo *L. casei*, considerando el mayor efecto probiótico en la salud del consumidor que podría obtenerse al momento de su consumo. A su vez, se determinó que el 50% de la composición química del ingrediente correspondió a material de pared celular, por lo tanto su aplicación en la formulación de alimentos incrementaría el contenido de FD en el producto final. Asimismo, las propiedades de hidratación del nuevo ingrediente y su comparación con valores bibliográficos obtenidos en otras fracciones ricas en FD permitieron inferir su potencial aplicación como agente espesante en la formulación de productos alimenticios. En vista de las mencionadas características nutricionales, químicas y físicas, resulta interesante evaluar su aplicación como potencial ingrediente en la formulación de un producto alimenticio, como por ejemplo leche de soja con pulpa de frutilla fermentada.

#### **Objetivo General:**

Utilizar el nuevo ingrediente funcional a base de subproductos de calabaza conteniendo *Lactobacillus casei* (ATCC-393), obtenido y caracterizado en los Capítulos II y III, como insumo en la elaboración de un postre a base de leche de soja a fin de proponer nuevas alternativas para ampliar la oferta de alimentos de origen no lácteo enriquecidos con probióticos y fibra dietaria.

#### **Objetivos específicos:**

- Formular y elaborar un postre no lácteo a base de leche de soja y pulpa de frutilla utilizando el nuevo ingrediente en base a subproductos de calabaza conteniendo *L. casei* como starter iniciador del proceso de fermentación.
- Estudiar el efecto de la concentración del ingrediente y de sólidos solubles de la leche de soja (%SS) sobre la viabilidad del probiótico, la estabilidad física, el color, y la firmeza del postre resultante.
- Seleccionar una formulación que optimice la viabilidad del probiótico, las propiedades físicas, texturales y de color del postre a base de leche de soja.

- Caracterizar y evaluar las propiedades nutricionales, texturales y organolépticas del postre no lácteo.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Materiales**

#### **2.1.1. Preparación del inóculo**

Se determinó siguiendo la metodología previamente detallada en la sección 2.1.2 del Capítulo II.

#### **2.1.2. Preparación del ingrediente**

La preparación del ingrediente se realizó siguiendo la misma metodología detallada en la sección 2.1.3 del Capítulo III.

#### **2.1.3. Preparación de la leche de soja**

Las semillas de soja (*Glycine max*) fueron adquiridas en un supermercado mayorista. Se pesaron 250 g de soja y se mezclaron con 250 ml de agua potable, (p/v), dejándolos en remojo en una cámara a 25 °C al menos 18 horas (**Figura IV.3**). Una vez que las semillas de soja absorbieron el agua circulante, se trituraron con un procesador manual (Modelo D-56, Molinex, Buenos Aires, Argentina) hasta obtener una pasta homogénea. Inmediatamente, la pasta se colocó en un recipiente de acero inoxidable, se adicionó 1.250 mL de agua destilada (relación final agua/poroto seco = 6:1, v/p) y se llevó a ebullición durante 30 min con agitación constante. Seguidamente, se midió el pH y los grados Brix (°B) y la mezcla fue triturada nuevamente durante 2 min. Toda la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró a través de un lienzo o gasa fina, separando el residuo sólidos (okara) de la leche.

Para obtener leche de soja con distintas concentraciones de sólidos solubles (°B) se utilizó un rotovapor (Modelo R-124, BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Alemania) conectado a un baño térmico (Modelo B-840, BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Alemania). Las condiciones de evaporación fueron realizadas a una temperatura de 70 °C a 20 rpm.

Finalmente, la leche a base de soja, se almacenó a temperatura de refrigeración (8 °C) sin la adición de conservantes durante 3 a 4 días, hasta su utilización.



**Figura IV.3.** Semillas del poroto de soja (*Glycine max*).

#### **2.1.4. Preparación del postre a base de leche de soja**

La leche de soja (~ 35 mL), con distintos niveles sólidos solubles (6-16 ° Brix), se colocó en un tubo cónico de 50 mL (Eppendorf, Hamburg, HH, Alemania) donde se adiciono esencia artificial de frutilla (1% (p/v; Sensaciones, Avellaneda, Buenos Aires, Argentina), pulpa de frutilla (10% p/v; Bahia Regional Trade S.A., Santa Fé, Argentina), y edulcorante natural a base de estevia (1% p/v; Hileret Stevia, Buenos Aires, Argentina). Inmediatamente, todos los sistemas fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min y rápidamente enfriados en baño de agua a 0 °C. Seguidamente, se adicionó el ingrediente (0,1-3,0 %; p/v) según los niveles propuestos por la Metodología de Superficie de Respuesta (**Tabla IV.1**), seguido de un proceso de homogeneización a velocidad de 9.500 rpm durante 30 segundos (T25 Ultra-Turrax® IKA, Guangzhou, Cantón, China) en condiciones asépticas y bajo flujo laminar. Luego, los sistemas fueron incubados a 37 °C con agitación orbital a 60 rpm durante 20 h.

Al final del período de fermentación del postre, se determinó el pH, la acidez titulable, la viabilidad del *L. casei*, la capacidad de retención de agua, el color y la textura.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Caracterización físico-química**

El pH fue determinado con un electrodo combinado de vidrio Ag<sup>+</sup>/ AgCl conectado a un pH metro (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA).

El porcentaje de sólidos solubles se determinó en la leche de soja y en el postre luego del proceso de fermentación, utilizando un refractómetro portátil con compensación automática de temperatura (Modelo RHB-32, Cole-Parmer, Shangai, China). Los resultados se expresaron como porcentaje de °Brix.

La acidez titulable se determinó por titulación con NaOH 0,01 M y fenolftaleína como indicador, y los resultados fueron expresados como g de ácido láctico/100 mL postre.

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado, partiendo de muestras independientes, y se informa en los resultados el valor promedio ± desvío estándar (DE).

### 2.2.2. Determinación de la viabilidad del *L. casei*

Se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.1 del Capítulo II.

Los resultados de la viabilidad del probiótico se expresaron como log (UFC/g ingrediente).

En el postre, este dato se utilizó para calcular el incremento de células viables del *L. casei* a partir de la diferencia entre el recuento inicial y final de las UFC/mL de postre. Los resultados se expresaron como  $\Delta$ UFC, informando el valor promedio  $\pm$  DE.

### 2.2.3. Estabilidad física a corto plazo

Luego de la homogeneización del ingrediente, los aditivos y la leche de soja,  $\sim$  2 g de cada sistema del diseño de la MSR fueron colocados en un tubo Eppendorf de 2,5 mL. Seguidamente, fueron llevados a incubación a 37 °C durante 12 h. Una vez finalizado el proceso de fermentación, las muestras fueron inmediatamente refrigeradas a 8 °C. Para determinar la capacidad de retención de agua (WHC), las muestras contenidas en los tubos Eppendorf de 2,5 mL se centrifugaron a 6 °C a 5.000 rpm durante 40 min. El sobrenadante fue cuidadosamente removido y el pellet fue pesado (Granato, Bigaski Ribeiro, et al., 2010). La WHC se expresó en porcentaje, utilizando la siguiente expresión (Ecuación 1):

$$\text{WHC (\%)} = \frac{\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Sobrenadante}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

Las determinaciones fueron realizadas por duplicado, informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

### 2.2.4. Evaluación del color

La medición instrumental del color se determinó sobre las muestras después del proceso de fermentación. Las mediciones se realizaron en el espacio CIE lab con un colorímetro (Minolta Co. Ltd., Tokio, Japón), bajo el iluminante D65 y con un ángulo de observación de 2 °. La luminosidad ( $L^*$ ) se utilizó para cuantificar la oscuridad/claridad, la coordenada  $a^*$  para determinar el rojo/verde, y la coordenada  $b^*$  para determinar el amarillo/azul.

A partir de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  se calculó el valor de chroma (Chr) (Ecuación 2), y el ángulo de tono (Ecuación 3):

$$\text{Chr} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (2)$$

$$\text{Ángulo de tono} = \text{arco tangente } \frac{b^*}{a^*} \quad (3)$$

Antes de las mediciones, el equipo fue calibrado usando un cerámico blanco de referencia. Las muestras fueron colocadas en un porta muestra con fondo de vidrio. Las mediciones se realizaron por duplicado, a partir de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

## **2.2.5. Textura**

### **2.2.5.1 Ensayo de Punción**

La textura se evaluó mediante un Ensayo de Punción utilizando una máquina universal de testeo Instron (Modelo 3345, Norwood, MA, U.S.A.) equipada con una celda de carga de 100 N. El ensayo se llevó a cabo introduciendo una punta de acero inoxidable (h: 152,5 mm;  $\varnothing$ : 20 mm) en una muestra de  $\sim$  7 mL, con una velocidad de 5 mm/seg hasta lograr una deformación del 70% (Guggisberg, Cuthbert-Steven, Piccinali, Bütikofer, & Eberhard, 2009). En cada ensayo se registraron las curvas de fuerza (N) en función del desplazamiento de la punta (mm). A partir de estos datos se graficaron las curvas de esfuerzo ( $\sigma$ ) (Ecuación 4) en función de la deformación ( $\epsilon$ ) (Ecuación 5). La firmeza se calculó como el cociente entre  $\sigma/\epsilon$  (MPa).

$$\sigma \text{ (MPa)} = F/A \quad (4)$$

Dónde, F es la fuerza (N) requerida para deformar la muestra; A corresponde al área de la muestra ( $\text{mm}^2$ ), sección transversal normal a la dirección de la fuerza, F.

$$\epsilon \text{ (\%)} = D/h \times 100 \quad (5)$$

Dónde, D representa el desplazamiento (mm) de la punta; h es la altura (mm) inicial de la muestra.

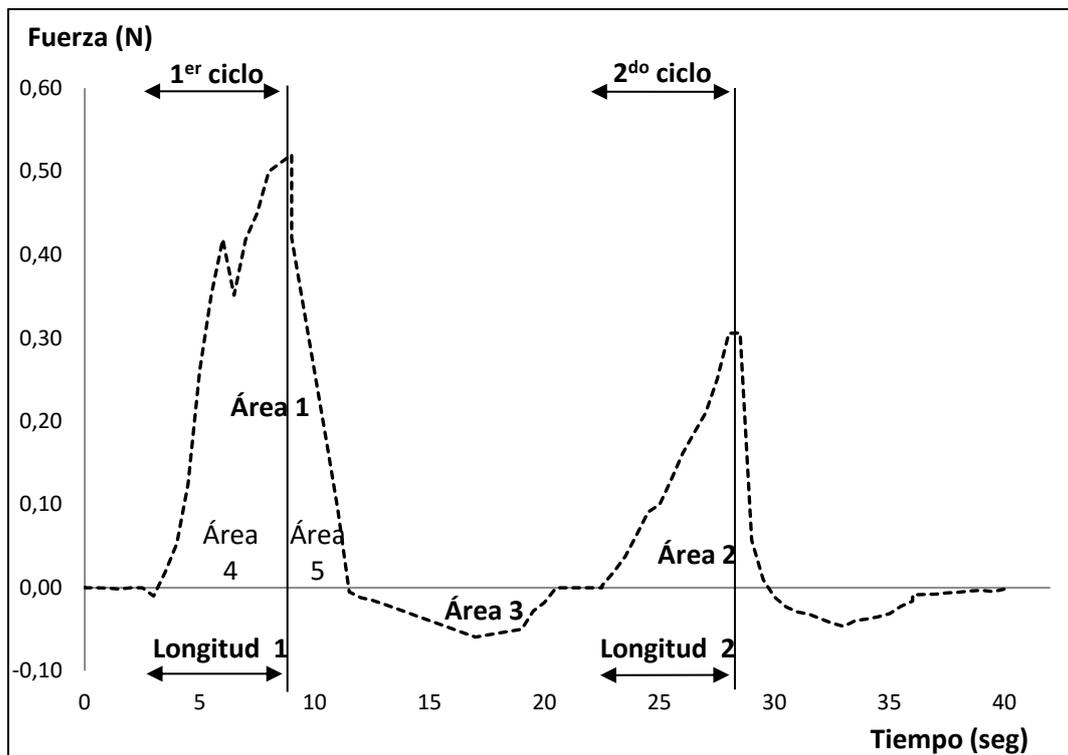
Todas las mediciones se realizaron a 8 °C, por cuadruplicado a partir de muestras independientes, e informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

### **2.2.5.2 Análisis del Perfil de Textura (TPA)**

El ensayo de TPA se evaluó utilizando una máquina universal de testeo Instron (Modelo 3345, Norwood, MA, USA.) equipada con una celda de carga de 100 N. Cada muestra de  $\sim$  7 mL fue penetrada con una punta de acero inoxidable (h: 152,5 mm;  $\varnothing$ : 20 mm) a una velocidad de 0,5 mm/seg hasta una deformación del 70% en cada una de las dos compresiones consecutivas. Las mediciones se realizaron al menos por quintuplicado, a temperatura ambiente. Las muestras permanecieron refrigeradas (8 °C) hasta el momento de la medición. Durante los dos ciclos de

compresión y relajación, se registró la fuerza (N), el desplazamiento (mm) de la punta y el tiempo (seg), y a partir de estos datos se calcularon los siguientes parámetros de textura (ISO 5492:2012) (**Figura IV.4**):

- Fracturabilidad: fuerza necesaria para lograr la primera ruptura significativa de la muestra durante el primer ciclo de compresión (N).
- Dureza: es la máxima fuerza requerida para deformar la muestra durante el primer ciclo de compresión (N).
- Adhesividad: corresponde al área negativa (Área 3) después del 1<sup>er</sup> ciclo de compresión (N.seg).
- Cohesividad: se refiere a la relación entre el área positiva del 2<sup>do</sup> ciclo de compresión (Área 2) y el 1<sup>er</sup> ciclo de compresión (Área 1).
- Elasticidad: se expresa como el cociente entre la distancia a la máxima fuerza del Área 2 y la distancia a la máxima fuerza del Área 1 (adimensional).
- Gomosidad: se refiere al producto entre la dureza y la cohesividad (N).
- Masticabilidad: se refiere al producto entre la dureza, cohesividad y elasticidad (N).



**Figura IV.4.** Curva típica representativa del Ensayo de Perfil de Textura.

## 2.2.6. Propiedades reológicas

### 2.2.6.1 Ensayo de amplitud y barrido de frecuencia

Para evaluar el comportamiento viscoelástico del postre se realizaron mediciones en un reómetro dinámico de tensión tangencial controlada (Paar Physica MCR 300, Antón Paar GmbH, Ostfildern-Scharnhausen, Alemania) con una geometría de platos paralelos de 40 mm de diámetro (Modelo CP75-2). Todas las mediciones se realizaron a temperatura constante de 10 °C. Se llevaron a cabo barridos de esfuerzo entre 10 y 1.000 Pa a frecuencias constantes de 6 s<sup>-1</sup> para determinar el rango de viscoelasticidad lineal. De acuerdo a los rangos obtenidos, se seleccionó un valor de deformación para cada muestra y se realizaron los barridos de frecuencia en el rango de 0,1 a 10 s<sup>-1</sup> para obtener el espectro mecánico de cada sistema en el valor de deformación seleccionado.

### 2.2.6.2 Ensayo de flujo

El ensayo de flujo se llevó a cabo utilizando un reómetro (Paar Physica MCR 300, Antón Paar GmbH, Ostfildern-Scharnhausen, Alemania). Las mediciones se realizaron a temperatura constante de 10 °C (Viscotherm VT2 Physica, Ostfildern-Scharnhausen, Alemania), utilizando una geometría de cono y plato de 75 mm de diámetro (Modelo CP75-2) con un ángulo de 2 °. Aproximadamente, 5 mL de muestra se colocaron en la placa Peltier y durante las mediciones se registraron los parámetros de esfuerzo de corte ( $\tau$ ; Pa), velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ; s<sup>-1</sup>) en un rango de 10-1.000 s<sup>-1</sup>, y viscosidad aparente ( $\eta$ ; Pa s). Los datos experimentales de esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación fueron ajustados al Modelo de Herschel-Bulkley (Ecuación 6):

$$\tau = \tau_0 + K \times \dot{\gamma}^n \quad (6)$$

Donde,  $\tau$  representa el esfuerzo de corte expresado en Pa,  $\tau_0$  es el esfuerzo de corte mínimo inicial expresado en Pa,  $K$  es el coeficiente de consistencia (Pa s<sup>n</sup>),  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de esfuerzo de corte expresado en s<sup>-1</sup>, y  $n$  representa el índice de comportamiento de flujo (adimensional). Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado a partir de muestras independientes, informando en los resultados el valor promedio  $\pm$  DE.

### **2.2.7. Caracterización nutricional**

#### **2.2.7.1 Resistencia del probiótico a las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal**

Se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.6 del Capítulo II. Brevemente, 2 mL del postre conteniendo un recuento viable de *L. casei*  $>10^9$  UFC/mL fueron adicionados a 2,5 mL de saliva artificial y agitados durante 2 min con vortex. Luego, se inició la digestión gástrica mediante la adición de 15 mL de una solución de HCl-pepsina [pepsina al 0,3% (p/v) (Merck, 0,7 FIP-U/mg) en HCl 0,01 N] seguido de incubación a 37 °C con agitación orbital a 120 rpm durante 2 h. Seguidamente, el pH de la solución gástrica se ajustó a 7,5-8,0 con una solución estéril de NaOH 2 M, y finalmente, 15 mL de solución intestinal ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M) conteniendo sales biliares (0,6% p/v) fueron adicionadas, seguido de incubación a 37 °C con agitación orbital a 120 rpm durante 2 h.

Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia del *L. casei* a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal, mediante el cociente entre el valor logarítmico del recuento viable en el PC luego de cada etapa de digestión ( $N_t$ ) al tiempo  $t$  y el recuento inicial antes de la digestión ( $N_0$ ) en el PC [ $\log N_t / \log N_0 \times 100$ ].

Los ensayos *in vitro* se realizaron por duplicado a partir de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

#### **2.2.7.2 Contenido de ácido fítico**

El contenido de ácido fítico se evaluó mediante una técnica colorimétrica siguiendo la metodología descrita por Gao et al. (2007) y Lai, Hsieh, Huang, & Chou (2013), con leves modificaciones. Brevemente,  $\sim$  0,25 g de postre liofilizado fueron colocados en un frasco de vidrio con tapa a rosca y re-suspendido en 5 mL de HCl al 2,4% (v/v), seguido de agitación magnética durante 16 h. Luego, se adicionaron  $\sim$  0,5 g de NaCl con agitación durante 10 min, y se dejó reposar a -20 °C durante 20 min. La muestra fue centrifugada a 10 °C a 3.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se separó del precipitado, a partir del cual a 1 mL de sobrenadante se diluyó con 24 mL de agua bidestilada (1:25), seguido de agitación con vórtex y posterior almacenamiento a 4 °C en oscuridad, hasta su determinación dentro de las 24 h.

A una alícuota de 750  $\mu$ L de muestra (1:25), se mezcló con 750  $\mu$ L de agua bidestilada y 500  $\mu$ L del reactivo de Wade (0,03% de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [Anedra, San Fernando, Buenos Aires, Argentina] y 0,3% de ácido sulfosalicílico.  $2\text{H}_2\text{O}$  [Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina] en agua destilada), seguido de agitación en vórtex durante 1 min. Luego, fue centrifugada a 3.000 rpm a 10 °C durante 20 min. La curva de calibración se realizó con un estándar de sal sódica del ácido fítico ( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6 \cdot x\text{Na}^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4,2 mg/100 mL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs SG, Suiza) y la

absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Kioto, Japón) a una longitud de onda de 500 nm.

El contenido de ácido fítico se expresó en mg de ácido fítico/g de postre (base seca).

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado para cada sistema, partiendo de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

### **2.2.7.3 Contenido de rafinosa y estaquiosa**

El contenido de rafinosa y estaquiosa se analizó mediante HPLC utilizando una columna Polyamine II YMC-Pack (250 x 4,6 mm, YMC Co., Kioto, Japón) de acuerdo a la metodología descrita por Kim et al. (2013), con breves modificaciones. Aproximadamente 0,5 g de muestra liofilizada fueron re-suspendidos en 10 mL de etanol al 20% (v/v). Inmediatamente, la muestra fue colocada en un baño térmico a 35 °C durante 60 min con agitación constante. Luego, fue centrifugada a 6 °C a 4.830 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue recogido y filtrado a través de un cartucho Sep-Pak® Plus NH<sub>2</sub> (Waters, Milford, MA, USA), y luego llevado a sequedad bajo vacío (Martin Christ Alpha 1-4, Osterode am Harz, NI, Alemania) durante 24 h. Finalmente, el residuo seco se almacenó en un recipiente hermético a -20 °C hasta su utilización.

El residuo seco sólido fue re-suspendido en agua bidestilada, filtrado a través de un filtro de nailon de 0,25  $\mu$ , y finalmente 20  $\mu$ L fueron inyectados en el equipo de HPLC conectado a un desgasificador en línea (Modelo AF, Waters, Milford, MA, USA), a una bomba de suministro del solvente de la fase móvil (Modelo 1525, Waters, Milford, MA, USA) y a un detector de índice de refracción (Modelo 2414, Waters, Milford, MA, USA). Las condiciones de corrida se realizaron con la columna termostatazada a 35 °C, el detector a 39 °C, la fase móvil acetonitrilo: agua (70:30, v/v; Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina) y con una velocidad de flujo de 1,0 mL/s. Las curvas de calibración se realizaron con los estándares de rafinosa y estaquiosa grado HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Los resultados se expresaron como mg/g postre (base seca). Las determinaciones se realizaron por duplicado, a partir de muestras independientes, y en los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE.

### **2.2.8. Evaluación sensorial**

En la evaluación sensorial participaron 62 voluntarios, consumidores frecuentes o no frecuentes de productos a base de soja. Cada panelista recibió una porción individual de  $\sim$  5 mL de cada muestra en vasos plásticos codificados con 3 números asignados aleatoriamente. Las muestras se ofrecieron a temperatura de refrigeración. El panel no entrenado fue instruido en evaluar el postre según el grado de agrado o desagrado en atributos de color, aroma, cremosidad en la

boca, y aceptabilidad global usando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (**ANEXO D**). También se les instruyó enjuagar la boca con agua mineral antes de comenzar con la evaluación y de comer una galletita de agua entre muestra y muestra para evitar el arrastre de efectos (Lawless & Heymann, 2010). En los resultados se informa el valor promedio  $\pm$  DE del nivel de percepción de cada atributo evaluado y de la aceptabilidad global del postre conteniendo el nuevo ingrediente.

### **2.2.9. Diseño experimental y análisis estadístico**

Para evaluar el efecto de las variables independientes sobre las respuestas estudiadas se utilizó un diseño central compuesto de dos factores (Ingrediente; %SS), con cuatro niveles (-2; -1; +1; +2) y puntos centrales, utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Los niveles propuestos para cada factor se determinaron en ensayos previos, estableciendo los niveles para el ingrediente: 0,1; 0,8; 1,5; 2,3 y 3 g/100mL de leche de soja, y para el %SS: 4; 6,5; 9,0; 11,5 y 14,0 °Brix. Los valores decodificados y codificados se detallan en la **Tabla IV.1**. El punto central del diseño (0,0) se realizó por triplicado para calcular la reproducibilidad del método.

Los datos experimentales se ajustaron a una función polinómica de segundo grado (Ecuación 7):

$$\Psi = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_{11}x_1^2 + B_{22}x_2^2 + B_{12}x_1x_2 \quad (7)$$

Donde,  $\Psi$  es la variable dependiente,  $x_1$  y  $x_2$  son las variables independientes (ingrediente y SS);  $B_0$  es el valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño;  $B_1$  y  $B_2$  son los coeficientes de regresión lineal;  $B_{11}$  y  $B_{22}$  son los coeficientes de regresión cuadrático; y  $B_{12}$  es el coeficiente de interacción entre las variables independientes. Esta ecuación permite evaluar los efectos de los términos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables independientes sobre las variables dependientes seleccionadas (Montgomery, 2008).

La significancia estadística de los coeficientes de los términos de las ecuaciones de regresión para cada respuesta se analizó con un ANOVA, considerando significativo un  $p \leq 0,05$  con un nivel de significancia del 95,0%. La adecuación del modelo se evaluó a través del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el  $R^2$  ajustado, la prueba de falta de ajuste ( $p \geq 0,05$ ) y el estadístico Durbin-Watson.

La función deseabilidad se utilizó para optimizar simultáneamente varias respuestas, permitiendo transformar un problema multi-respuesta en un problema con una única respuesta (Barros, Spacino, & Bruns, 2003; Del Castillo, Montgomery, & McCarville, 1996). Por último, para validar el poder de predicción de las ecuaciones aplicadas a la formulación optimizada, los

valores de las respuestas obtenidas estadísticamente a partir del diseño fueron comparados con los valores obtenidos experimentalmente.

Para el análisis del diseño, la generación de las superficies de respuesta, el análisis de regresión no lineal y los análisis estadísticos de las muestras se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV (V 2.15.06, 2007, Warrenton, VA, USA).

### **3. Resultados y discusión**

#### **3.1. Efecto de la concentración del ingrediente y de los sólidos solubles de la leche de soja sobre la viabilidad del probiótico, estabilidad física, textura y color del postre**

Los resultados correspondientes al incremento en la viabilidad del *L. casei* ( $\Delta$ UFC), pH, acidez titulable, capacidad de retención de agua (WHC) y firmeza se detallan en la **Tabla IV.1**. Mientras que, los coeficientes de regresión de los factores ingrediente y concentración de sólidos solubles de la leche de soja (%SS) se resumen en la **Tabla IV.2**.

**Tabla IV.1.** Matriz del diseño experimental con las variables independientes y respuestas físico-químicas, incremento en la viabilidad del *L. casei* y textura para la optimización de la formulación del postre a base de leche de soja.

Sistemas	Variables Independientes				Variables Respuestas				
	Sólidos solubles <sup>1</sup>		Ingrediente <sup>2</sup>	pH	Acidez titulable <sup>3</sup>	$\Delta$ UFC <sup>4</sup>	WHC <sup>5</sup>	Firmeza <sup>6</sup>	
<b>*1</b>	0	11	0	0,5425	4,87±0,05 <sup>efg</sup>	1,01±0,01 <sup>d</sup>	0,69±0,03 <sup>cde</sup>	82,3±0,7 <sup>cde</sup>	0,00204±0,00008 <sup>d</sup>
<b>2</b>	-1	8,5	1	0,7969	4,71±0,05 <sup>bc</sup>	0,96±0,01 <sup>c</sup>	0,88±0,07 <sup>de</sup>	80,6±0,9 <sup>cd</sup>	0,0014±0,0001 <sup>c</sup>
<b>3</b>	-1	8,5	-1	0,2889	4,72±0,05 <sup>bc</sup>	0,80±0,02 <sup>a</sup>	0,73±0,03 <sup>cde</sup>	76,5±0,5 <sup>b</sup>	0,0008±0,0001 <sup>b</sup>
<b>4</b>	-2	6	0	0,5425	4,52±0,05 <sup>a</sup>	0,78±0,01 <sup>a</sup>	0,89±0,01 <sup>e</sup>	72,3±2,3 <sup>a</sup>	0,00043±0,00008 <sup>a</sup>
<b>5</b>	1	13,5	-1	0,2880	4,90±0,05 <sup>gh</sup>	1,17±0,01 <sup>e</sup>	0,41±0,06 <sup>ab</sup>	84,6±0,2 <sup>e</sup>	0,00205±0,00006 <sup>d</sup>
<b>6</b>	0	11	-2	0,0357	4,98±0,05 <sup>h</sup>	0,90±0,02 <sup>b</sup>	2,07±0,04 <sup>g</sup>	80,36±0,02 <sup>c</sup>	0,0012±0,0003 <sup>bc</sup>
<b>7</b>	2	16	0	0,5433	4,95±0,05 <sup>gh</sup>	1,47±0,02 <sup>h</sup>	1,3±0,3 <sup>f</sup>	89,1±0,2 <sup>f</sup>	0,0026±0,0002 <sup>e</sup>
<b>*8</b>	0	11	0	0,5425	4,82±0,05 <sup>def</sup>	1,11±0,04 <sup>d</sup>	0,65±0,07 <sup>c</sup>	83,4±1,8 <sup>cde</sup>	0,0023±0,0002 <sup>de</sup>
<b>9</b>	1	13,5	1	0,7965	4,79±0,05 <sup>cde</sup>	1,36±0,01 <sup>g</sup>	0,33±0,02 <sup>a</sup>	91±1 <sup>f</sup>	0,0038±0,0003 <sup>f</sup>
<b>*10</b>	0	11	0	0,5425	4,77±0,05 <sup>cd</sup>	1,12±0,01 <sup>d</sup>	0,7±0,1 <sup>cd</sup>	83±5 <sup>cde</sup>	0,0023±0,0001 <sup>de</sup>
<b>11</b>	0	11	2	1,0503	4,67±0,05 <sup>b</sup>	1,32±0,01 <sup>f</sup>	0,58±0,05 <sup>bc</sup>	84±2 <sup>de</sup>	0,0026±0,0003 <sup>e</sup>

\* Sistemas centrales del diseño experimental. <sup>1</sup>Sólidos solubles expresados en porcentaje de grados Brix (° B). <sup>2</sup> Cantidades del ingrediente en gramos agregadas a 35 mL de leche de soja. <sup>3</sup> Acidez titulable expresada como g de ácido láctico/100 mL leche fermentada. <sup>4</sup> Incremento en la viabilidad del *L. casei*. <sup>5</sup> Capacidad de retención de agua expresada en %. <sup>6</sup> Firmeza expresada en MPa.

Antes de iniciar el proceso de fermentación, los sistemas estudiados presentaron un pH inicial de 6,1±0,3 y luego de 20 h de incubación el pH se redujo en todos los sistemas mostrando valores entre 4,5-4,9. La concentración de ácido láctico de los sistemas presentó valores entre 0,79±0,03 y 1,48±0,03 g de ácido láctico/100 mL postre (**Tabla IV.1**). El recuento viable del *L. casei* arrojó valores entre 9,45 y 10,05 log (UFC/mL de postre), cumpliendo con la normativa local vigente para que el producto sea considerado probiótico (ANMAT, 2011).

**Tabla IV.2.** Coeficientes de regresión del ajuste al modelo polinomial de segundo grado de las variables respuestas estudiadas en la formulación del postre a base de leche de soja.

	Coeficientes de regresión					
	$\Delta$ UFC	WHC %	Firmeza (MPa)	Ángulo de tono (°)	Chroma	Luminosidad
<b>Constante</b>	-0,23	53,45	-0,0027	-14,48	19,01	37,73
<b>A: Ingrediente</b>	2,40 *	0,91 *	-0,0019 *	96,86 *	10,01 *	-2,48
<b>B: SS</b>	0,09	3,39 *	0,00064 *	6,03 *	-1,28	2,15 *
<b>AA</b>	2,53 *	-4,24	-0,0013	-38,44	-0,60	-1,45
<b>AB</b>	-0,59 *	0,84	0,00046	-1,71	0,29	0,32
<b>BB</b>	0,012	-0,097	-0,000028 *	-0,13	0,048	-0,066
<b>R<sup>2</sup></b>	98,7	95,7	94,5	97,0	99,6	97,6
<b>R<sup>2</sup><sub>aj</sub></b>	96,6	91,4	88,9	93,4	99,01	95,2
<b>Falta de ajuste</b>	0,21	0,10	0,15	0,47	0,07	0,80
<b>DW</b>	2,63	2,34	1,82	1,69	1,62	1,94

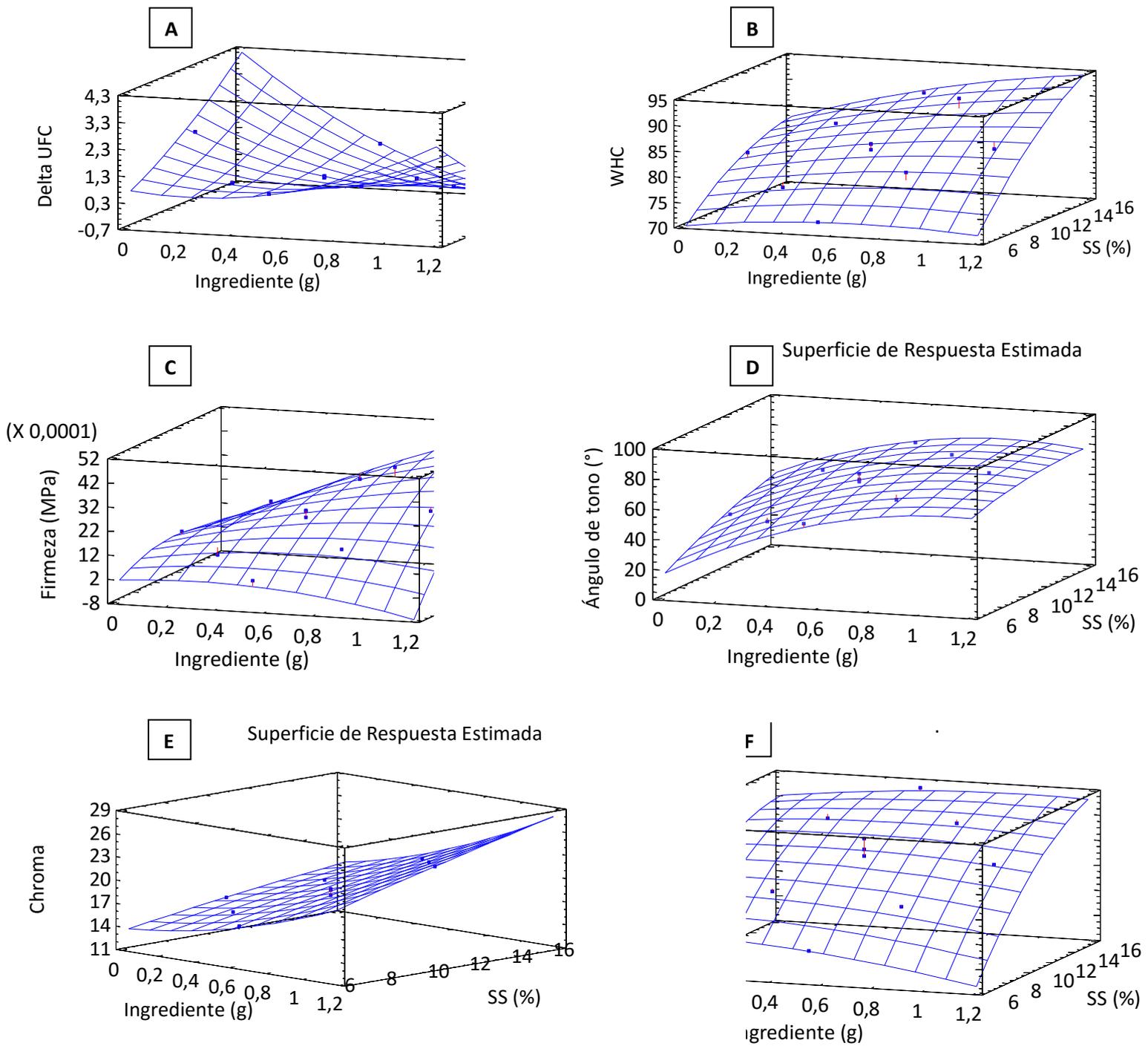
\* Diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) con un nivel de significancia del 95%. Ingrediente: expresado en gramos. SS: sólidos solubles de la leche de soja expresados en porcentaje. A, B: términos lineales. AA, BB: términos cuadráticos. AB: término interacción. R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación (%). R<sup>2</sup><sub>aj</sub>: coeficiente de determinación ajustado (%). Falta de ajuste ( $p \geq 0,05$ ). DW: estadístico de Durbin-Watson.  $\Delta$ UFC: incremento en la viabilidad del *L. casei*. WHC: capacidad de retención de agua.

Como se resume en la **Tabla IV.2**, el incremento en la viabilidad de *L. casei* ( $\Delta$ UFC) fue afectado negativamente ( $p \leq 0,05$ ) por el término lineal del ingrediente. Mientras que, el término cuadrático del mismo fue positivo y significativo ( $p \leq 0,05$ ), lo cual significa que la función tiene un valor mínimo. El coeficiente del término interacción entre las variables independientes, resultó ser antagónico y significativo ( $p \leq 0,05$ ). La **Figura IV.5 A** ilustra el efecto de la concentración del ingrediente y del %SS sobre la variable de respuesta  $\Delta$ UFC. Se puede observar que para el nivel más bajo de ingrediente, a medida que se incrementa el %SS se obtienen los mayores  $\Delta$ UFC, y esta tendencia se revierte a concentraciones altas del ingrediente. Mayor concentración del ingrediente, representa mayor concentración de UFC iniciales, y consecuentemente menor  $\Delta$ UFC. Por otro lado, en estas condiciones el incremento del %SS, reduciría el pH del medio afectando negativamente el crecimiento del probiótico. En cambio, cuando se parte de bajas concentraciones iniciales de ingrediente, los SS podrían ser utilizados como fuente de carbono y energía para incrementar la biomasa, y ello explicaría la interacción antagónica entre el ingrediente y el %SS.

La sinéresis se conoce como la expulsión de agua de la red de gel, y se percibe visualmente como agua superficial, afectando la aceptabilidad en consumidores. La capacidad de retención de agua (WHC) es una herramienta útil para describir la habilidad de una matriz alimenticia de retener el agua libre cuando se aplica una fuerza exterior (Granato, Bigaski Ribeiro, et al., 2010). Los sistemas del diseño experimental presentaron valores de WHC entre  $72,3 \pm 2,3$  y  $91 \pm 1\%$ , demostrando que más del 70% del agua estuvo retenida en la red tridimensional de gel del postre (**Tabla IV.1**). Se puede observar que la WHC fue afectada positivamente ( $p \leq 0,05$ ) por los términos lineales del ingrediente y el %SS, siendo esta última variable independiente la de mayor efecto en el diagrama de Pareto (dato no mostrado). Por lo tanto, se espera que la presencia de SS ejerza el mayor efecto sobre la WHC en la formulación del postre. En la **Figura IV.5 B** se muestra el efecto de las variables independientes sobre la estabilidad física del postre, dónde se puede observar que a medida que se incrementa el ingrediente y el %SS aumenta la WHC. Por ejemplo, el sistema 4 del diseño con el nivel central de ingrediente y el menor nivel de SS, presentó el valor más bajo ( $p \leq 0,05$ ) de WHC, y se percibió visualmente la formación de un gel más débil, quebradizo y la presencia de agua superficial. Mientras que el sistema 7, con el nivel central del ingrediente y el mayor nivel de SS, mostró uno de los valores más alto ( $p \leq 0,05$ ) de WHC, y una apariencia más homogénea sin la presencia visible de sinéresis (**Figura IV.6**). El aumento de la concentración de SS en el postre estaría asociado, en parte, a un incremento en el contenido proteico, lo cual directamente favorecería la formación del gel (Ferragut et al., 2009). Cabe destacar que, la estructura del gel se conforma en dos momentos. Primero durante la fermentación principalmente por interacciones hidrofóbicas, y luego durante las primeras horas a temperatura de refrigeración por el incremento de interacciones de las proteínas de la interface aceite-agua que promueven el desarrollo de la red tridimensional de gel, y eventualmente, retrasan el proceso de desestabilización y coalescencia durante el almacenamiento (Ferragut et al., 2009; Granato, Bigaski Ribeiro, et al., 2010).

En alimentos fermentados como por ejemplo el yogur, la firmeza está directamente relacionada con el contenido total de sólidos y de proteínas. Un incremento en el contenido proteico favorece el grado de entrecruzamiento entre las proteínas, dando como resultado un gel de estructura más denso y rígido (Mishra Pandey & Mishra, 2015). En el postre a base de leche de soja se observó que los términos lineales de ingrediente y %SS afectaron positivamente ( $p \leq 0,05$ ) la firmeza del postre (**Tabla IV.2**). En la **Figura IV.5 C** se puede observar que el mayor valor de firmeza se obtiene con el mayor nivel de ingrediente y %SS. Sin embargo, el coeficiente del término cuadrático del %SS ejerció un efecto negativo ( $p \leq 0,05$ ) sobre la firmeza de los postres resultantes, lo que significa que existe un %SS que tendrá el máximo valor de firmeza, dentro del rango ensayado. Si bien, el incremento en los SS está directamente asociado a un incremento

en el aporte proteico, se observó una mayor firmeza del postre en los niveles centrales del factor SS, posiblemente porque existe un límite de sólidos y proteínas que pueden interaccionar en la red de gel (**Tabla IV.1**). Es interesante resaltar que el mismo efecto se observó en el término cuadrático del ingrediente, sin embargo, en este caso el efecto fue no significativo ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura IV.5.** Superficies de respuesta para la estimación de la retención de agua, **C)** Firmeza, **D)** Ángulo de tono, **E)** Chroma, y **F)** Luminosidad.

Los resultados obtenidos para las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$ , el ángulo de tono, el chroma y la luminosidad se detallan en la **Tabla IV.3**.

**Tabla IV.3.** Matriz del diseño experimental con las variables independientes y variables respuestas de color para la optimización de la formulación del postre a base de leche de soja.

Sistemas	Sólidos solubles <sup>1</sup>			Ingrediente <sup>2</sup>	Variables respuestas de color				
					$a^*$	$b^*$	Ángulo de tono <sup>3</sup>	Chroma	$L^*$ <sup>4</sup>
*1	0	11	0	0,5425	7,5±0,6 <sup>f</sup>	17,0±0,9 <sup>e</sup>	66±3 <sup>ab</sup>	18,6±0,5 <sup>e</sup>	53±1 <sup>c</sup>
2	-1	8,5	1	0,7969	9,18±0,01 <sup>g</sup>	19,84±0,04 <sup>h</sup>	65,21±0,05 <sup>b</sup>	21,85±0,03 <sup>h</sup>	50,3±0,3 <sup>b</sup>
3	-1	8,5	-1	0,2889	10,9±0,1 <sup>h</sup>	11,29±0,02 <sup>b</sup>	45,8 ±0,4 <sup>e</sup>	15,75±0,08 <sup>c</sup>	50,92±0,06 <sup>b</sup>
4	-2	6	0	0,5425	11,29±0,04 <sup>h</sup>	16,24±0,08 <sup>d</sup>	55,2±0,227 <sup>d</sup>	19,78±0,05 <sup>g</sup>	47,57±0,08 <sup>a</sup>
5	1	13,5	-1	0,2880	6,7±0,2 <sup>e</sup>	13,1±0,3 <sup>c</sup>	63±1 <sup>c</sup>	14,7±0,2 <sup>b</sup>	54,71±0,06 <sup>d</sup>
6	0	11	-2	0,0357	9,12±0,04 <sup>g</sup>	7,50±0,02 <sup>a</sup>	39,4±0,05 <sup>f</sup>	11,80±0,05 <sup>a</sup>	53,57±0,03 <sup>c</sup>
7	2	16	0	0,5433	4,9±0,2 <sup>b</sup>	18,5±0,2 <sup>g</sup>	75,2±0,7 <sup>g</sup>	19,1±0,1 <sup>f</sup>	56,4±0,4 <sup>e</sup>
*8	0	11	0	0,5425	5,77±0,04 <sup>d</sup>	17,5±0,1 <sup>f</sup>	68±1 <sup>a</sup>	18,4±0,1 <sup>e</sup>	54,4±0,3 <sup>d</sup>
9	1	13,5	1	0,7965	4,5±0,2 <sup>a</sup>	21,4±0,2 <sup>i</sup>	78,1±0,4 <sup>h</sup>	21,8±0,3 <sup>h</sup>	55,0±0,4 <sup>d</sup>
*10	0	11	0	0,5425	6,7±0,1 <sup>e</sup>	16,40±0,01 <sup>d</sup>	67,8±0,4 <sup>a</sup>	17,72±0,05 <sup>d</sup>	53,58±0,06 <sup>c</sup>
11	0	11	2	1,0503	5,3±0,2 <sup>c</sup>	23,8±0,6 <sup>j</sup>	77,4±0,7 <sup>h</sup>	24,4±0,5 <sup>i</sup>	53,0±0,1 <sup>c</sup>

\* Sistemas centrales del diseño experimental. <sup>1</sup> Sólidos solubles expresados en porcentaje de grados Brix (° B). <sup>2</sup> Cantidades del ingrediente en gramos agregadas a 35 mL de leche de soja. <sup>3</sup> Ángulo de tono (°). <sup>4</sup> Luminosidad ( $L^*$ ).

El ángulo de tono es considerado un atributo cualitativo del color y se utiliza para definir la diferencia de un color con referencia a un color gris con la misma luminosidad. Este atributo de color está relacionado con las diferencias en la absorbancia a diferentes longitudes de onda, lo que se traduce que un ángulo de tono de 0° representa un carácter de color rojo, mientras que un ángulo de tono 90° representa un carácter de color amarillo (Pathare, Opara, & Al-Said, 2013).

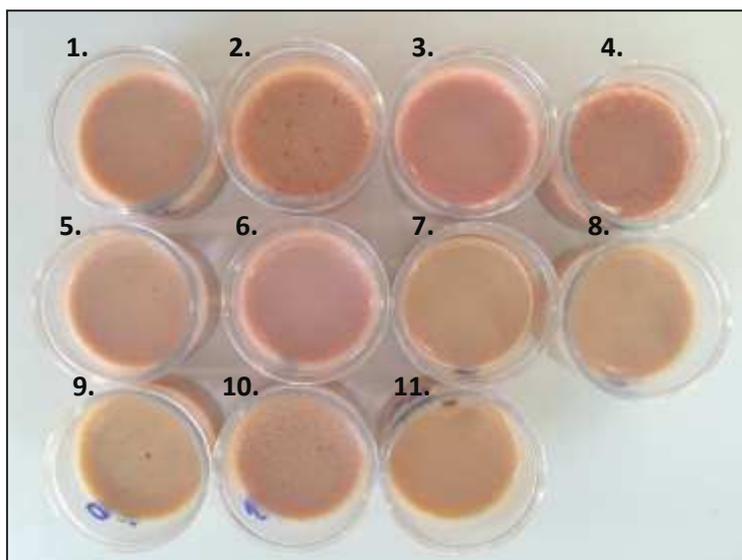
En el presente trabajo, se pudo observar que tanto el término lineal del ingrediente como del %SS afectaron positivamente ( $p \leq 0,05$ ) el ángulo de tono, siendo el ingrediente el que mayor efecto ejerció sobre este parámetro. Como se observa en la **Figura IV.5 D**, a medida que se incrementa el contenido del ingrediente incrementa el ángulo de tono, y esto se traduce como un aumento en el tono amarillo (90°), mientras que los niveles más bajos del ingrediente presentan un ángulo de tono menor, asociado a la tonalidad roja (45°).

En consecuencia con estos resultados, se observó una correlación negativa entre la coordenada  $a^*$  y el ángulo de tono (coeficiente de correlación de Pearson: -0,84;  $p = 0,0023$ ), lo cual confirma la premisa anteriormente expuesta. Por ejemplo, el sistema 6 del diseño con el menor nivel del ingrediente fue el que menor ( $p \leq 0,05$ ) valor de ángulo de tono presentó, y visualmente fue la muestra con tonalidad más rosada y visualmente más atractiva (**Figura IV.6**). Mientras que, los sistemas 9 y 11 fueron los que mayor ( $p \leq 0,05$ ) valor de ángulo de tono presentaron, coincidiendo con las concentraciones más altas de ingrediente estudiadas (**Tabla IV.3**).

La cromaticidad (Chr), que expresa la saturación del color, fue afectada positivamente ( $p \leq 0,05$ ) por el término lineal del ingrediente. En la **Figura IV.5 D** se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de ingrediente se intensifica el color del postre. El aumento en el valor de Chr está asociado al incremento en el color amarillo, y este hecho, se confirma por la correlación significativa y positiva entre la coordenada  $b^*$  y Chr (coeficiente de correlación de Pearson: 0,97;  $p = 0,001$ ). Por ejemplo, el mayor ( $p \leq 0,05$ ) valor de Chr se observó en el sistema 11 del diseño experimental, y visualmente fue la muestra que presentó un color más naranja (**Tabla IV.3, Figura IV.6**).

En cuanto a la luminosidad ( $L^*$ ), este parámetro fue afectado positivamente ( $p \leq 0,05$ ) por el %SS. Como se observa en la superficie de respuesta (**Figura IV.5 E**), en general, cuando incrementa el %SS incrementa el valor de la  $L^*$  en el postre resultante. Por ejemplo, el sistema 4 del diseño con el menor nivel de SS (6 °Brix) presentó el menor ( $p \leq 0,05$ ) valor de  $L^*$ , y en consecuencia, mayor valor de  $a^*$ . Mientras que, el sistema 7 con el mayor nivel de SS (16 °Brix) presentó el valor más alto ( $p \leq 0,05$ ) de  $L^*$  y menor valor de  $a^*$  (**Tabla IV.3**). El postre 7 se visualizó como un postre más luminoso pero de menor tonalidad roja, mientras que el postre 4 presentó una tonalidad roja más intensa y visualmente más atractiva (**Figura IV.6**).

Los valores obtenidos para las variables respuestas de los puntos centrales del diseño experimental, en general, no presentaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, se observó una leve pero significativa ( $p \leq 0,05$ ) diferencia en los valores de las respuestas del color. Estas diferencias no afectaron las bondades del ajuste y, en consecuencia, el análisis del diseño de la MSR (Granato, Bigaski Ribeiro, et al., 2010) (**Tabla IV.3**).



**Figura IV.6.** Imagen de los sistemas del diseño experimental para la formulación del postre a base de leche de soja.

El modelo polinomial de 2<sup>do</sup> grado ajustado a las variables  $\Delta$ UFC, WHC, firmeza, ángulo de tono, chroma y  $L^*$ , presentaron  $R^2 > 93\%$  y  $R^2_{aj} > 86\%$ . La prueba de falta de ajuste presentó p valores  $\geq 0,05$  y el estadístico DW valores  $> 1$ , confirmando la ausencia de autocorrelación serial en los residuos. Todo ello, demuestra que los modelos propuestos son adecuados para describir la variabilidad de las respuestas estudiadas y, por lo tanto, obtener ecuaciones de predicción en el rango del diseño experimental (**Tabla IV.2**). En general, los signos de los coeficientes coincidieron con los de los efectos observados en el Diagrama de Pareto (dato no mostrado).

### **3.2. Optimización de la formulación para la elaboración del postre a base de leche de soja**

Una vez que se corroboró la similitud entre los valores predichos a partir del modelo polinomial de 2<sup>do</sup> grado y los valores experimentalmente obtenidos en el diseño experimental, se procedió a realizar la optimización de varias respuestas en simultáneo a través de la función deseabilidad. Para ello, se optimizaron las variables dependientes: firmeza, WHC y coordenada  $a^*$  del color, obteniendo un valor de deseabilidad de 0,7.

La combinación óptima del ingrediente y %SS para formular un postre a base de leche de soja que permitiera maximizar las variables respuestas fueron: leche de soja con una concentración de sólidos solubles de 12,5 °Brix y una concentración del ingrediente de 0,1 % (p/v). Estos valores obtenidos fueron similares a las concentraciones utilizadas en el sistema 6 del diseño experimental.

A partir de la nueva formulación obtenida, se preparó un nuevo lote de postre con el objetivo de verificar los resultados obtenidos experimentales con los valores predichos a partir de las ecuaciones de predicción. La nueva formulación propuesta presentó una firmeza de  $0,00118 \pm 0,00006$  MPa, coincidiendo con el valor predicho en la ecuación de predicción ( $0,001012$  MPa). Mientras que, los valores de la WHC y la coordenada  $a^*$  fueron inferiores a los obtenidos en el ajuste al modelo, mostrando valores experimentales de  $73,1 \pm 0,4\%$  y  $2,41 \pm 0,4$ , respectivamente. Los valores de WHC y  $a^*$  predichos por las ecuaciones de predicción fueron  $81,3\%$  y  $8,47$ , respectivamente. Esta diferencia entre los valores predichos y los experimentales se podría explicar por un lado, a que se utilizó un nuevo lote de semillas de soja para la elaboración del postre, y por otro lado, al proceso de escalado durante la elaboración del postre. En esta ocasión, se partieron de 500 mL de leche de soja en lugar de 35 mL, lo cual pudo haber ejercido un efecto significativo sobre los parámetros de retención de agua en la estructura del gel y el color final del producto resultante.

Asimismo, se decidió estudiar una segunda formulación de postre utilizando la concentración de sólidos solubles de la leche de soja recién extraída ( $7^\circ$  Brix) a los efectos de eliminar una operación unitaria de evaporación para la concentración de la leche de soja, y obtener un proceso de elaboración en términos operativos y económicos más simple y rentable. Para ello, se estudió la formulación del postre partiendo de una concentración de sólidos solubles de  $7^\circ$  Brix en leche de soja y un porcentaje de ingrediente de 1,25%.

### **3.3. Caracterización físico-química y nutricional del postre a base de leche de soja**

En este apartado se detallarán las características nutricionales de viabilidad y funcionalidad del *L. casei*, el contenido de ácido fítico, rafinosa y estaquiosa en las dos formulaciones de postre propuestas: Postre A [Leche de soja con %SS  $7,0^\circ$  Brix e ingrediente 1,25% (p/v)] y Postre B [Leche de soja con %SS  $12,5^\circ$  Brix e ingrediente 0,1% (p/v)].

Al finalizar el proceso de fermentación, el pH y la acidez titulable fueron de  $4,36 \pm 0,01$  y  $0,63 \pm 0,08$  g de ácido láctico/100 mL en el postre A. Mientras que, el postre B presentó un pH y acidez titulable de  $4,73 \pm 0,04$  y  $0,71 \pm 0,05$  g de ácido láctico/100 mL. El descenso del pH respecto del valor inicial en la leche de soja (pH  $6,1 \pm 0,3$ ) se debe a la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de los carbohidratos presentes en la leche de soja por parte de los microorganismos probióticos (Bedani et al., 2014). La reducción del pH produjo un gel estable, donde el  $56 \pm 3\%$  y  $72 \pm 2\%$  del contenido acuoso estuvo retenido en la red tridimensional de gel del postre A y B, respectivamente.

La carga inicial del *L. casei* en la formulación aportada a través del ingrediente fue de 6,3 y 5,2 Log (UFC/mL) en el postre A y B, respectivamente. Luego del proceso de fermentación, el

recuento viable de células probióticas fue de  $11,0 \pm 0,5$  log (UFC/mL) en el postre A y de  $9,54 \pm 0,09$  log (UFC/mL) en el postre B. La viabilidad del *L. casei* no mostró cambios significativos ( $p \geq 0,05$ ) durante el almacenamiento, presentando un recuento de células viable de  $10,7 \pm 0,06$  y  $9,2 \pm 0,2$  log (UFC/mL) después de 21 días de almacenamiento a 8 °C en el postre A y B, respectivamente. Autores como İçier, Gündüz, Yilmaz, & Memeli (2015) reportaron un recuento viable entre 8,9-9,1 log (UFC/g) de *Lactobacillus acidophilus* en leche de soja con y con la adición de jugo de manzana (15-25 %) luego de 21 días de almacenamiento a 4 °C, sugiriendo la potencial utilización de esta matriz para el crecimiento y soporte del probiótico.

Tanto el recuento inicial como final estuvieron por encima del valor mínimo de células probióticas viables ( $>10^6$  UFC/mL) que debe contener un alimento para ser considerado probiótico al momento de su consumo de acuerdo al C.A.A. (ANMAT, 2011) y entidades regulatorias internacionales (EFSA, FDA).

En cuanto a la funcionalidad del *L. casei*, este parámetro se corroboró a través del ensayo de resistencia del probiótico a las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal *in vitro*. Los resultados mostraron que a tiempo inicial no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el porcentaje de supervivencia del probiótico a las condiciones de digestión gastrointestinal en el postre A y B, siendo este valor del  $85 \pm 7\%$  y  $78 \pm 6\%$ , respectivamente. Mientras que, después de 21 días de almacenamiento a 8 °C, se observó que el porcentaje de supervivencia del *L. casei* fue superior en el postre B ( $86 \pm 6\%$ ) respecto de A ( $66 \pm 6\%$ ). En el caso de la formulación A, se partió de una concentración de microorganismos probióticos superior (1,25% de ingrediente  $\equiv 10^6$  UFC/mL postre), que en igualdad de condiciones de fermentación se encontraron en una etapa de crecimiento estacionaria respecto a los de la formulación B (0,1 gramos de ingrediente  $\equiv 10^5$  UFC/mL postre). Esto se evidencia en parte con el mayor pH ( $p \leq 0,05$ ) que mostró el producto B luego del mismo tiempo de fermentación, y que podría explicar la mayor resistencia de los probióticos a las condiciones de digestión simuladas, que se encontrarían en una etapa de crecimiento exponencial (Doran, 2008). A pesar de esta diferencia observada, se puede inferir que ambas formulaciones propuestas presentaron un porcentaje significativo de células de *L. casei* ( $>1,7 \times 10^7$  UFC/mL postre) al final de la digestión gastrointestinal *in vitro*. En línea con estos resultados, Wang et al. (2009) han reportado una supervivencia del *Lactobacillus casei* Zhang, a las condiciones gástricas entre el 50% y el 60% en leche de soja fermentada. En el caso de las formulaciones A y B, fermentadas con el ingrediente funcional, ambas superaron los porcentajes de tolerancia a las condiciones gastrointestinales simuladas que hasta el momento se han reportado en bibliografía para este tipo de productos.

La caracterización nutricional a través del contenido de ácido fítico, rafinosa y estaquiosa, se determinó en la leche de soja cruda (sin tratamiento térmico) y en los sistemas fermentados con el ingrediente (postre A y B), tanto al inicio como al final del almacenamiento. En la **Tabla IV.4** se detalla el contenido de ácido fítico, rafinosa y estaquiosa en las formulaciones estudiadas.

**Tabla IV.4.** Contenido de ácido fítico, rafinosa y estaquiosa en la leche de soja y en los postres a base de leche de soja.

Sistemas	Ácido fítico <sup>1</sup>		Rafinosa <sup>2</sup>		Estaquiosa <sup>3</sup>	
	Día 1	Día 21	Día 1	Día 21	Día 1	Día 21
Leche de soja	0,92 ± 0,03 <sup>a</sup>	ND	7,80 ± 0,02 <sup>e</sup>	ND	21,15 ± 0,2 <sup>i</sup>	ND
Postre A	0,31 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,149 ± 0,007 <sup>d</sup>	4,92 ± 0,3 <sup>f</sup>	3,90 ± 0,01 <sup>g</sup>	14,8 ± 0,7 <sup>j</sup>	8,1 ± 0,2 <sup>k</sup>
Postre B	0,45 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,195 ± 0,005 <sup>d</sup>	6,0 ± 0,2 <sup>h</sup>	6,2 ± 0,2 <sup>h</sup>	24 ± 3 <sup>i</sup>	14,08 ± 0,04 <sup>j</sup>

Postre A: leche de soja con 7% (°B) de sólidos solubles y 1,25% (p/v) de ingrediente. Postre B: leche de soja con 12,5% (°B) de sólidos solubles y 0,1% (p/v) de ingrediente.

<sup>1,2,3</sup> valores expresados como mg/g muestra (base seca). Valores promedios ± DE (n = 4). Letras diferentes indican diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre sistemas. ND: no determinado.

El mio-inositol hexafosfato o ácido fítico (AF) se encuentra presente en las semillas de soja y en los productos derivados tales como la leche de soja. Su cuantificación en el producto final resulta de interés desde un punto de vista nutricional dado que el AF forma complejos con proteínas e iones metales, especialmente hierro, zinc, magnesio y calcio, reduciendo su absorción en el intestino (Tang et al., 2010).

El contenido de AF en términos de valores absolutos reportado en bibliografía es muy variado, y diversos factores tales como la preparación de la leche de soja, tiempo de ebullición, autoclavado, proceso de fermentación y método de extracción, pueden afectar el contenido final del AF y dificultar la comparación entre distintas referencias bibliográficas (Al-Wahsh, Horner, Palmer, Reddy, & Massey, 2005; Schlemmer, Frolich, Prieto, & Grases, 2009; Wu, Tian, Walker, & Wang, 2009).

Como se observa en la **Tabla IV.4**, el contenido de AF se redujo significativamente (p ≤ 0,05) después del proceso de fermentación tanto en el postre A como en B respecto del contenido inicial en la leche de soja; sin embargo, este porcentaje fue superior (p ≤ 0,05) en la formulación A (66±2%) comparado con la formulación B (51±6%).

Después de 21 días de almacenamiento a 8 °C, los dos sistemas presentaron un descenso significativo (p ≤ 0,05) del AF, presentando una reducción total respecto del contenido en la leche de soja del 83,6±0,6% y 78,8±0,5% en el postre A y B, respectivamente. Es interesante resaltar, que la formulación A presentó una mayor degradación del AF respecto de la

formulación B, lo cual podría explicarse por la mayor concentración de ingrediente utilizado en esta formulación, y por ende, de células probióticas.

La reducción del AF observada tanto en la leche de soja fermentada como durante el almacenamiento se podría deberse probablemente por la presencia de fitasas en el *Lactobacillus casei* inmovilizado en la matriz de calabaza. En un estudio llevado a cabo por Tang et al. (2010) se comprobó la presencia de fitasa en *Lactobacillus casei* ASCC290 en un medio nutritivo MRS, observándose una aceleración de la actividad enzimática en medio ácido (pH 5,0).

La presencia de oligosacáridos no digeribles, tales como la rafinosa y estaquiosa, está asociada a la disconformidad abdominal en quienes consumen productos a base de soja. Sin embargo, la presencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa presente en bacterias ácido lácticas podría hidrolizar estos compuestos previniendo el efecto de distensión abdominal sin eliminar el efecto probiótico (Gänzle & Follador, 2012). Autores como LeBlanc et al. (2004) han reportado que la actividad enzimática de la  $\alpha$ -galactosidasa en *Lactobacillus plantarum* en leche de soja podría favorecerse con el proceso de fermentación debido a la reducción del pH del medio. No obstante, autores como Donkor et al. (2007) han reportado que el grado de hidrólisis de los  $\alpha$ -GOS es dependiente de la cepa utilizada y de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -galactosidasa.

En el presente trabajo se pudo observar que el contenido de rafinosa se redujo significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en el postre A un  $37 \pm 4\%$ , y en el postre B un  $24 \pm 3\%$  respecto del contenido inicial en la leche de soja cruda después del proceso de fermentación (**Tabla IV.4**). Incluso, después de 21 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración, el contenido de rafinosa se redujo un  $20,7 \pm 0,1\%$  en el postre A respecto del primer día de almacenamiento. Mientras que en el postre B, no se observaron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el contenido de rafinosa luego de la etapa de fermentación y durante el almacenamiento.

Con respecto a la estaquiosa, luego del proceso de fermentación el contenido de este oligosacárido se redujo ( $p \leq 0,05$ ) en el postre A ( $33 \pm 3\%$ ); mientras que en el postre B, no se observaron diferencias ( $p \geq 0,05$ ) luego de la fermentación, aunque si una reducción significativa durante el almacenamiento. El contenido de estaquiosa se redujo ( $p \leq 0,05$ ) en ambos postres al final del almacenamiento, presentando una reducción porcentual durante el almacenamiento del  $43 \pm 1$  y  $47,1 \pm 0,2$  en el postre A y B, respectivamente.

En línea con los resultados reportados en el presente trabajo, autores como Wang, Yu, Yang, & Chou (2003) han reportaron que el contenido inicial en leche de soja de rafinosa y estaquiosa se redujo después de la fermentación con *Lactobacillus acidophilus* un  $11,3-19,0$  y  $35,6-40,2$  %, respectivamente. Mientras que, autores como Yoon & Hwang, (2008) han observado una mayor tasa de consumo de estaquiosa respecto de rafinosa durante el proceso de fermentación de

leche de soja con *Lactobacillus curvatus*. Es interesante resaltar, que hasta el momento no se han encontrado reportes en bibliografía que hagan referencia a la reducción de estos oligosacáridos durante el almacenamiento.

#### **3.4. Propiedades reológicas y texturales del postre a base de leche de soja**

La textura es un grupo de propiedades físicas obtenidas de la estructura del alimento y de la forma en que sus ingredientes interactúan (Guggisberg et al., 2009).

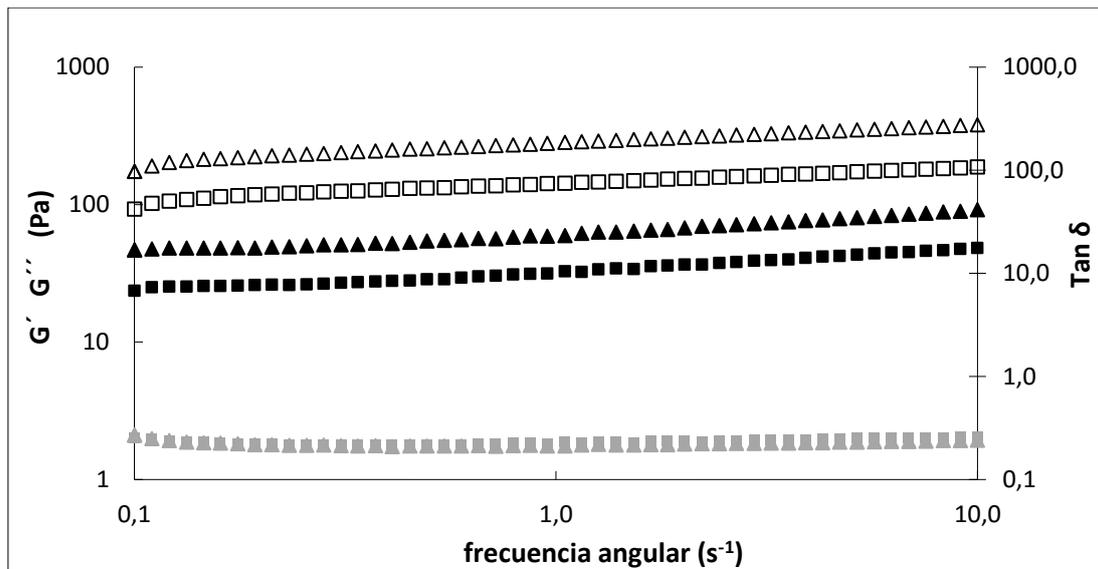
Para caracterizar la reología de la leche de soja fermentada con el ingrediente se utilizó el ensayo oscilatorio a pequeños esfuerzos en función del barrido de frecuencia. El módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) son considerados parámetros que describen el comportamiento elástico y viscoso del producto, respectivamente. La contribución relativa de cada uno de estos módulos a la viscoelasticidad de la estructura del gel es expresado como la tangente del ángulo de fase o tangente de pérdida ( $\tan \delta$ ), que expresa los efectos del comportamiento viscoso y elástico en función de la frecuencia angular (Rao, 2007).

El espectro mecánico del postre A y B se representan en la **Figura IV.7**, dónde se puede observar en ambos sistemas que el  $G'$  fue superior  $G''$ , lo cual denota que el producto resultante presentó un gel de carácter más sólido (elástico) que líquido (viscoso). Es de interés resaltar, que este comportamiento fue similar al de un yogur convencional según los resultados reportados por Guggisberg, Piccinali, & Schreier (2011) y Kristo, Biliaderis, & Tzanetakis (2003).

Tanto el módulo  $G'$  como el de  $G''$  presentaron valores superiores en el postre B respecto de A, posiblemente más asociado al efecto del contenido de sólidos solubles de la leche de soja que a la contribución del ingrediente.

La  $\tan \delta$  es una buena herramienta para describir las propiedades viscoelásticas del entrecruzamiento en la red de gel ya que relaciona la contribución del componente elástico y viscoso. En el postre a base de soja, se observó un valor de  $G'$  superior al de  $G''$ , y consecuentemente, el valor de  $\tan \delta$  fue bajo, describiendo un gel más sólido y firme en los dos sistemas estudiados (Kristo et al., 2003). Estos resultados fueron similares a los reportados por Donkor, Henriksson, Vasiljevic, & Shah (2007) y Ferragut et al. (2009), quienes evaluaron el espectro mecánico de yogur de soja tratado térmicamente y suplementado con fibra, respectivamente.

Tanto en el de  $G'$  como en el de  $G''$ , se evidenció una leve dependencia con la frecuencia angular, observándose un incremento en los valores de ambos parámetros a medida que se incrementó la frecuencia.

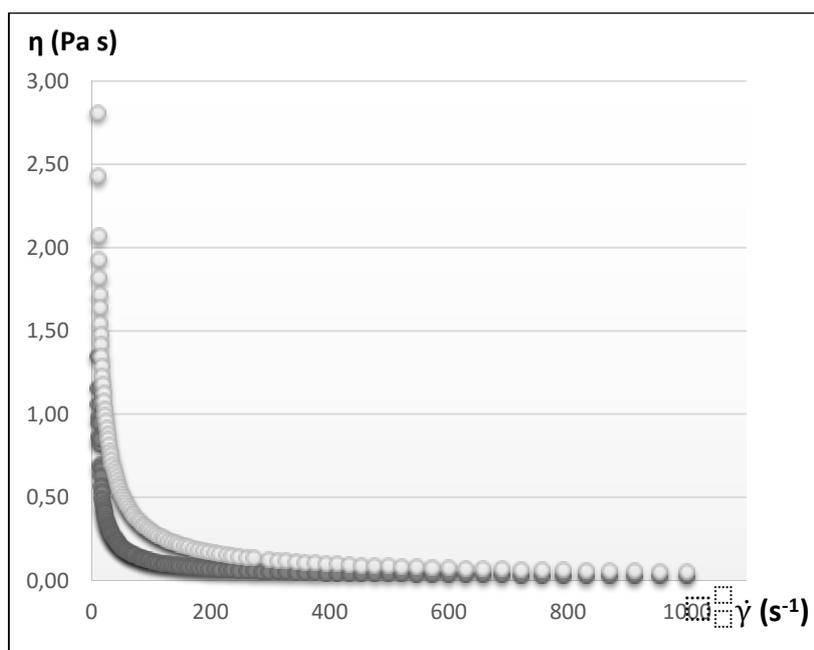


**Figura IV.7.** Barrido de frecuencia del postre a base de leche de soja almacenado a 8 °C.

Los símbolos  $\Delta$  y  $\square$  representan el módulo de almacenamiento,  $\blacktriangle$  y  $\blacksquare$  el módulo de pérdida, y el  $\triangle$  y  $\square$  la tangente del ángulo de fase. El postre A y B están representados por los símbolos cuadrados y los triángulos, respectivamente.

Postre A: leche de soja con 7% (°B) de sólidos solubles y 1,25% (p/v) de ingrediente. Postre B: leche de soja con 12,5% (°B) de sólidos solubles y 0,1% (p/v) de ingrediente.

Los cambios en la viscosidad aparente ( $\eta$ ) del postre a base de leche de soja en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) se pueden observar en la **Figura IV.8**. En la gráfica se observa que la  $\eta$  de los postres disminuye a medida que se incrementa la velocidad de deformación, demostrando que el producto presenta un comportamiento de tipo no newtoniano, es decir que existe una relación de dependencia entre el esfuerzo tangencial y la velocidad de deformación. El valor inicial de  $\eta$  fue inferior en el postre A comparado con el postre B, presentando valores de 1,3 y 2,81 Pa s, respectivamente. Esta diferencia se podría atribuir al mayor porcentaje de sólidos solubles (12,5%) en la leche de soja en la formulación del postre B.



**Figura IV.8.** Cambios de la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación en las distintas formulaciones del postre a base de leche de soja.

Los símbolos ● y ○ representan el postre A y B, respectivamente. Postre A: leche de soja con 7% (°B) de sólidos solubles y 1,25% (p/v) de ingrediente. Postre B: leche de soja con 12,5% (°B) de sólidos solubles y 0,1% (p/v) de ingrediente.

Para describir el comportamiento reológico del postre a base de leche de soja, los valores experimentales del esfuerzo tangencial ( $\tau$ ) en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) se ajustaron al modelo de Herschel-Bulkley. En la **Tabla IV.5** se detallan los parámetros y constantes reológicas de modelo de ajuste de regresión no lineal.

**Tabla IV.5.** Parámetros de ajuste del Modelo de Herschel-Bulkley para la formulación de postre.

Sistemas	Modelo de Herschel-Bulkley				
	$\tau_0$ (Pa)	K (Pa s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	DW
<b>A</b>	6,45±0,09 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>c</sup>	0,650±0,009 <sup>e</sup>	99,9	1,10
<b>B</b>	15,8±0,2 <sup>b</sup>	1,35±0,05 <sup>d</sup>	0,488±0,005 <sup>f</sup>	99,9	0,57

Modelo de Herschel-Bulkley:  $\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n$ .  $\tau_0$ : umbral de fluencia. K: coeficiente de consistencia. n: índice de comportamiento de flujo. R<sup>2</sup><sub>aj</sub>: coeficiente de determinación ajustado (%). Postre A: leche de soja con 7% (°B) de sólidos solubles y 1,25% (p/v) de PC con *L. casei*. Postre B: leche de soja con 12,5% (°B) de sólidos solubles y 0,1% (p/v) de PC con *L. casei*.

Valor promedio ± DE (n = 2). Letras diferentes denotan diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre sistemas.

La bondad de ajuste al modelo de Herschel-Bulkley en ambas formulaciones estudiadas mostró  $R^2_{aj} > 99,9\%$ . El índice de comportamiento de flujo ( $n$ ) presentó valores leve pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) diferentes entre las formulaciones estudiadas, lo que indicaría que la comparación de los coeficientes entre ambos sistemas no es del todo correcta. Tanto la formulación de postre A como de B presentaron un valor de  $n < 1$ , lo cual sugiere un comportamiento de fluido tipo pseudoplástico. Autores como İçier et al. (2015) han estudiado las propiedades reológicas de una bebida a base de leche de soja fermentada y adicionada con jugo de manzana, reportando valores de coeficiente de consistencia ( $1,20 \pm 0,22 \text{ Pa s}$ ) e índice de comportamiento de flujo ( $0,40 \pm 0,01$ ) en el mismo orden que los reportados en el presente trabajo.

Mientras que el umbral de fluencia, que se traduce como el esfuerzo requerido para impulsar la muestra, presentó valores entre 6-16 Pa en las formulaciones estudiadas (**Tabla IV.5**).

La textura del postre se caracterizó mediante un ensayo del Análisis del Perfil de Textura (TPA) con el objetivo de simular las condiciones de masticación en la boca a través de la compresión del postre a base de leche de soja en dos ciclos. En la **Tabla IV.6** se detallan los parámetros del TPA y en la **Figura IV.9** se muestran las curvas características de los postres estudiados.

La dureza es un parámetro mecánico de la textura que representa la fuerza máxima requerida para comprimir entre los molares un alimento sólido o entre la lengua y el paladar un alimento semisólido (ISO 5492, 2012). El valor de dureza del postre B duplicó el valor del postre A, es decir que se requirió de mayor ( $p \leq 0,05$ ) fuerza para lograr una determinada deformación en la formulación B comparado con A durante el primer ciclo de compresión (**Tabla IV.6**). Además, y consecuentemente con el mayor valor de dureza, en el postre B se observó la fractura del gel durante la primera compresión (**Figura IV.9**). La ausencia del parámetro de fracturabilidad en el postre A podría explicarse por el menor contenido de sólidos solubles.

La cohesividad es la extensión en que un alimento puede ser deformado antes de su ruptura, y depende de la fuerza de los enlaces internos que mantiene la estructura en el alimento (ISO 5492, 2012). Las formulaciones estudiadas mostraron que el parámetro de cohesividad fue leve pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menor en el postre B comparado con A. La formulación A contiene mayor proporción de ingrediente y menor concentración de °Brix, por lo que se infiere que el efecto observado podría deberse al aporte de la fibra contenida en el ingrediente.

El parámetro de adhesividad representa la fuerza requerida para retirar el alimento que se adhiere a la boca durante la masticación (ISO 5492, 2012). El valor del parámetro de adhesividad resultó ser 3 veces mayor ( $p \leq 0,05$ ) en el postre B respecto de A, lo cual se traduce que se requiere menor fuerza para remover el postre A adherido a la boca comparado con B (**Tabla**

**IV.6).** Este efecto se observa en la **Figura IV.9**, donde el área negativa del postre B es mayor respecto de A. De acuerdo a autores como Kumar & Mishra (2003), el contenido de proteínas tiene un efecto dominante sobre este parámetro. Esta premisa podría ayudar a explicar la diferencia observada en este parámetro entre las formulaciones ensayadas, considerando que la formulación del postre B se caracterizó por presentar un mayor porcentaje de sólidos solubles, y por ende de proteínas provenientes de la leche de soja.

Con respecto al parámetro gomosidad, se describe como la fuerza necesaria para desintegrar un alimento semisólido a un estado tal que facilite su ingesta (ISO 5492, 2012). El valor del parámetro de gomosidad en el postre B fue leve pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior al valor del postre A, lo cual se traduce que el postre A podría ser ligeramente más fácil de desintegrar para ser deglutido (**Tabla IV.6**).

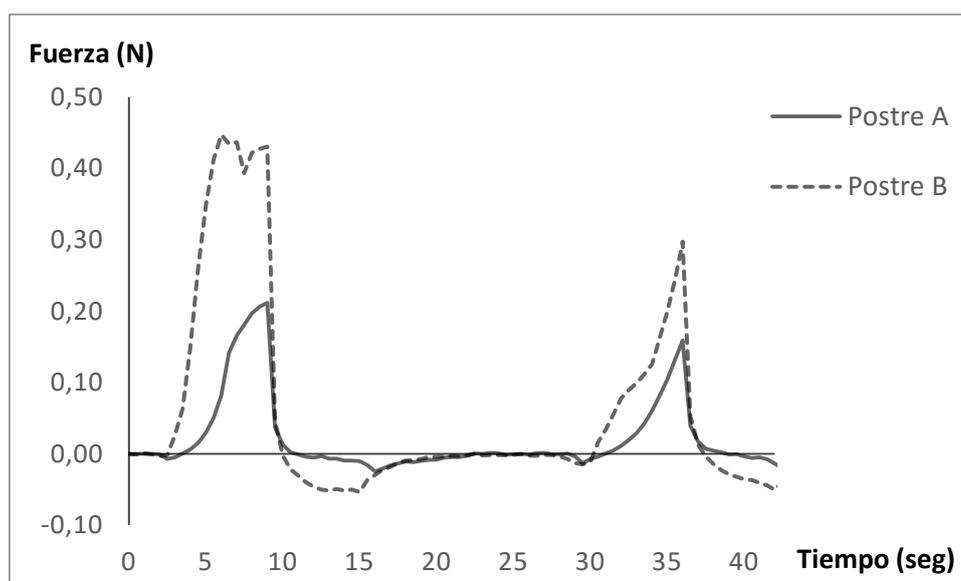
La capacidad que tiene una muestra deformada para recuperar su forma o longitud original después que se retirar la fuerza de deformación se denomina elasticidad (ISO 5492, 2012). El parámetro de elasticidad resultó ser significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior en el postre B respecto de A, lo que se traduce que la formulación B logró recuperar en mayor medida su forma original al retirar la fuerza durante el ensayo. Según autores como Yang & Li (2010), la microestructura del postre de soja se caracteriza por presentar un parámetro de extensibilidad similar al de un yogur tradicional, lo cual puede explicarse por las uniones puente disulfuro entre aminoácidos que resultan en un gel de característica firme pero frágil.

En referencia al parámetro masticabilidad, que describe la fuerza requerida para masticar un alimento sólido hasta que esté listo para ser tragado (ISO 5492, 2012), se observó que el valor del postre B fue el doble del observado en A. Se podría inferir, que se requiere de mayor fuerza para masticar y deglutir el postre B respecto de A.

**Tabla IV.6.** Parámetros del Perfil de Textura del postre a base de leche de soja.

Parámetros	Postre A	Postre B
<b>Fracturabilidad (N)</b>	NR	0,45 ± 0,02
<b>Dureza (N)</b>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>Cohesividad</b>	0,53 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>d</sup>
<b>Adhesividad (N seg)</b>	-0,097 ± 0,09 <sup>e</sup>	-0,30 ± 0,09 <sup>f</sup>
<b>Elasticidad</b>	0,94 ± 0,05 <sup>g</sup>	1,6 ± 0,4 <sup>h</sup>
<b>Gomosidad (N)</b>	0,112 ± 0,001 <sup>i</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>j</sup>
<b>Masticabilidad (N)</b>	0,105 ± 0,006 <sup>k</sup>	0,25 ± 0,05 <sup>l</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas. NR: no registrado. Postre A: leche de soja con 7% (°B) de sólidos solubles y 1,25% (p/v) de ingrediente. Postre B: leche de soja con 12,5% (°B) de sólidos solubles y 0,1% (p/v) de ingrediente.



**Figura IV.9.** Curvas características del ensayo de Análisis del Perfil de Textura de los postre a base de leche de soja.

### 3.5. Evaluación sensorial del postre a base de leche de soja

La evaluación sensorial se llevó a cabo mediante un Ensayo Afectivo con el objetivo de evaluar el grado de agrado/desagrado de los atributos sensoriales aceptabilidad global, color, aroma y cremosidad en la boca del yogur A y B utilizando una escala hedónica semi estructurada de 9 puntos. La escala hedónica asume que existe una preferencia en el consumidor y permite categorizar esa preferencia de acuerdo a las respuestas obtenidas (Lawless & Heymann, 2010). Para determinar la dirección de agrado/desagrado de los atributos color, aroma y cremosidad

en la boca se utilizó una escala de respuesta de intensidad. Por ejemplo, para el color se utilizó una escala semiestructurada con puntos extremos de claro (1) a oscuro (9), para aroma una escala con categorías de ninguno (1) a intenso (9), y para cremosidad en la boca categorías de suave (1) a grumoso (9) (Meilgaard, Civille & Carr, 2016).

**Tabla IV.7.** Puntuación y calificación obtenida en la aceptación sensorial de los postres a base de leche de soja fermentados con el ingrediente.

Atributos	Postre A		Postre B	
	Valor	Calificación	Valor	Calificación
Color	5 ± 2 <sup>a</sup>	Ni gusta ni disgusta	6 ± 2 <sup>b</sup>	Gusta ligeramente
Aroma	6 ± 2 <sup>c</sup>	Gusta ligeramente	6 ± 2 <sup>c</sup>	Gusta ligeramente
Cremosidad en la boca	6 ± 2 <sup>d</sup>	Gusta ligeramente	6 ± 2 <sup>d</sup>	Gusta ligeramente
Aceptabilidad global	5 ± 2 <sup>e</sup>	Ni gusta ni disgusta	6 ± 2 <sup>e</sup>	Gusta ligeramente

Postre A: leche de soja con 7% (°B) de sólidos solubles y 1,25% (p/v) de ingrediente. Postre B: leche de soja con 12,5% (°B) de sólidos solubles y 0,1% (p/v) de ingrediente.

Letras similares denotan ausencia de diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre muestras para un mismo atributo.

Del total de voluntarios que participaron de la evaluación sensorial ( $n = 62$ ), el 75,8% correspondió a mujeres y el 24,2% a hombres. La edad de los participantes estuvo comprendida entre 20 y 55 años.

La evaluación sensorial del postre A y B en cuanto al atributo color obtuvo una puntuación de  $5 \pm 2$  y  $6 \pm 2$  en la escalada de 9 puntos, siendo calificadas como “*ni gusta ni disgusta*” y “*gusta ligeramente*”, respectivamente (Tabla IV.7). Se pudo observar una leve pero significativa ( $p \leq 0,05$ ) preferencia del color del postre B comparado con A. La escala de orientación mostró una preferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) por parte de los consumidores hacia un color más “*claro*” que “*oscuro*”, recibiendo una puntuación de  $5 \pm 2$  y  $4 \pm 2$  en el postre A y B, respectivamente. Se podría inferir, que la formulación A fue apreciada con un color más oscuro, mientras que la formulación B se apreció con un color más claro, siendo esta última la muestra con mejor calificación.

En cuanto al atributo aroma, ambas formulaciones recibieron una puntuación de  $6 \pm 2$  en la escalada de 9 puntos, siendo calificadas como “*gusta ligeramente*” (Tabla IV.7). Mientras que, la escala de orientación de este parámetro demostró que si bien los panelistas no percibieron un aroma intenso en las formulaciones estudiadas, la formulación B ( $5 \pm 1$  puntos) fue calificada con un aroma ligero pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más intenso respecto de la formulación A ( $4 \pm 2$  puntos). Este hecho, se podría deber al proceso de evaporación y concentración de sólidos solubles que presentó la formulación B. Sin embargo, es interesante destacar que

autores como Blagden & Gilliland (2005) han reportado que la fermentación de leche de soja con *Lactobacillus casei* reduciría significativamente la presencia de metanol, acetaldehído, etanol y hexanal, compuestos responsables del aroma en la leche de soja.

El atributo cremosidad en la boca no presentó diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre el postre A y B, recibiendo un promedio de  $6 \pm 2$  puntos en la escala de 9 puntos y siendo calificada como “*gusta ligeramente*” (Tabla IV.7). La escala de orientación tampoco mostro diferencias significativas, obteniendo una puntuación promedio de  $5 \pm 2$  puntos. Estos resultados nos permiten inferir que las concentraciones estudiadas del nuevo ingrediente propuesto (0,1-1,25 %; p/v) parecieran no afectar la percepción de la textura en el producto final.

Por último, la aceptabilidad global del postre A y B obtuvo una puntuación de  $5 \pm 2$  y  $6 \pm 2$  en la escalada de 9 puntos, siendo calificadas como “*ni gusta ni disgusta*” y “*gusta ligeramente*”, respectivamente, mostrando una tendencia no significativa ( $p \geq 0,05$ ) a mayor aceptabilidad del postre B respecto del postre A (Tabla IV.7). En este contexto, es interesante resaltar que la calificación “*gusta moderadamente*” (7 de 9 puntos en la escala hedónica) fue elegida por el mayor porcentaje de panelistas, representando un 34 y 29% para el postre A y B, respectivamente. La siguiente calificación elegida con más frecuencia por los panelistas fue “*ni gusta ni disgusta*” (16%) en el postre A y “*gusta mucho*” (19%) en el postre B.

Los productos que obtienen calificaciones altas en los Ensayos Afectivos tienen más probabilidades de tener éxito en el mercado, sin embargo, es de interés resaltar que un porcentaje elevado de panelistas (39%) reportó consumir “*casi nunca*” productos a base de soja; además, este tipo de producto no es un alimento de consumo frecuente en nuestro país. La distribución de los panelistas que reportaron consumir productos a base de soja, principalmente milanesas de soja o jugo a base de leche de soja, fue “*todos los días*” el 3%, “*2-4 veces por semana*” el 16%, “*1 vez por semana*” el 34% y “*nunca*” el 7%. En un trabajo realizado por Granato et al., (2010) para formular un postre a base de soja con jugo de guayaba utilizando la MSR, la puntuación obtenida por parte de los panelistas para los atributos sensoriales color, cremosidad y aceptabilidad global fue menor a 6 en una escala de 9 puntos, en todas las formulaciones ensayadas. Cabe destacar que, a diferencia de los panelistas no entrenados que participaron de la evaluación sensorial del presente trabajo, en este caso fueron consumidores frecuentes de alimentos a base de soja.

#### 4. Conclusiones

Se pudo elaborar un postre fermentado a base de leche de soja utilizando el ingrediente desarrollado y caracterizado en los Capítulos II y III. La MSR permitió identificar la mejor combinación de SS de la leche de soja (12,5 °B) y el PC con *L. casei* (0,1%, p/v) para formular un

postre no lácteo, optimizando los parámetros de crecimiento del probiótico, capacidad de retención de agua, firmeza y color. El modelado de las variables dependientes permitió la generación de ecuaciones de predicción que pueden resultar de utilidad para el desarrollo de futuras formulaciones.

Las dos formulaciones estudiadas presentaron un recuento viable de *L. casei*  $>2,7 \times 10^9$  UFC/mL durante 21 días de almacenamiento a 8 °C, cumpliendo con los estándares locales e internacionales para considerar el producto como probiótico al momento del consumo. A su vez, al final del almacenamiento, un porcentaje  $>66\%$  de las células probióticas ( $>1,7 \times 10^7$  UFC/mL) lograron llegar metabólicamente activas al intestino, lo cual aporta información real sobre el potencial efecto probiótico del producto final.

En líneas generales, tanto el proceso de fermentación de la leche de soja como el tiempo de almacenamiento del postre redujeron significativamente el contenido de ácido fítico, rafinosa y estaquiosa, mejorando la calidad nutricional del producto final. Incluso, un mayor porcentaje del nuevo ingrediente en la formulación del producto reduce notablemente el contenido de estos compuestos no deseables.

El espectro mecánico del producto presentó características elásticas más que viscosas, sugiriendo un comportamiento similar al de un yogur convencional según datos de bibliografía. El ensayo de flujo demostró una dependencia no lineal de los cambios de la viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación, sugiriendo un comportamiento de fluido tipo no newtoniano. Ambas formulaciones ajustaron adecuadamente al Modelo de Herschel-Bulkley, siendo caracterizado como un fluido Pseudoplástico.

El análisis del Perfil de Textura permitió determinar que la muestra más fácil de comprimir, remover y desintegrar en la boca fue la que presentó mayor contenido de ingrediente y menor porcentaje de sólidos solubles. Por lo tanto, la utilización del nuevo ingrediente en las concentraciones ensayadas pareciera no afectar negativamente la textura del postre en la boca. Ambas formulaciones recibieron una puntuación de 6 en una escala hedónica de 9 puntos, siendo calificadas como “*gusta ligeramente*” en los atributos de aroma, cremosidad en la boca y aceptabilidad global. El atributo color recibió una puntuación de 5 y 6 en la escala de 9 puntos para la formulación con mayor y menor porcentaje de ingrediente, siendo calificadas como “*ni gusta ni disgusta*” y “*gusta ligeramente*”, respectivamente. Estos resultados sugirieron que la concentración del ingrediente podría afectar el color de la matriz donde es vehiculizado, y por lo tanto podría ser un factor limitante a ser tomado en cuenta. En este sentido, más estudios deberían llevarse a cabo en diferentes matrices con el objetivo de evaluar el efecto del ingrediente sobre el color del producto final.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Dos cultivos ampliamente producidos en el país, un frutihortícola: calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) y una oleaginosa: soja (*Glycine max*) fueron utilizados, en la presente tesis para la elaboración de alimentos funcionales.

La primera propuesta consistió en implementar una nueva estrategia para la fortificación del tejido vegetal con hierro y *Lactobacillus* en simultáneo. Un proceso de impregnación en seco permitió fortificar la matriz de calabaza  $\approx 12$  veces respecto al contenido de hierro de la materia prima original. El producto obtenido fue recubierto con una cobertura comestible a base de hidroxipropilmetilcelulosa conteniendo *L. casei*. La concentración viable del probiótico resultó  $> 10^7$  UFC/g de calabaza fortificada durante 14 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración. Una porción de  $\sim 25$  g del alimento propuesto aportaría un contenido de hierro superior al 30% de la RNIs, y una concentración del probiótico por encima de la concentración mínima establecida (EFSA, FDA y ANMAT) para que un producto sea considerado probiótico al momento de su consumo.

Los subproductos de calabaza generados en el proceso anterior, pudieron ser satisfactoriamente utilizados como sustrato y matriz soporte de *Lactobacillus casei*. En este caso se propuso un proceso de fermentación en estado sólido en base a resultados obtenidos de un DFC. Como producto de este proceso se obtuvo un nuevo ingrediente funcional, polvo de calabaza conteniendo *L. casei*. El probiótico adherido a la matriz de calabaza presentó una supervivencia  $> 80\%$  luego de las subsiguientes operaciones de estabilización, y además resistió las condiciones de digestión simuladas *in vitro* con un recuento viable  $> 10^6$  UFC/g. El ingrediente conteniendo *L. casei* presentó además un  $12,2 \pm 0,1\%$  de proteínas,  $5,5 \pm 0,5\%$  de lignina,  $5,3 \pm 0,5\%$  de celulosa y  $61 \pm 5\%$  de polisacáridos no celulósicos, de los cuales, el  $15,8 \pm 0,7\%$  correspondieron a ácidos urónicos. En general, el polvo de calabaza conteniendo *L. casei* presentó buenas propiedades físicas y funcionales en comparación con datos de bibliografía de fibras dietarias de otros tejidos, y éstas no se vieron afectadas por la presencia del probiótico. El producto resultó ser estable al almacenamiento a temperatura ambiente, lo que representa una ventaja adicional al reducir los costos de transporte con cadena de frío y facilitar su accesibilidad a la población.

El nuevo ingrediente pudo ser utilizado como suplemento dietario, reconstituyéndolo con leche o jugos. El probiótico suplementado a través del nuevo ingrediente, resultó resistente a factores de stress de pH y de temperatura.

Como aplicación adicional del ingrediente desarrollado y caracterizado en los Capítulos II y III, en el último Capítulo se presentó una nueva propuesta de alimento funcional. Se elaboró un

postre fermentado a base de leche de soja y con pulpa de fruta. La MSR permitió identificar la mejor combinación de sólidos solubles de la leche de soja y concentración del nuevo ingrediente, optimizando los parámetros físicos y nutricionales del postre. Las formulaciones estudiadas presentaron un recuento viable de *L. casei*  $>2,7 \times 10^9$  UFC/mL durante 21 días de almacenamiento a 8 °C, cumpliendo con los estándares locales e internacionales para considerar el producto como probiótico al momento del consumo. A su vez, al final del almacenamiento, un porcentaje  $>66\%$  de las células probióticas ( $>1,7 \times 10^7$  UFC/mL) lograron llegar metabólicamente activas al intestino, lo cual aporta información real sobre el potencial efecto probiótico del producto. El proceso de fermentación de la leche de soja con el nuevo ingrediente, así como el tiempo de almacenamiento del postre disminuyeron significativamente el contenido de ácido fólico, rafinosa y estaquiosa, mejorando la calidad nutricional del producto final.

Los productos propuestos en esta tesis fueron sometidos a evaluaciones sensoriales, demostrando en todos los casos buenas aceptabilidades globales por parte de los paneles no entrenados.

Por último, los procesos propuestos en la presente tesis presentan bajo consumo de agua potable, y los subproductos generados fueron aprovechados y revalorizados. Todo ello, demuestra la sustentabilidad de las propuestas de la presente tesis, representando un aporte a la economía circular y a las producciones locales mediante el agregado de valor a los cultivos de nuestro país.

**PERSPECTIVAS FUTURAS**

Se espera, en un futuro cercano, continuar con esta línea de investigación para avanzar en la definición de los siguientes aspectos no dilucidados hasta el momento:

- En cuanto al snack de calabaza fortificado con hierro y probióticos, es interesante profundizar aspectos relacionados al efecto de la presencia del probiótico sobre la bioaccesibilidad del hierro mediante ensayos *in vitro* y/o *in vivo*.
- Con respecto al nuevo ingrediente a base de subproductos de calabaza y considerando su potencial aplicación industrial, es necesario profundizar y estudiar aspectos que incluyan una etapa de escalado.
- Profundizar aspectos relacionados a la funcionalidad del probiótico vehiculizado en la matriz vegetal a través de estudios *in vitro* con líneas celulares.
- Estudiar la vehiculización del nuevo ingrediente como suplemento dietario en otros alimentos/bebidas listos para consumir y/o reconstituir, tales como cereales de desayuno, fórmulas infantiles, leche en polvo, postres deshidratados, bebidas a base de fruta y/o vegetales, etc.
- Estudiar nuevos campos de aplicación del nuevo ingrediente como insumo para la elaboración de alimentos de origen lácteo (yogur) o de procesos que incluyan condiciones de stress bajo temperaturas de refrigeración, como por ejemplo la elaboración de cremas heladas.
- Evaluar el efecto del nuevo ingrediente en la formulación de productos alimenticios y su efecto en el color del producto final.
- Estudiar la vehiculización de nuevas cepas probióticas en otros tejidos y subproductos vegetales.

**ANEXO A: Evaluación sensorial de un snack a base de calabaza**

Panelista N° \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Instrucciones:**

1) Antes de comenzar leer hasta el final las instrucciones.

2) Pruebe las muestras de **izquierda** a **derecha**.

No tragar las muestras y no enjuagar la boca con agua entre muestras. Si lo desea, puede enjuagar la boca al final de la prueba.

3) Al finalizar de probar cada muestra indique el nivel de agrado en cuanto al **sabor** en la escala que se encuentra debajo de cada muestra.4) Una vez que haya finalizado de probar las tres muestras, determine cuál es **diferente** y escriba el código en el casillero correspondiente.

Si lo desea puede escribir la razón de su elección en la sección COMENTARIOS.

## Set de muestras

<b>MUESTRA DIFERENTE:</b> .....
------------------------------------

Nro. \_\_\_\_\_

 Me agrada mucho Me agrada bastante Me agrada un poco Me es indiferente Me desagrada un poco Me desagrada bastante Me desagrada mucho

Nro. \_\_\_\_\_

 Me agrada mucho Me agrada bastante Me agrada un poco Me es indiferente Me desagrada un poco Me desagrada bastante Me desagrada mucho

Nro. \_\_\_\_\_

 Me agrada mucho Me agrada bastante Me agrada un poco Me es indiferente Me desagrada un poco Me desagrada bastante Me desagrada mucho

## COMENTARIOS:

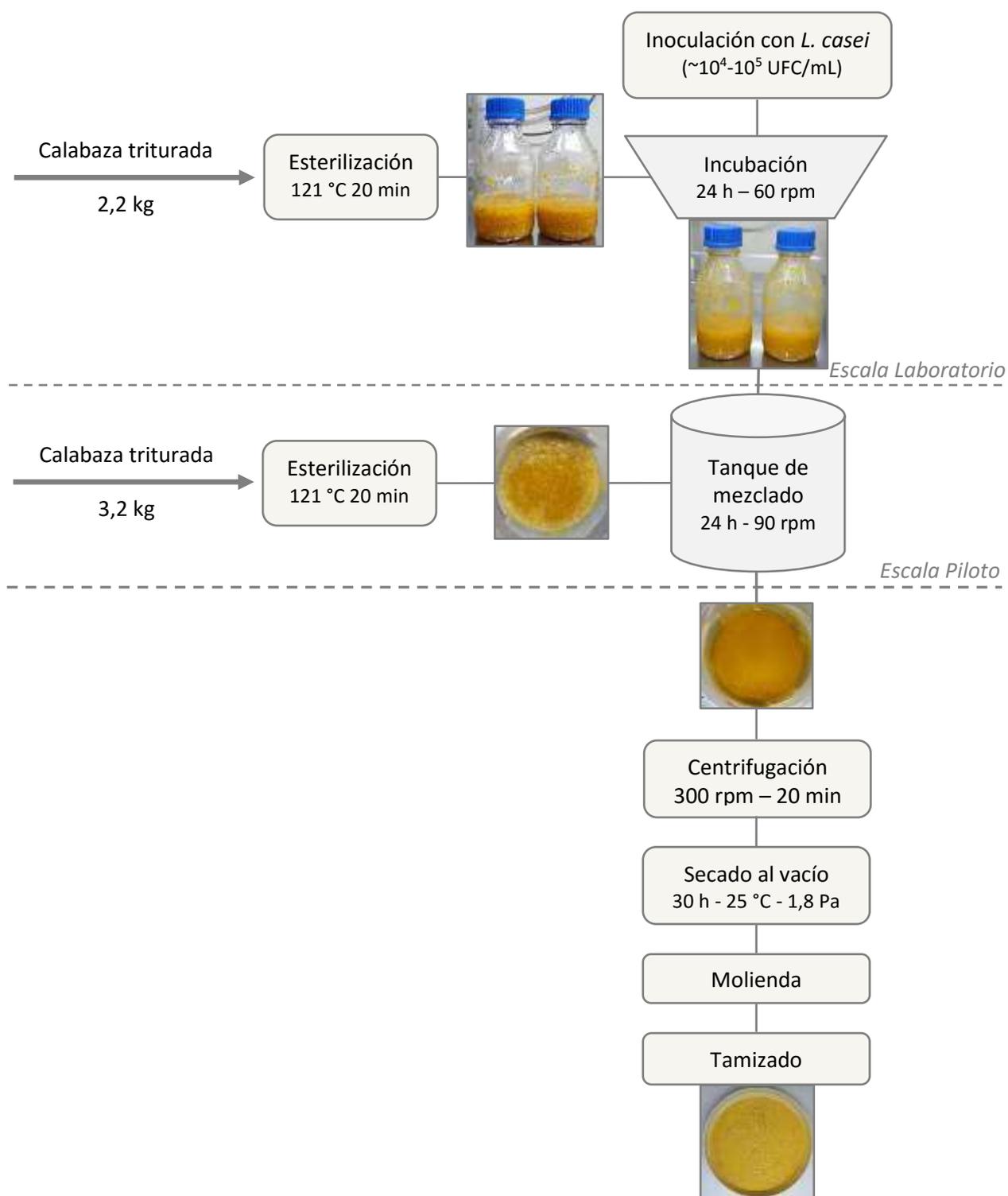
.....

.....



**ANEXO C**

A partir de una consulta proveniente del sector de Vinculación Tecnológica de CONICET se decidió procesar ~3,6 kg de calabaza con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos a escala de laboratorio cuando la elaboración del polvo de calabaza (PC) con *L. casei* se realizara a mayores escalas. Para ello, se partió de un nuevo lote de calabaza, en este caso calabaza cruda sin el tratamiento de secado al vacío utilizado con el lote de la tesis. Ello había tenido como objetivo obtener un lote de material homogéneo y estable para garantizar que la mayor parte de los ensayos de la presente tesis se realizara con el mismo lote de partida e independizar los resultados de la variabilidad biológica y estacional. Sin embargo, para llevar la propuesta de la tesis a una potencial producción, carece de sentido práctico incorporar una deshidratación adicional en el proceso y además no resultaría sustentable ni económicamente favorable. De manera que otra modificación que se incorporó en este aspecto es que se partió de cáscara y pulpa de calabaza cruda. La mezcla se trituró con una multiprocesadora (Modelo D-56, Molinex, Argentina), y se colocaron 110 g de material fresco en 2 frascos cilíndricos de 500 mL (h: 17 cm, Ø: 8 cm; Schott Duran, Weirthem, Baden-Württemberg, Alemania) junto con 93 mL de agua destilada a fin de obtener las mismas condiciones del PC preparado a partir de 10 g de pulpa y cáscara de calabaza deshidratada con 100 mL de agua (sección 2.1.3 del Capítulo III). Inmediatamente, los dos sistemas se esterilizaron durante 15 min a 121 °C y luego, cada uno de los frascos fue inoculado con 1 mL de una suspensión conteniendo *L. casei* (~10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> UFC/mL), previamente activado en caldo MRS durante 18 h (sección 2.1.2 del Capítulo II). Los sistemas se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 45 rpm durante 24 h. Una vez finalizado el proceso de incubación, los dos sistemas (~400 g) fueron mezclados con un segundo lote de ~1.900 g de pulpa y cáscara de calabaza cruda junto con ~1.300 mL de agua destilada, previamente esterilizada, en un recipiente plástico de 8 L de capacidad (h: 23,5 cm, Ø: 20 cm), formando una mezcla final de ~3.600 g. La utilización del recipiente plástico de 8 L tuvo como finalidad simular las condiciones de fermentación en un tanque de mezclado o “bio-reactor” para la producción a escala piloto. Luego, la mezcla se llevó inmediatamente a incubación a 37 °C con agitación orbital a 90 rpm durante 24 h. Concluido el tiempo de incubación, la calabaza fue lavada con solución fisiológica y centrifugada (Modelo 350T, Rolco S.R.L., Argentina) a 3.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue separado del pellet, y este último se secó al vacío a 30 °C y 1,8 Pa durante 40 h (Liofilizador Modelo L-A-B4-C, Ricor, CABA, Argentina). El PC con *L. casei* se molió y se tamizó a través de una malla de acero inoxidable con tamaño de partícula menor a 840 µ, y finalmente se almacenó a 25 °C durante 30 días (**Figura C.1**).



**Figura C.1.** Diagrama de flujo del proceso para la elaboración del polvo de calabaza con *L. casei* a escala piloto.

Los dos lotes iniciales de calabaza a escala de laboratorio fueron inoculados con una suspensión de caldo MRS conteniendo una carga de células probióticas de  $11,2 \pm 0,5$  log (UFC/mL), lo cual correspondió a un recuento inicial de  $2,8 \pm 0,5$  log (UFC/g calabaza). Luego del periodo de

incubación, los dos frascos presentaron un incremento de células probióticas de 4,7 ciclos log, correspondiendo a un recuento viable de  $7,6\pm 0,1$  log (UFC/g calabaza). Estos dos lotes de calabaza (~400 g) fueron utilizados como inóculo inicial del lote de ~3,2 kg de calabaza, por lo tanto, una vez mezclados conformaron una masa final de ~3,6 kg de calabaza con un recuento inicial del *L. casei* de  $6,4\pm 0,1$  log (UFC/g calabaza). Al final del periodo de incubación, el incremento de biomasa fue de 3,9 ciclos log, lo cual se traduce en un recuento viable del *L. casei* de  $10,3\pm 0,4$  log (UFC/g calabaza). El crecimiento de biomasa celular estuvo en el mismo orden, tanto en el frasco de 500 mL como en el “bio-reactor” con capacidad de 8 L; sin embargo, se observó un delta levemente menor durante la incubación del probiótico en el “bio-reactor” que podría explicarse por la disponibilidad y accesibilidad de nutrientes del medio durante la fase de crecimiento debido a la fluidodinámica del mezclado. Asimismo, la geometría, la oscilación del fluido con presencia de macro inestabilidades y la decantación de la masa vegetal en el tanque de mezclado durante el período de incubación pudieron tener un efecto sobre la tasa de crecimiento celular del probiótico (Pieralisi, Montante, & Paglianti, 2016; Doran, 2008). En lo aquí ensayado, no se observó una correlación entre la geometría y la tasa de crecimiento (**Tabla C.1**). Para determinar el efecto de la agitación del fluido sobre la tasa de crecimiento celular del probiótico en la matriz vegetal se requieren mayores estudios, por el momento, este apartado solo tiene como objetivo evaluar la factibilidad de un proceso de escalado para elaborar el PC con *L. casei*.

El pH final de la calabaza presentó un valor de  $4,22\pm 0,01$ , siendo inferior a los valores obtenidos en escala de laboratorio (**Tabla C.1**). El descenso del pH se debe a la presencia de ácidos orgánicos como producto del metabolismo de los carbohidratos por parte de los microorganismos; sin embargo, el factor escala y su efecto en la dinámica del fluido podría haber favorecido el descenso del pH del medio (Pieralisi et al., 2016). En este contexto, existe una amplia bibliografía que apoya la dependencia que existe entre el comportamiento del mezclado y el flujo tridimensional generado por la agitación, que afecta directamente la distribución de la fase dispersa, la transferencia de calor y masa, y la velocidad de las reacciones químicas en procesos de fermentación y cultivos celulares (Amanullah, Bucland, & Nienow, 2004).

Una vez secado al vacío, molido y finalmente tamizado, el rendimiento del PC con *L. casei* fue de 4 g de PC por cada 100 g cáscara y pulpa de calabaza fresca, valor muy similar al obtenido en escala de laboratorio y en el diseño experimental. La supervivencia de las células probióticas soportadas en el PC a las subsecuentes operaciones de estabilización fue del  $96\pm 2\%$ , presentando una carga de células viables de  $11,1\pm 0,2$  log (UFC/g PC) (**Tabla C.1**). Es interesante resaltar que, tanto el recuento viable del *L. casei* en el PC como el porcentaje de supervivencia

a las operaciones unitarias fueron superiores a los resultados obtenidos a escala de laboratorio (**Figura C.1**; sección 3.2 del Capítulo III).

Luego de 30 días de almacenamiento a 25 °C, la viabilidad del *L. casei* en el PC se redujo 1,2 ciclos log, correspondiendo a un recuento de  $9,9 \pm 0,2$  log (UFC/g), en donde el 88±2% y el 86±1% de las células probióticas logró sobrevivir a las condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal, respectivamente (**Tabla C.1**). En consecuencia con los resultados reportados previamente, la resistencia del probiótico en el producto obtenido en escalada piloto fue superior a los valores reportados en escala de laboratorio (**Figura C.1**; sección 3.2, Capítulo III). Los resultados detallados en el presente Anexo aportan información adicional sobre la factibilidad de un escalado de la propuesta de esta tesis.

**Tabla C.1.** Tabla comparativa de los parámetros físicos-químicos y funcionales del polvo de calabaza con *L. casei* en las distintas etapas de escalado.

Parámetros	Calabaza		
	21g	110g	3600 g
Relación diámetro/altura <sup>1</sup>	1,22	2,27	1,90
Agitación (rpm)	45	60	90
Inóculo inicial <sup>2</sup>	2,68 ± 0,06	2,9 ± 0,5	6,4 ± 0,1
Viabilidad del <i>L. casei</i> en el PC <sup>3</sup>	5,76 ± 0,01	7,67 ± 0,06	11,6 ± 0,3
Acidez titulable <sup>4</sup>	0,388 ± 0,001	0,94 ± 0,03	1,70 ± 0,05
pH	6,18 ± 0,08	6,09 ± 0,05	4,22 ± 0,01
Sobrenadante <sup>5</sup>	4,30	12,60	7,57

<sup>1</sup> Expresa la relación entre el diámetro del recipiente y la altura de la calabaza en el recipiente. <sup>2</sup> Recuento viable del *L. casei* en el inóculo inicial, valores promedios expresados como log (UFC/g calabaza) (b.h.). <sup>3</sup> Recuento viable del *L. casei* en el polvo de calabaza (PC), valores promedios expresados en log (UFC/g PC) (b.s.). <sup>4</sup> Acidez titulable, valores promedios expresados en mEq. ácido láctico/g PC. <sup>5</sup> Sobrenadante expresado en mL/g PC.

**ANEXO D: Producto a base de soja sabor frutilla**

Panelista N° \_\_\_\_\_

**Instrucciones:** frente a Ud. se presentan 2 muestras. Pruebe cada una de ellas, comenzando de **izquierda a derecha**, e indique con un tilde [  ] el nivel de *percepción* en cada atributo para cada muestra.

**Nota:** Asegúrese de enjuagarse la boca con agua antes de comenzar y recuerde oler el frasco con café, tomar agua y comer una galletita entre muestra-y-muestra. Si desea puede probar más de una vez cada muestra.

Muestra #: \_\_\_\_\_

**Aceptabilidad global:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

**Color:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Claro					Oscuro				

**Aroma:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ninguno					Intenso				

**Textura en la boca:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Suave					Grumoso				

Muestra #: \_\_\_\_\_

**Aceptabilidad global:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

**Color:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Claro					Oscuro				

**Aroma:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamente		

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ninguno					Intenso				

**Textura en la boca:**

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Disgusta extremadamente			ni gusta ni disgusta			Gusta extremadamer...		

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Suave					Grumoso				

**¿Con que frecuencia consume productos a base de soja?**

Todos los días     
  2-4 veces por semana     
  1-3 veces por mes     
  Casi nunca     
  Nunca

Nombre \_\_\_\_\_ Apellido \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

Sexo:  F  M

Fecha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abd El Helim, M., Hashem, S., Essam, T., & Mohamed, O. (2016). Cholesterol Lowering Capability of some *Lactobacillus* Strains and its Effect on Mice Fed a High Cholesterol Diet. *Clinical Microbiology: Open Access*, 5(3), 3–6. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000253>
- Acevedo-Félix, E., & Pérez-Martínez, G. (2003). Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp *casei* ATCC 393 (T) and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 67–75. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02325-0>
- Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Aguilar-Yáñez, J. M., Ramírez-Medrano, a., & Alvarez, M. M. (2010). Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(8), 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.047>
- Ahmed, I., Qazi, I. M., & Jamal, S. (2016). Developments in osmotic dehydration technique for the preservation of fruits and vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.01.003>
- Al-Wahsh, I. A., Horner, H. T., Palmer, R. G., Reddy, M. B., & Massey, L. K. (2005). Oxalate and phytate of soy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5670–5674. <https://doi.org/10.1021/jf0506378>
- Alegría, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static Digestion Models: General Introduction. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The Impact of food Bioactives on Health* (pp. 3–12). Heidelberg: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
- Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., Nieto, A.B., & Vidales, S.L. (2004). *Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de Capacitación*. D. J. Mejía (Ed.) Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Alzamora, S. M., Salvatori, D., Tapia, M. S., López-Malo, A., Welti-Chanes, J., & Fito, P. (2005). Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *Journal of Food Engineering*, 67, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.067>
- Amanullah, A., Bucland, B., & Nienow, A. (2004). Mixing in the Fermentation and Cell Culture Industries. In E. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, & S.M. Kresta, *Handbook of Industrial Mixing* (pp. 1071-1170). Hoboken, New Jersey, USA: Jhon Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Medica (ANMAT). Resolución Conjunta 261/2011 y 22/2011, Pub. L. No. 261/2011; 22/2011 (2011). Argentina.
- Ashutosh Kar. (2008). Microbial control by physical and chemical method. In..... (Eds), *Pharmaceutical Microbiology* (pp. 198-205). Daryaganj, New Delhi: New Age International Ltd., Publishers. ISBN 978-81-224-2867-4.
- Barrera, C., Betoret, N., & Fito, P. (2004). Ca<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> influence on the osmotic dehydration

- kinetics of apple slices (var. *Granny Smith*). *Journal of Food Engineering*, 65, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.10.016>
- Barros, N. B., Spacino, S. I., & Bruns, R. (2003). Como Fazer Experimentos. Pesquisa e Desenvolvimento na Ciencia e na Indústria. Sao Paulo, Brazil: Unicamp Editorial.
- Bauer, S. a W., Schneider, S., Behr, J., Kulozik, U., & Foerst, P. (2012). Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low-temperature vacuum drying. *Journal of Biotechnology*, 159(4), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.010>
- Bedani, R., Silva Vieira, A. D., Rossi, E. A., & Isay Saad, S. M. (2014). Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.015>
- Bernárdez, P. F., Amado, I. R., Castro, L. P., & Guerra, N. P. (2008). Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 4043 in whey. *International Dairy Journal*, 18(10–11), 1057–1065. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.004>
- Betoret, N., Martinez-Monzo, J., Fito, P. J., & Fito, P. (2005). Calcium and iron distribution in fortified vacuum-impregnated fruits determined by electron dispersion X-ray microanalysis. *Journal of Food Science*, 70(1), E26–E30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09033.x>
- Blagden, T. D., & Gilliland, S. E. (2005). Reduction of Levels of Volatile Components Associated with the “Beany” Flavor in Soymilk by *Lactobacilli* and *Streptococci*. *JFS - M: Food Microbiology and Safety*, 70(3), 2–5.
- Bonazzi, C., & Dumoulin, E. (2011). Quality Changes in Food Materials as Influenced by Drying Processes. In E. Tsotsas & A. S. Mujumdar (Eds.), *Modern Drying Technology* (1<sup>st</sup> Ed., Vol. 3, pp. 1–20). Weinheim: Germany. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527631728.ch14>
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-junelles, A. M., ... Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food : Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.09.005>
- Capozzi, V., Arena, M. P., Russo, P., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Stressors and Food Environment: Toward Strategies to Improve Robustness and Stress Tolerance in Probiotics. In R. Ross Watson & V. R. Preedy (Eds.), *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* (pp. 245–256). San Diego, USA: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00016-2>
- Camino, N. A. (2010). Comportamiento de hidroxipropilmetilcelulosas y sus mezclas con b-lactoglobulinas en solución, interfaces y emulsiones. (Tesis Doctotal) Diposnible en: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4629\\_Camino.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4629_Camino.pdf)
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic *lactobacilli* to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.003>

- Champagne, C. P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barrette, J., & Buckley, N. (2009). Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International*, 42(5–6), 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.018>
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005>
- Cheng, I. C., Shang, H. F., Lin, T. F., Wang, T. H., Lin, H. S., & Lin, S. H. (2005). Effect of fermented soy milk on the intestinal bacterial ecosystem. *World Journal of Gastroenterology*, 11(8), 1225–1227.
- Choi, M. S., & Rhee, K. C. (2006). Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human health. *Journal of Medicinal Food*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.1>
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S., & Kim, S. H. (2006). Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(5), 452–458. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01913.x>
- Cilla, A., García-Nebor, M. J., Perales, S., Lagarda, M. J., Barberá, R., & Farré, R. (2009). *In vitro* bioaccessibility of iron and zinc in fortified fruit beverages. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1088–1092. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01917.x>
- Codex Alimentarius. (2003). *CODEX STAN 243-2003, Codex standard for fermented milks. Revision 2, 2010*.
- Coghetto, C. C., Hickman Flores, S., Brusch Brinques, G., & Záchia Ayub, M. A. (2016). Viability and alternative uses of a dried powder, microencapsulated *Lactobacillus plantarum* without the use of cold chain or dairy products. *LWT - Food Science and Technology and Technology*, 71, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.020>
- Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., De Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, 139(1–4), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.059>
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics*, 4(1), 106–122. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300497>
- de Escalada, M. F., González, P., Sette, P., Portillo, F., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2012). Effect of processing on physico-chemical characteristics of dietary fibre concentrates obtained from peach (*Prunus persica* L.) peel and pulp. *FRIN*, 49(1), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.060>
- de Escalada Pla, M. F., Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Rojas, A. M. (2009). Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.11.013>

- de Escalada Pla, M. F., Ponce, N. M., Stortz, C. a., Gerschenson, L. N., & Rojas, a. M. (2007). Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). *LWT - Food Science and Technology*, *40*(7), 1176–1185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.006>
- de Escalada Pla, M. F., Uribe, M., Fissore, E. N., Gerschenson, L. N., & Rojas, A. M. (2010). Influence of the isolation procedure on the characteristics of fiber-rich products obtained from quince wastes. *Journal of Food Engineering*, *96*(2), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.018>
- de Escalada Pla, M., Rojas, A. M., & Gerschenson, L. N. (2013). Effect of Butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) Fibres on Bread Making, Quality and Staling. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(3), 828–838. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0744-y>
- Del Castillo, E., Montgomery, D. C., & McCarville, D. R. (1996). Modified desirability functions for multiple response optimization. *Journal of Quality Technology*, *28*(3), 337-345.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(5), 435–50. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.541568>
- do Espírito Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S. M., Gioielli, L. A., Perego, P., ... Oliveira, M. N. (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid pro file and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, *154*(3), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.025>
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Rheological Properties and Sensory Characteristics of Set-Type Soy Yogurt. *Agricultural and Food Chemistry*, *55*(24), 9868–9876. <https://doi.org/10.1021/jf071050r>
- Donovan, J. W., Lorenz, K., & Kulp, K. (1983). Differential Scanning Calorimetry of Heat-Moisture Treated Wheat and Potato. *Cereal Chemistry*, *60*, 381–387.
- Doran, P. (2008). *Bioprocess engineering principles* (2<sup>nd</sup> Ed.). Elsevier Science & Technology Books. Oxford, UK: Academic Press.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350–356.
- Dutta, D., Dutta, A., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2006). Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, *76*, 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.056>
- Espinel, R. A., Flores, S. K., & Gerschenson, L. N. (2014). Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties. *Materials Science & Engineering C*, *36*, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.043>
- Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., & Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, *90*, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026>
- Evelyn, & Silva, F. V. M. (2015). Thermosonication versus thermal processing of skim milk and

- beef slurry: Modeling the inactivation kinetics of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores. *Food Research International*, 67, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.028>
- Fagundes, C., Palou, L., Monteiro, A. R., & Pérez-Gago, M. B. (2015). Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of cold-stored cherry tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 193, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.027>
- FAO. (2016). Pérdidas y Desperdicios de Alimentos en América Latina y el Caribe. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5504s.pdf>
- FAO, & OMS. (2015). Segunda Conferencia Internacional sobre Nutrición. Secretaría mixta FAO/OMS. Italia: Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i4436s.pdf>
- FAO. (2012). Pérdidas y Desperdicios de Alimentos en el Mundo - Alcances, causas y prevención. Italia: Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2697s.pdf>
- FAO, & OMS. (2001). Iron. In *Human Vitamin and Mineral Requirements*. Report of a Joint FAO/OMS Expert Consultation (pp 195-216). Bangkok, Thailand. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>
- Ferragut, V., Cruz, N. S., Trujillo, A., Guamis, B., & Capellas, M. (2009). Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.026>
- Figuerola, F., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.036>
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.
- Foerst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S., & Santivarangkna, C. (2012). Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and Bioprocess Technology*, 90(2), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.06.004>
- Gahrue, H. H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., & Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.03.002>
- Gänzle, M. G., & Follador, R. (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in *Lactobacilli*: A review. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00340>
- Gao, Y., Shang, C., Saghai Maroof, M. A., Biyashev, R. M., Grabau, E. A., Kwanyuen, P., ... Buss, G. R. (2007). A modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean. *Crop Science*, 47(5), 1797–1803. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.03.0122>
- Genevois, C. E., de Escalada Pla, M., & Flores, S. K. (2015). Application of edible coatings to improve global quality of fortified pumpkin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.001>
- Genevois, C. E., Flores, S. K., & de Escalada Pla, M. F. (2014a). Effect of iron and ascorbic acid

- addition on dry infusion process and final color of pumpkin tissue. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.020>
- Genevois, C., Flores, S. K., & de Escalada Pla, Marina F. (2014b). Viabilidad de *Lactobacillus casei* en un producto vegetal fortificado con hierro. XXII Jornadas Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Valparaíso, Chile. ISBN 978-956-296-123-3.
- Gil Angel (2010). Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. *Tratado de Nutrición* (2<sup>da</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 978-84-9835-346-4.
- González E., Montenegro M. A., Nazareno M. A., López de Mishima B. A. (2001). Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), 395-399.
- Granato, D., Bigaski Ribeiro, J. C., Castro, I. A., & Masson, M. L. (2010). Sensory evaluation and physicochemical optimisation of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121(3), 899–906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.014>
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. a. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292–302. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>
- Guergoletto, K. B., Magnani, M., Martin, J. S., Andrade, C. G. T. D. J., & Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(2), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.11.003>
- Guergoletto, K. B., Sivieri, K., Yuri Tsuruda, A., Peboni Martins, E., Bertuol de Souza, J. C., Massaguer Roig, S., ... Garcia, S. (2012). Dried Probiotics for Use in Functional Food Applications. In B. Valdez (Ed.), *Food Industrial Processes - Methods and Equipment* (pp. 227–250). Rijeka, Croatia: InTech. <https://doi.org/10.5772/33191>
- Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., & Eberhard, P. (2009). Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.009>
- Guggisberg, D., Piccinali, P., & Schreier, K. (2011). Effects of sugar substitution with Stevia, Actilight and Stevia combinations or Palatinose on rheological and sensory characteristics of low-fat and whole milk set yoghurt. *International Dairy Journal*, 21(9), 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.03.010>
- Higl, B., Kurtmann, L., Carlsen, C. U., Ratjen, J., Först, P., Skibsted, L. H., ... Risbo, J. (2007). Impact of water activity, temperature, and physical state on the storage stability of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* freeze-dried in a lactose matrix. *Biotechnology Progress*, 23(4), 794–800. <https://doi.org/10.1021/bp070089d>
- Hironaka, E. K., Oda, Y., & Koaze, H. (2014). Iron enrichment of whole potato tuber by vacuum impregnation. *LWT - Food Science and Technology*, 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.043>

- Horáčková, A., Mühlhansová, A., Sluková, M., Schulzová, V., & Plocková, M. (2015). Fermentation of soymilk by yoghurt and bifidobacteria strains. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(4), 313–319. <https://doi.org/10.17221/115/2015-CJFS>
- Horackova S., Sedlackova P., S. M. & P. M. (2014). Influence of Whey , Whey Component and Malt on the Growth and Acids Production of *Lactobacilli* in Milk. *Czech Journal of Food Science*, 32(6), 526–531.
- Hou H. J. & Chang K. C. (2003). Science and Technology of Tofu Making. In Y. H. Hui, S. Ghazala, D. M. Graham, K. D. Murrell, & W-K. Nip (Eds.), *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. New York, U.S.A.: Marcel Dekker, Inc.
- Ibran, R. G., & Lacelli, G. A. (2016). Informe estadístico mercado de la soja. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuario. Disponible en: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_informe\\_estadistico\\_del\\_mercado\\_de\\_soja.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_informe_estadistico_del_mercado_de_soja.pdf)
- Içier, F., Gündüz, G. T., Yilmaz, B., & Memeli, Z. (2015). Changes on some quality characteristics of fermented soy milk beverage with added apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.102>
- Imran, M., El-fahmy, S., Revol-Junelles, A.-M., & Desobry, S. (2010). Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 81, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.021>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2013). *Manual del cultivo del zapallo anquito (Cucurbita Moschata Duch.)*. Mendoza, Argentina: Publicaciones Regionales- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- ISO 5492:2012. Sensory Analysis – Vocabulary.
- ISO 4120:2007. Sensory Analysis - Methodoly - Triangle Test.
- ISO 4121:2003. Sensory Analysis - Guidelines for the use of quantitative response scales.
- Jones, J. M. (2014). CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the “fiber gap.” *Nutr J*, 13, 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-34>
- Kim, S. L., Lee, J.-E., Kwon, Y.-U., Kim, W.-H., Jung, G.-H., Kim, D.-W., ... Chung, I.-M. (2013). Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. *Food Chemistry*, 136(2), 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.022>
- Kittisuban, P., Ritthiruangdej, P., & Supphantharika, M. (2014). Optimization of HPMC, yeast  $\beta$ -glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.045>
- Keivani, F., Mokarram, R. R., Gholian, M. M., Benis, K. Z., Zendeboodi, F., & Zadeh, S. S. (2014). An encyclopedic approach to distinguish the survival of probiotic living cells during drying processes. *Wudpecker Journal of Medical Sciences*, 3, 001-007.
- Kogan, L., Abeyá Gilardón, E., Biglieri, A., Mangialavori, G., Calvo, E., & Durán, P. (2008). *Anemia: La desnutrición oculta. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud en Argentina*. Buenos Aires.

- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40(1), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.029>
- Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1781–1804. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.026>
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, 83(3), 437–446. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00126-2)
- Kumar, P., & Mishra, H. N. (2003). Effect of mango pulp and soymilk fortification on the texture profile of set yoghurt made from buffalo milk. *Journal of Texture Studies*, 34(3), 249–269.
- Lago-Vanzela, E. S., do Nascimento, P., Fontes, E. A. F., Mauro, M. A., & Kimura, M. (2013). Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.003>
- Lai, L.-R., Hsieh, S.-C., Huang, H.-Y., & Chou, C.-C. (2013). Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(5), 552–556. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.022>
- Lang, M., & Ermini, P. (2011). *Manual del cultivo de zapallo para la región semiárida pampeana*. La Pampa: Argentina: Ediciones INTA.
- Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food. Principles and practices* (2<sup>nd</sup> Ed.). New York, USA: Springer Science Business Media, LLC. <https://doi:10.1007/978-1-4419-6488-5>.
- LeBlanc, J. G., Silvestroni, A., Connes, C., Juillard, V., Savoy de Giori, G., & Piard, J.-C. (2004). Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce  $\alpha$ -galactosidase. *Genetics and Molecular Research*, 3(3), 432–440.
- Leistner L. (1995). Use of hurdle technology in food processing: recent advances. In: *Food Preservation by moisture control fundamentals and applications* (pp 377-397). G. Barbosa-Cánovas (Ed.). Pennsylvania, USA: Welti-Chanes, J. Technomic Publication.
- Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coating for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60–75. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00018.x>
- López de Lacey, A. M., López- Caballero, M. E., Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2012). Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.07.001>
- López de Lacey, A. M., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2014). Agar films containing

- green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT - Food Science and Technology and Technology*, 55, 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.028>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lye, H.-S., Rusul, G., & Liong, M.-T. (2010). Removal of cholesterol by *lactobacilli* via incorporation and conversion to coprostanol. *J. Dairy Sci.*, 93, 1383–1392. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2574>
- Lynch, S. R. (2011). Why Nutritional Iron Deficiency Persists as a Worldwide Problem. *Journal of Nutrition*, (19), 763–768. <https://doi.org/10.3945/jn.110.130609.billion>
- Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhlid, R., & Ananta, E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*, 162(4), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006>
- Martín-Diana, A. B., Rico, D., Frías, J. M., Barat, J. M., Henehan, G. T. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18(4), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.11.027>
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Vanzela, E. S. L., Stringheta, P. C., de Oliveira Pinto, C. L., & Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
- McCleary, B. V., De Vries, J. W., Rader, J. I., Cohen, G., Prosky, L., Mugford, D. C., ... Okuma, K. (2011). Collaborative Study Report: Determination of Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber (Codex Definition) by an Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography. *Cereal Foods World - AACC International*, 56(6), 238–247. <https://doi.org/10.1094/CFW-56-6-0238>
- Mehansho, H. (2006). Symposium: Food Fortification in Developing Countries. *The Journal of Nutrition*, 1059–1063.
- Meilgaard, M. C., Civille, G. V., & Carr, B. T. (2016). *Sensory Evaluation Technique* (5<sup>th</sup> Ed.). CRC Press Taylor and Francis Group.
- Mierczynska, J., Cybulska, J., Sołowiej, B., & Zdunek, A. (2015). Effect of Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydrate Polymers*, 133, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.046>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). Function suitable for food – An international consensus. *Food and Function*, 5(113), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación (2015). Resolución Nro. 392/2015. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/245000-249999/248599/norma.htm>
- Mishra Pandey, S., & Mishra, H. N. (2015). Optimization of the prebiotic & probiotic

- concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.003>
- Miramont, S. (2012). Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos. Tesis de Maestría. Disponible en: <http://posgrado.frba.utn.edu.ar/investigacion/tesis/MTA-2012-Sofia%20Miramont.pdf>
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R., & Ferrero, M. A. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4, 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>
- Montgomery, D. C. (2008). Design and analysis of experiments. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Mora, Y. N., Contreras, J. C., Aguilar, C. N., Meléndez, P., De la Garza, I. De, & Rodríguez, R. (2013). Chemical Composition and Functional Properties from Different Sources of Dietary Fiber. *American Journal of Food and Nutrition Nutrition*, 1(3), 27–33. <https://doi.org/10.12691/ajfn-1-3-2>
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., ... Sforza, S. (2016). Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry*, 201, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.012>
- Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadrappa, K., Madhavendra, S. S., & Reddy, G. (2005a). Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: Medium optimization using RSM. *Process Biochemistry*, 40(2), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.045>
- Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadrappa, K., & Reddy, G. (2005b). Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technology*, 96(4), 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.020>
- Nawirska, A., Figiel, A., Kucharska, A. Z., Sokół-Letowska, A., & Biesiada, A. (2009). Drying kinetics and quality parameters of pumpkin slices dehydrated using different methods. *Journal of Food Engineering*, 94, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.025>
- Nayak, B., & Nair, K. M. (2003). *In vitro* bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. *Food Chemistry*, 80(4), 545–550. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00341-2)
- Norfezah, M. N. (2013). *Development of Expanded Snack Foods Containing Pumpkin Flour and Corn Grits Using Extrusion*. Massey University, Palmerston, New Zealand.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Olivera, D. F., Viña, S. Z., Marani, C. M., Ferreyra, R. M., Mugridge, A., Chaves, A. R., & Mascheroni, R. H. (2008). Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (Brassica

- oleracea L. gemmifera DC) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, *84*, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.005>
- Osorio, F. A., Molina, P., Matiacevich, S., Enrione, J., & Skurtys, O. (2011). Characteristics of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) based edible film developed for blueberry coatings. *Procedia Food Science*, *1*, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.045>
- Ottaway, B. P. (2008). Principles of food fortification and supplementation. In B. P. Ottaway (Ed.), *Food fortification and supplementation: Technological, safety and regulatory aspects* (1st Ed., pp. 1–10). Cambridge, UK: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845694265.1>
- Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., & Reinheimer, J. (2012). Effect of heat treatment and spray drying on *Lactobacilli* viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, *48*, 748–754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.018>
- Parfitt, J., Barthel, M. y Macnaughton, S. (2010). Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, *365*: 3065-3081. Disponible en: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/365/1554/3065.full>
- Parvaneh, K., Jamaluddin, R., Karimi, G., & Erfani, R. (2014). Effect of Probiotics Supplementation on Bone Mineral Content and Bone Mass Density. *The Scientific World Journal*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/595962>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 36–60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Peighambardoust. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *22*(5), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009>
- Péneau A., Dauchet L., Vergnaud A. C., Estaquio A., Kesse-Guyot E., Bertrais S., Latino-Martel P., Hercberg S., Galan P. (2008). Relationship between iron status and dietary fruit and vegetables base don their vitamin C and fiber content. *American Journal of Clinical Nutrition*. *87*: 1298-1305.
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, *44*(5), 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>
- Petrova, P., & Petrov, K. (2012). Direct starch conversion into L-(+)-lactic acid by a novel amyolytic strain of *Lactobacillus paracasei* B41. *Starch - Stärke*, *64*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1002/star.201100074>
- Petrova, P., Petrov, K., & Stoyancheva, G. (2013). Starch-modifying enzymes of lactic acid bacteria – structures, properties, and applications. *Starch - Stärke*, *65*(1–2), 34–47. <https://doi.org/10.1002/star.201200192>

- Pieralisi, I., Montante, G., & Paglianti, A. (2016). Prediction of fluid dynamic instabilities of low liquid height-to-tank diameter ratio stirred tanks. *Chemical Engineering Journal*, 295, 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.026>
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Martin Faulks, R., Le Marc, Y., ... Wickham, J. (2010). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology*, 27(8), 1121–1127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.019>
- Prajapati, J. B., & Nair, B. M. (2003). History of Fermented Foods. In E. Farnworth (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods*. CRC Press
- Provesi, J. G., & Amante, E. R. (2015). Carotenoids in Pumpkin and Impact of Processing Treatments and Storage. In V. Preedy (Ed.), *Processing and Impact on Active Components in Food* (First, pp. 71–80). Amsterdam: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00009-3>
- Raghavendra, S. N., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Tharanathan, rR N. (2004). Dietary fiber from coconut residue : effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *European Food Research Technology*, 218, 563–567. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0889-2>
- Randazzo, C., & Pitino, I. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Science and Techonology*, 33(4), 652–659.
- Rao, M. A. (2007). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications* (2<sup>nd</sup> Edition). New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
- Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., ... Coppola, R. (2015). Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Science and Technology and Technology*, 60, 721–728.
- Rico, D., Martín-Diana, a. B., Frías, J. M., Barat, J. M., Henehan, G. T. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Improvement in texture using calcium lactate and heat-shock treatments for stored ready-to-eat carrots. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.04.032>
- Rivas, A., Blengino, C., Alvares de Toledo, B., & Franco, D. (2015). Un ejercicio de la estimacion: Pérdidas y Desperdicios de Alimentos en la Argentina. *Alimentos Argentinos*, 65: 4-11.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.008>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (1997). Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. *Contract*, (January), 1–93.
- Rojas A. M. L. (1995). Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida. *Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.002>
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.018>
- Roongruangsri, W., & Bronlund, J. E. (2016). Effect of air-drying temperature on physico-chemical, powder properties and sorption characteristics of pumpkin powders. *International Food Research Journal*, 23(3), 962–972.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Sigvart-Mattila, P., & Mättö, J. (2006). Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16(12), 1477–1482. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.007>
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., & Mättö, J. (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.019>
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., Saavedra, Q., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33, 92–98.
- Sathe, S. K., & Venkatachalam, M. (2005). Phytates. In Y.H. Hui (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering* (pp. 95-1). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Santvarangkna C. (2015). Storage Stability of Probiotic Powder. In P. Foerst & C. Santvarangkna (Eds.), *Advances in Probiotic Technology* (pp. 286-313). Florida, USA: CRC Press-Taylor & Francis Group.
- Santivarangkna, C. (2016). Storage Stability of Probiotic Powder. In P. Foerst & C. Santivarangkna (Eds.), *Advances in Probiotic Technology* (pp. 286–310). New York, US: Taylor & Francis Group, LLC. <https://doi.org/10.1201/b18807-19>
- Saxami, G., Ypsilantis, P., Sidira, M., Simopoulos, C., Kourkoutas, Y., & Galanis, A. (2012). Distinct adhesion of probiotic strain *Lactobacillus casei* ATCC 393 to rat intestinal mucosa. *Anaerobe*, 18(4), 417–420. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.002>
- Scheers, N., Rossander-Hulthen, L., Torsdottir, I., & Sandberg, A.-S. (2015). Increased iron bioavailability from lactic-fermented vegetables is likely an effect of promoting the formation of ferric iron (Fe<sup>3+</sup>). *European Journal of Nutrition*, 55(1), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0857-6>
- Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis.

- Molecular Nutrition and Food Research*, 53(SUPPL. 2), 330–375.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900099>
- Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(SUPPL. 2), 330–375.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200900099>
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Acil, Y., ... Schrezenmeier, J. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 838–846.
- Senaka Ranadheera, C., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *FRIN*, 49(2), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.007>
- Shilpi, A., & Kumar, P. (2013). Effect of Yoghurt Cultures and Probiotic Cultures on Physicochemical and Sensory Properties of Mango Soy Fortified Probiotic Yoghurt (Msfpy). *Food Processing & Technology*, 4(6), 4–11. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000239>
- Sidira, M., Galanis, A., Ypsilantis, P., Karapetsas, A., Progaki, Z., Simopoulos, C., & Kourkoutas, Y. (2010). Effect of Probiotic-Fermented Milk Administration on Gastrointestinal Survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and Modulation of Intestinal Microbial Flora. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 19(4), 224–230.  
<https://doi.org/10.1159/000321115>
- Soccol, C. R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Rigon Spier, M., Pedroni Medeiros, A. B., Yamagishi, C. T., De Dea Lindner, J., ... Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- Solioz, M., Mermod, M., Abicht, H. K., & Mancini, S. (2011). Responses of Lactic Acid Bacteria to Heavy Metal Stress. In E. Tsakalidou & K. Papadimitriou (Eds.), *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* (pp. 163–195). Heidelberg: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8>
- Song, W. O., Chun, O. K., Hwang, I., Shin, H. S., Kim, B.-G., Kim, K. S., ... Lee, S. G. (2007). Soy isoflavones as safe functional ingredients. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 571–580.  
<https://doi.org/10.1089/jmf.2006.0620>
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231–242.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.023>
- Souto de Olivera S. M. (2009). Avaliação do impacto do uso do fruto *Mangifera indica* L. (manga) no tratamento de crianças anêmicas fazendo uso do sulfato ferroso. *Tesis Doctoral Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba*.
- Tang, A. L., Wilcox, G., Walker, K. Z., Shah, N. P., Ashton, J. F., & Stojanovska, L. (2010). Phytase activity from *Lactobacillus* spp. in calcium-fortified soymilk. *Journal of Food Science*, 75(6), 373–376. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01663.x>

- Tapia, T. S., Rojas-Grau, 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), 190–196. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00318.x>
- Tavera-Quiroz, M. J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglis, A., & Bertola, N. (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, *16*, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.024>
- Telis, V. R. N., & Martínez-Navarrete, N. (2010). Application of compression test in analysis of mechanical and color changes in grapefruit juice powder as related to glass transition and water activity. *LWT - Food Science and Technology*, *43*, 744–751. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.007>
- Tiptiri Kourpeti, A., Aindelis, G., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Tompoulidou, E., Saxami, G., ... Chlichlia, K. (2015). Antiproliferative effects of *Lactobacillus casei* ATCC 393 against colon carcinoma. *Journal of Biotechnology*, *208*(2015), S83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.257>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Turner, N., & Lupton, J. (2011). Dietary Fiber. *American Society for Nutrition*, (3), 151–152. <https://doi.org/10.3945/an.110.000281.151>
- Tymczynszyn, E. E., Díaz, R., Pataro, A., Sandonato, N., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2008). Critical water activity for the preservation of *Lactobacillus bulgaricus* by vacuum drying. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(2), 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.009>
- USAID (United States Agency for International Development). (2004). *Pumpkin: Postharvest care and market preparation*. Retrieved from: [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/Pnacy827.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnacy827.pdf)
- Valencia-Chamorro, S. A., Pérez-Gago, M. B., del Río, M. Á., & Palou, L. (2009). Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)-lipid edible composite coatings on postharvest decay development and quality attributes of cold-stored “Valencia” oranges. *Postharvest Biology and Technology*, *54*(2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.06.001>
- Van Boekel, M. A. J. S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1–2), 139–159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00742-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5)
- Vinderola, G., Céspedes, M., Mateolli, D., Cárdenas, P., Lescano, M., Aimaretti, N., & Reinheimer, J. (2011). Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, *64*(2), 269–275. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00659.x>
- Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, W., Liu, X., & Zhang, H. (2009). Fermentation

- characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2468–2476.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1849>
- Wang, Y. C., Yu, R. C., Yang, H. Y., & Chou, C. C. (2003). Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiology*, 20(3), 333–338. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00125-9)
- WHO, & FAO. (2006). *Guidelines on food fortification with micronutrients*. L. Allen, B. de Benoist, O. Dary, & R. F. Hurrell (Eds.). Roma, Italia: WHO/FAO. Retrieved from [http://www.who.int/nutrition/publications/guide\\_food\\_fortification\\_micronutrients.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/guide_food_fortification_micronutrients.pdf) World Health Organization, & Food and Agricultural Organization of United Nations. (2006). *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome, Italia.
- WHO. (2015). *The Global Prevalence of Anaemia in 2011*. Retrieved from [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177094/1/9789241564960\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177094/1/9789241564960_eng.pdf?ua=1&ua=1)
- Wu, P., Tian, J.-C., Walker, C. E., & Wang, F.-C. (2009). Determination of phytic acid in cereals - A brief review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(9), 1671–1676. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01991.x>
- Yang, M., & Li, L. (2010). Physicochemical, Textural and Sensory Characteristics of Probiotic Soy Yogurt Prepared from Germinated Soybean. *Food Technology Biotechnology*, 48(4), 490–496.
- Ying, D. Y., Phoon, M. C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., & Augustin, M. A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science*, 75(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x>
- Yoon, M. Y., & Hwang, H. J. (2008). Reduction of soybean oligosaccharides and properties of  $\alpha$ -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology*, 25(6), 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.008>
- Zhang, Y., Rempel, C., & McLaren, D. (2014). Edible Coating and Film Materials: Carbohydrates. In J. H. Han (Ed.), *Innovations in Food Packaging* (pp. 305–323). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00026-6>
- Zimmermann, M. B., & Hurrell, R. F. (2007). Nutritional iron deficiency. *Lancet*, 370, 511–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61235-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61235-5)
- Zwietering, M.H, Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.