



DESARROLLO DE UNA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA A BASE DE CEREALES

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2020/2021

Alumna: Silvia Suárez Martín

Tutor: Manuel Gómez Pallarés

Cotutora: Irma Caro Canales

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

RESUMEN

El desperdicio de alimentos es problema económico, social y medio ambiental que requiere de soluciones. Según la FAO se desperdician un tercio de los alimentos producidos en el mundo. El pan es uno de los alimentos más desperdiciados tanto durante el proceso de distribución como en los hogares. Su reutilización como sustrato para la elaboración de bebidas fermentadas a base de cereales pueden suponer una alternativa a los productos lácteos para el cultivo de bacterias probióticas. En el presente trabajo se llevó a cabo la utilización de diversos cultivos iniciadores con bacterias ácido-lácticas para la fermentación de bebidas a base de harina de desechos de pan, con y sin adicción de una preparación enzimática (α -amilasa y glucoamilasa). Se inocularon cuatro cultivos iniciadores en una mezcla de agua y pan a una concentración 6-7ufc/g que se fermentó a 38°C durante 24 horas. Se determinaron, los recuentos microbianos, el pH, la acidez cada dos horas durante las primeras 10 horas, a las 24 horas del proceso de fermentación y tras un periodo de almacenamiento a 4°C durante 15 días. A partir de los valores obtenidos se calcularon diversos parámetros de crecimiento microbiano como $V_{m\acute{a}x}$, $\mu_{m\acute{a}x}$ y los tiempos necesarios para alcanzar el pH 5,0 y 4,5. Se midió el color a 72 horas y la capacidad de retención de agua a 24 horas y 15 días en el producto fermentado y almacenado a 4°C. Se observó un crecimiento adecuado de todas las bacterias ácido lácticas en las bebidas fermentadas a base harina de pan, con excepción del *Lactobacillus plantarum*. La adicción de enzimas incrementó los valores $V_{m\acute{a}x}$, $\mu_{m\acute{a}x}$, aunque redujo la capacidad de retención de agua de este producto fermentado. Entre los cultivos que sólo presentaban un tipo de bacterias, aquel que contenía *Lactobacillus rhamnosus* fue el que mostró una velocidad de acidificación más alta ($0,36\pm 0,04$) y una mejor viabilidad. El cultivo C4, que contenía bifidobacterias, mostró una reducción de 3 Log/g durante el almacenamiento a 4°C. En conclusión, la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y tratamiento enzimático resultó ser la mejor opción para la fermentación de la bebida a base de desechos de pan.

PALABRAS CLAVE

Cultivos iniciadores, bacterias ácido-lácticas, fermentación, pan desechado, enzimas

ABSTRACT

Food waste is an economical, social and environmental problem that requires solutions. According to FAO, a third of the food produced around the world was wasted. Bread is one of the most wasted foods, both during the distribution process and at home. Its reuse as a substrate to produce fermented cereal-based beverages can be an alternative to dairy products for the growth of probiotic bacteria. In the present work, several starter cultures were used to ferment beverages based on bread waste flour, with and without an enzymatic preparation (α -amylase and glucoamylase). Initial inoculation of each culture was $6-7 \times 10^7$ cfu/g and fermented at 38°C for 24 hours. Microbial counts, pH and acidity, were determined every two hours during the first 10 hours, 24 hours after the fermentation process and after storage at 4°C for 15 days. After that, various microbial growth parameters such as V_{max} , μ_{max} and the times required to reach pH 5.0 and 4.5 have been calculated. Finally, colour at 72 hours and water holding capacity at 24 hours 15 days stored at 4°C were estimated. All lactic acid bacteria's appropriate growth has been shown in the bread flour-based fermented beverages, except for *Lactobacillus plantarum*. The addition of enzymes increased the V_{max} , μ_{max} values, although it reduced the water holding capacity of this fermented product. Among the cultures presenting only one type of bacteria, the one containing *Lactobacillus rhamnosus* showed the highest acidification rate (0.36 ± 0.04) and the best viability. Culture C4, containing bifidobacteria, showed a reduction of 3 Log/g during storage at 4°C. In conclusion, the combination of *Lactobacillus rhamnosus* and enzymatic treatment proved to be the best option for fermentation of bread waste-based beverage.

KEYWORDS

Starter cultures, lactic acid bacteria, fermentation, discarded bread, enzymes

ABREVIATURAS

a_W: Actividad de agua

BAL: Bacterias ácido-lácticas

°C: Grados centígrados.

h: Horas.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Log UFC/g: Logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo.

UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo.

μL: Microlitros.

g: Gramos.

NaOH: Hidróxido de sodio.

CO₂: Dióxido de carbono.

Tto: Tratamiento.

M: Molar.

Meq: Miliequivalentes.

mm: Milímetros.

ml: mililitros

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	5
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo general.....	9
2.2	Objetivos específicos.....	9
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1	Cultivos iniciadores.....	9
3.2	Preparación de inóculos de cultivo iniciador	9
3.3	Elaboración de las bebidas fermentadas	10
3.4	Métodos analíticos y estadísticos.....	11
3.4.1	Parámetros microbiológicos.....	11
3.4.2	Parámetros físico-químicos	12
3.4.3	Análisis estadístico	13
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1	Cinética de acidificación	13
4.2	Cinética de crecimiento y recuento microbiano	16
4.3	Capacidad de retención de agua y color	18
5	CONCLUSIONES.....	20
6	BIBLIOGRAFÍA.....	22

1 INTRODUCCIÓN

El desperdicio de alimentos supone un gran problema económico, de sostenibilidad y seguridad alimentaria. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) se desperdician aproximadamente 1.300 millones de toneladas de alimentos al año, suponiendo un tercio de la producción total de alimentos a nivel mundial (Gustavsson et al., 2011). Este desperdicio alimentario se produce a lo largo de toda la cadena alimentaria y genera un coste económico de aproximadamente 1 billón de dólares al año, llegando a superar los dos billones de dólares si se tienen en cuenta los costes sociales y económicos (Vilariño et al., 2017). Las categorías de alimentos que más desperdicio alimentario general son la carne, las frutas y verduras y los productos de panadería (Gustavsson et al., 2011). En concreto, los residuos generados por las panaderías suponen más del 7% de la producción total de la Unión Europea (Mena et al., 2011). La mayor parte del procesamiento del pan, a diferencia de otras fuentes ricas en hidratos de carbohidratos como el arroz o la pasta, se lleva a cabo en industrias o pequeños obradores y su distribución genera una elevada cantidad de excedentes. En España la mayor parte del desperdicio de pan proviene de barras y otros productos que se endurecen rápidamente antes de su deterioro microbiológico (crecimiento de bacterias, levaduras y mohos) (Smith et al., 2010; Suhr & Nielsen, 2004), por lo que pueden ser procesados con seguridad. Teniendo en cuenta esos aspectos, el desperdicio de pan sigue un modelo de economía lineal: recoge, produce, consume y desecha (Jurgilevich et al., 2016). De esta manera una vez descartado para su venta es desechado de inmediato; generando un desperdicio que asciende aproximadamente a cien toneladas al día a nivel mundial (Melikoglu & Webb, 2013). Teniendo en cuenta la desnutrición y hambruna que en la actualidad sufren millones de personas en todo el mundo (Torres et al., 2018) junto con el elevado impacto medioambiental que supone este modelo económico, hace necesaria la búsqueda de alternativas que permitan lograr sistemas alimentarios sostenibles que atiendan a los principios de una economía circular (Jurgilevich et al., 2016). Hasta ahora, en la industria de la panificación se han desarrollado varias alternativas para reutilizar los residuos de pan basadas en la obtención de energía (bioetanol) (Adessi et al., 2018), productos químicos de alto valor añadido (láminas de grafeno) (Panahi-kalamuei et al., 2020) o para alimentación animal (Bo et al., 2015). Sin embargo, la Unión Europea recomienda soluciones alternativas que permitan reciclar los desechos de panadería para la obtención de alimentos permitidos para el consumo humano (Comisión Europea, 2008).

Desde su domesticación durante la primera revolución agrícola aproximadamente en el año 10.000 a.C., los cereales son considerados la principal fuente de carbohidratos y en

menor medida, de proteínas, fibra, vitaminas y minerales (Poutanen, 2012). Sin embargo, los cereales crudos contienen niveles muy bajos de compuestos organolépticamente activos, dando lugar a olores y sabores planos, “verdes” y en muchas ocasiones desagradables (Zhou et al., 1999). Este hecho hace necesaria la utilización de diversas tecnologías como la molienda, la cocción o la fermentación para su procesamiento. La fermentación microbiana, y especialmente la fermentación ácido láctica, sigue siendo una buena opción para mejorar las propiedades nutricionales, sensoriales y de vida útil del producto (Petrova & Petrov, 2020). Aunque la capacidad de fermentación con bacterias ácido-lácticas (BAL) se ha asociado principalmente con la elaboración de productos lácteos, es un método de procesamiento que se lleva utilizado desde la antigüedad en todo el mundo para la elaboración de bebidas y alimentos fermentados a base de cereales (Blandino et al., 2003). Diversos cereales han sido empleados para la elaboración de bebidas fermentadas entre los que cabe mencionar: trigo, arroz, maíz, mijo, cebada, avena y teff (Petrova et al., 2020). En los últimos años, en los países occidentales, se ha generado un aumento en la demanda de cereales “ancestrales”, como el kamut, la espelta o la avena y pseudocereales, como la quinoa o el amaranto, debido a su mayor contenido en micronutrientes, compuestos fenólicos y fibra dietética (Coda et al., 2014; Poutanen, 2012). La harina de pan contiene principalmente almidón y en menor medida proteínas, debido a esto puede ser un buen sustrato para la fermentación de bebidas vegetales. El pan es el resultado de la cocción de una masa obtenida a partir de la mezcla de harina y agua, fermentada con la ayuda de levaduras de panificación o masa madre (Real Decreto 308/2019). Este proceso de horneado al que es sometido permite la gelatinización del almidón, la inactivación de las enzimas, la desnaturalización de las proteínas del gluten y la formación de diversos compuestos derivados del metabolismo de las levaduras y el calor (Immonen et al., 2020), otorgándole características únicas para la formulación de bebidas vegetales funcionales.

En los últimos años, se ha producido un aumento de la fabricación y puesta a disposición en el mercado de alimentos y bebidas de origen vegetal con el objetivo de satisfacer la creciente demanda de productos de origen vegetal por parte de los consumidores (Montemurro et al., 2021). Entre los principales motivos de esta demanda destacan una creciente concienciación de las personas sobre el binomio alimentación y salud, la protección del medio ambiente y los derechos de los animales y una creciente tendencia hacia el vegetarianismo y veganismo, junto con un aumento en el desarrollo de enfermedades patológicas como la intolerancia a la lactosa, mala absorción y alergias a las proteínas de la leche de vaca o la hipercolesterolemia (Prado et al., 2008). Las

bebidas fermentadas a base de cereales además de suponer una elección alternativa a los productos lácteos para estos consumidores, pueden servir como vehículos de diversos compuestos bioactivos, como los antioxidantes o los compuestos fenólicos (Cáceres et al., 2019). Investigaciones recientes han demostrado que los cereales son buenos sustratos para llevar a cabo el desarrollo de bebidas funcionales con propiedades nutricionales mejoradas, a partir de su fermentación por bacterias ácido-lácticas (BAL) (Angelov et al., 2006; Chavan et al., 2018; Gupta & Kumar, 2017). Además, el proceso de fermentación podría verse favorecido teniendo en cuenta el uso de enzimas hidrolíticas, como la α -amilasa y la glucoamilasa, que aumentan la biodisponibilidad de los nutrientes de los cereales, que se encuentran formando parte de macromoléculas como el almidón o las proteínas (Luana et al., 2014).

Los cultivos iniciadores se pueden definir como una mezcla de un elevado número de células “de al menos un microorganismo” que es agregada a una materia prima con el objetivo de elaborar un producto fermentado a través de una fermentación acelerada y dirigida (Leroy & Vuyst, 2004). Las bacterias ácido-lácticas ocupan un papel importante en la realización de este proceso y en su aplicación para la producción de diversos alimentos y bebidas fermentadas (Caplice & Fitzgerald, 1999). En general, estas bacterias son organismos gram positivos, cocos o bacilos, aerobios facultativos o anaerobios, catalasa negativos, no esporulados y con alta tolerancia a pH bajos. Se caracterizan por la producción de ácido láctico como principal producto final del metabolismo catabólico de la glucosa. Además, estas bacterias producen sustancias inhibitorias del crecimiento, como las bacteriocinas, peróxido de hidrógeno o diacilos, que evitan la proliferación de flora patógena en los alimentos (Carr et al., 2017; Vuyst & Leroy, 2007). Son microorganismos cuyo crecimiento óptimo es a un pH aproximado de 5,5 a 5,8 y presenta requerimientos nutricionales complejos de carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos, péptidos, bases nucleotídicas, vitaminas y minerales (Khalid, 2011). El grupo LAB se clasifica en el filo *Fimicutes*, clase *Bacilli* y orden Lactobacillales. Actualmente, se reconocen 6 familias de bacterias ácido-lácticas y 39 géneros. Los géneros LAB incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*; siendo *Lactobacillus* el género más extenso, incluyendo más de 100 especies. Las vías por las que se metabolizan las hexosas dividen a las bacterias ácido-lácticas en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas, en función del producto final de la fermentación. Las homofermentadoras utilizan la glucosa como fuente energética y producen principalmente ácido láctico; los géneros que poseen esta característica son:

Lactococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y determinados *Lactobacillus*. Mientras que, las heterofermentadoras tras la fermentación de la glucosa, además de ácido láctico, dan lugar a otros productos entre los que se incluyen el dióxido de carbono, el ácido acético y el etanol; como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, y determinados *Lactobacillus* (Carr et al., 2017). En la industria alimentaria, determinadas BAL heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas; por la producción de compuestos aromáticos, como el diacetilo o el acetaldehído (Leroy & Vuyst, 2004). Así mismo, a este grupo bacteriano pertenece la mayoría de microorganismos probióticos que son utilizados por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados, predominando los géneros de *Bifidobacterias* y de *Lactobacillus* (Chavan et al., 2018). Según la FAO los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios a la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas. Para que un organismo sea considerado probiótico, debe ser considerado no patógeno y generalmente seguro (GRAS), tolerar pH bajo, tolerar altas concentraciones de sales biliares conjugadas y no conjugadas, ser tolerado por el sistema inmunológico y debe no dar lugar a la formación de anticuerpos. Además, no debe conferir genes de resistencia a antibióticos a patógenos potenciales (FAO/OMS, 2006).

A pesar de que existen numerosos artículos que estudian la adecuación de diversos cultivos bacterianos para la fermentación de harinas de cereales (Helland et al., 2004a, 2004b; Luana et al., 2014; Salmerón et al., 2014), no existe ninguna investigación sobre la aplicación de estos en harinas obtenidas a partir de pan.

En el presente trabajo se llevó a cabo una fermentación de dos mezclas con un 20% de harina de desechos de pan y 80% de agua potable que se inoculó con diversos cultivos iniciadores que contenían bacterias ácido-lácticas. A una de las mezclas se le adicionó una preparación enzimática (α -amilasa y glucoamilasa). Las dos mezclas se inocularon a una concentración 6-7ufc/g y se fermentaron a 38°C durante 24 horas. Los parámetros medidos fueron: recuentos microbianos, pH, acidez cada dos horas durante las primeras 10 horas, a las 24 horas y tras un periodo de almacenamiento a 4°C durante 15 días. A partir de los valores obtenidos se calcularon diversos parámetros de crecimiento microbiano como $V_{m\acute{a}x}$, $\mu_{m\acute{a}x}$ y los tiempos necesarios para alcanzar el pH 5,0 y 4,5. Finalmente, se midió el color a 72 horas y la capacidad de retención de agua a 24 horas y 15 días en el producto fermentado y almacenado a 4°C.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar el uso de diversos cultivos iniciadores de bacterias ácido-lácticas para llevar a cabo la fermentación de una bebida a base de harina de desechos de pan.

2.2 Objetivos específicos

Identificar y comparar el crecimiento y metabolismo de las bacterias ácido-lácticas de los diversos cultivos iniciadores en bebidas fermentadas a base de harina de desechos de pan duro, con y sin adicción de enzimas hidrolíticas.

Evaluar y comparar las características físico-químicas de bebidas fermentadas a base de harina de desechos de pan, con y sin adicción de enzimas hidrolíticas.

Estudiar el número de bacterias ácido-lácticas viables y los parámetros físico-químicos de pH, acidez y capacidad de retención de agua del producto final tras un periodo de almacenamiento de 15 días en refrigeración a 4°C.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores utilizados en este estudio fueron C1: Harvest LB-1 (*Lactobacillus plantarum*), C2: Nu-trish® LGG® DA (*Lactobacillus rhamnosus*), C3: YoFlex® YF-L01 DA (*Streptococcus thermophilus*) y C4: Nu-trish® BY-01 DA (combinación de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), cedidos amablemente por la empresa productora de cultivos CHR Hansen (Hørsholm, Dinamarca).

3.2 Preparación de inóculos de cultivo iniciador

Se calculó una concentración bacteriana inicial entre de 6-7 UFC/g en las bebidas fermentadas a base de harina de pan. Para la inoculación de los cultivos C1 y C2 se tuvieron en cuenta las especificaciones de concentración indicadas por proveedor, 1×10^{11} ufc/g y 5×10^{11} UFC/g, respectivamente. Para los cultivos C3 y C4 se realizó un ensayo previo para obtener la concentración bacteriana (UFC) en un gramo de cultivo, en el cual se realizaron diluciones seriadas para establecer el recuento bacteriano. Estas diluciones se llevaron a cabo en un agua de peptona que contenía 0,8% (p/v) de NaCl (Panreac ITW Companies, Barcelona, España) y 0,5% (p/v) de peptona bacteriológica

(WWR BDH Chemicals, Wayne, Estados Unidos). Las diluciones fueron sembradas por el método de gota, de esta manera se sembraron tres gotas separadas de 10 μ L de cada dilución en placas de Petri que contenían el agar nutritivo específico para cada bacteria. Para el cultivo C3 se utilizó M17 agar (Oxoid, CM0785, Basingstoke, Inglaterra) suplementado con Lactosa al 0,1% y se incubaron a 37°C durante 24 horas en una estufa bacteriológica (Giralt S.A, Barcelona, España). En el cultivo C4 se utilizó para *Bifidobacterium* MRS agar (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals, Radnor, Estado Unidos) suplementado con L-Cisteína al 0,05% (Merck, Darmstadt, Alemania) y Cloruro de Litio al 0,05% (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) y se incubaron en condiciones de anaerobiosis en una estufa bacteriológica (Giralt S.A, Barcelona, España) a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas; para *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* se utilizó MRS agar (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals, Wayne, Estados Unidos) y se incubaron en una estufa bacteriológica (Orbital Shaker, Incubator ES-20, BIOSAN, Madrid, España) a 42°C durante 48 horas; finalmente, para *Streptococcus thermophilus* se utilizó el mismo procedimiento realizado para el cultivo C3. A partir de las mediciones de los recuentos de células viables obtenidas de los dos cultivos, se realizaron los cálculos para obtener una cantidad inicial de bacterias aproximada de 6-7 UFC/g. El cultivo C4 fue ajustado en función de los recuentos obtenidos para *Streptococcus thermophilus*, que fue la bacteria mayoritaria.

3.3 Elaboración de las bebidas fermentadas

La harina de pan fue obtenida a partir de desechos de pan duro (La Tahona de Sahagún, Palencia, España) que fueron molturados en un molino de martillos LM 3100 (Perten Instruments, Huddinge, Suecia) con tamiz de 1000 μ m. En cada ensayo (Fig.1) se elaboraron dos mezclas con un 20% de harina de pan que fue disuelta en agua potable previamente esterilizada a 121°C durante 30 minutos en un autoclave (J.P Selecta, Barcelona, España) Una vez realizada la mezcla, los frascos fueron introducidos en un baño de agua a 75°C durante 5 minutos (J.P Selecta, Barcelona, España). Posteriormente, la mezcla pan y agua fue enfriada a una temperatura de 38°C \pm 2°C. Seguidamente, se inoculó la mezcla con una concentración inicial de 6-7 UFC/g de bacterias ácido-lácticas de cada uno de los cuatro cultivos iniciadores. Así mismo, en una de las mezclas se adicionó una preparación enzimática formada por 180 μ L de α -amilasa y 290 μ L de glucoamilasa, ambas a una concentración del 0,033%. Finalmente, la fermentación de la mezcla se llevó a cabo a durante 24 horas en un baño de agua caliente a 38°C \pm 2°C (J.P Selecta, Barcelona, España).

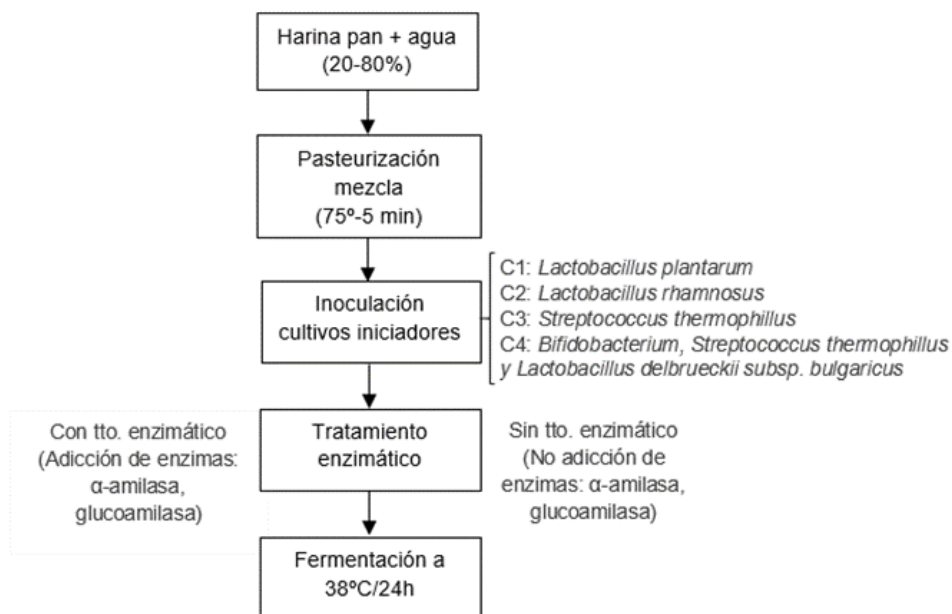


Figura 1. Proceso de elaboración de bebidas fermentadas a base de harina de desechos de pan. (Elaboración propia)

3.4 Métodos analíticos y estadísticos

3.4.1 Parámetros microbiológicos

El recuento de células viables de los cultivos iniciadores se realizó mediante la estimación del número de unidades formadoras de colonias. Se realizaron las diluciones seriadas de la muestra en agua de peptona según lo descrito en la sección 3.2 y se sembraron por el método de gota en placas Petri que contenían el agar específico para cada bacteria. Para los cultivos C1 y con C2 se utilizó MRS agar (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals, Wayne, Estados Unidos) y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Para el cultivo C3 se utilizó M17 agar (Oxoid, CM0785, Hampshire, Reino Unido) suplementado con Lactosa al 0,1% y se incubaron a 37°C durante 24 horas en una estufa bacteriológica (Giralt S.A, Barcelona, España). En el cultivo C4 se utilizó para *Bifidobacterium* MRS agar (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals, Wayne, Estados Unidos) suplementado con L-Cisteína al 0,05% y Cloruro de Litio al 0,05% y se incubaron en condiciones de anaerobiosis en una estufa bacteriológica (Giralt S.A, Barcelona, España) a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas; para *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* se utilizó MRS agar (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals, Wayne, Estados Unidos) y se incubaron en una estufa bacteriológica (Orbital Shaker, Incubator ES-20, BIOSAN, Madrid, España) a 42°C durante 48 horas; finalmente, para *Streptococcus thermophilus* se utilizó el mismo procedimiento realizado para el cultivo C3.

Los recuentos se llevaron a cabo cada 2 horas hasta las 10 horas y posteriormente a las 24 horas. Finalmente, la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas se determinó después de un período de almacenamiento de 15 días a 4°C.

3.4.2 Parámetros físico-químicos

3.4.2.1 Determinación de pH

La determinación de pH se llevó a cabo con la ayuda de un pHmetro Basic 20 (Crison, Barcelona, España) cada 2 horas durante las primeras 10 horas y después a las 24 horas. Posteriormente, también se determinó después de un período de almacenamiento de 3 y 15 días. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

3.4.2.2 Determinación de acidez titulable total (TTA)

La acidez titulable total (TTA) se determinó por duplicado valorando con NaOH 0,1M (WWR BDH Chemicals, Wayne, Estados Unidos) 10g de cada muestra homogeneizada previamente con 10ml de agua destilada, usando fenolftaleína (Alfa Aesar, Massachusetts, Estados Unidos) como indicador. Las mediciones se llevaron a cabo cada dos horas durante las primeras 10 horas y a las 24 horas del proceso de fermentación. Así mismo, se determinó después de un período de almacenamiento de 15 días a 4°C. La acidez fue expresada en % de acidez aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{\text{Gasto de NaOH (ml)} \times N \text{ de NaOH (0,1M)} \times \text{Meq de ácido láctico (0,090)}}{P \text{ muestra (g)}} \times 100$$

3.4.2.3 Color

Para llevar a cabo la determinación de color se recogieron 20 ml de muestra en un tubo falcón estéril. Los tubos que contenían las muestras fueron almacenados durante 72 horas a 4°C. El color se midió con ayuda de una placa Petri (CM-A128) y un colorímetro Konica Minolta CM-700D (Osaka, Japón) con iluminante D65 en modo SCI, un ángulo visual de 10°, una apertura de 11mm para la iluminación y 8mm para la medición. Los parámetros registrados fueron la luminosidad (L*) y la cromaticidad (a* y b*). Los valores obtenidos fueron la media de dos medidas y el valor fue determinado por duplicado.

3.4.2.4 Capacidad de retención de agua

Se colocaron 15 gramos de muestra (W₀) en tubos de centrifuga Falcon de 50 ml y se centrifugaron en una centrifuga Sorvall ST 16R (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) durante 15 minutos a 4000 x g. A continuación, se retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta y se pesó el residuo (W₁). La medida de la capacidad de retención de agua se evaluó por duplicado tras un periodo de fermentación

de 24 horas y después de un almacenamiento a 4°C durante 15 días. La capacidad de retención de agua (WHC) se expresó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{WHC (\%)} = \left(\frac{W1}{W0} \right) \times 100$$

3.4.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Statgraphics 18-X64 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA). Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA), usando el test de Fisher con un nivel de significación del 95% ($p \leq 0,05$). Para modelar las curvas y extraer los parámetros de crecimiento a partir de los recuentos microbianos se utilizó la edición web DMFit (Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido; Barany and Roberts, 1994). Además, para recoger, organizar y realizar medias y desviaciones estándar se utilizó el programa Excel.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Cinética de acidificación

En la Tabla 1 se recogen los principales valores de la cinética de acidificación de diversos cultivos iniciadores utilizados en la fermentación de una bebida a base de harina de pan, con y sin adición de una preparación enzimática (α -amilasa y β -glucoamilasa). La $V_{m\acute{a}x}$ de acidificación obtenida del crecimiento de cultivos iniciadores durante la fermentación de las bebidas se vio incrementada significativamente por el tratamiento enzimático, excepto en el C1 que no mostró efecto. Luana et al., (2014) también observaron un efecto del tratamiento enzimático sobre la velocidad de acidificación en bebidas fermentadas a base avena. Estos autores, encontraron que el tratamiento enzimático fue capaz de duplicar la velocidad de acidificación; en el presente trabajo de investigación dos de los cultivos iniciadores, C3 y C4, duplicaron y triplicaron $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente. Este hecho indica que las enzimas (α -amilasa y glucoamilasa) cuando hidrolizan el almidón podrían incrementar la disponibilidad de hidratos de carbono fermentables por las bacterias ácido-lácticas que componen esos cultivos. Sin embargo, parece ser que los hidratos de carbono obtenidos de esa hidrólisis no fueron utilizados como fuente de energía por *Lb. Plantarum*, especie presente en el cultivo iniciador C1.

Tabla 1. Parámetros de cinética de acidificación obtenidos de diversos cultivos iniciadores utilizando en una bebida de pan⁸, con y sin enzimas².

Muestra	V _{máx.} (upH ^o h ⁻¹)	pH V _{máx.}	t V _{máx.}	t _{pH5}	t _{pH4,5}	pH _{24h}	pH _{15d}	Á.lac 24h (%)	Á.lac 15d (%)
C1 ¹ NE ²	0,12±0,0 1 ^a	5,52±0, 01 ^d	4,5±0, 0 ^b	9,5±0,7 e	21,5±0, 7 ^e	4,39±0, 12 ^e	4,29±0, 08 ^d	0,17±,0 4 ^{ab}	0,20±0, 01 ^a
C1 E	0,13±0,0 1 ^a	5,47±0, 01 ^{cd}	4,5±0, 0 ^b	8,0±0,0 d	9,5±0,7 b	3,96±0, 10 ^{cd}	3,87±0, 06 ^b	0,21±0, 01 ^c	0,26±0, 00 ^c
C2 NE	0,29±0,0 2 ^c	4,89±0, 01 ^{abc}	8,8±0, 4 ^e	7,9±0,4 cd	19,0±0, 0 ^d	4,47±0, 06 ^e	4,62±0, 08 ^e	0,16±0, 00 ^a	0,18±0, 00 ^a
C2 E	0,36±0,0 4 ^d	4,52±0, 06 ^{ab}	8,0±0, 0 ^d	7,5±0,0 cd	9,0±0,0 b	3,18±0, 01 ^a	3,23±0, 00 ^a	0,47±0, 00 ^f	0,62±0, 01 ^e
C3 NE	0,10±0,0 0 ^a	4,43±0, 04 ^a	24,0± 0,0 ^f	18,2±0, 1 ^f	23,3±0, 4 ^f	4,44±0, 03 ^e	4,38±0, 08 ^d	0,20±0, 01 ^{bc}	0,19±0, 01 ^a
C3 E	0,27±0,0 2 ^{bc}	5,09±0, 04 ^{bcd}	6,0±0, 0 ^c	6,3±0,4 b	9,5±0,7 b	3,91±0, 02 ^c	3,87±0, 06 ^b	0,25±0, 00 ^d	0,28±0, 01 ^c
C4 NE	0,13±0,0 1 ^a	5,50±0, 02 ^{cd}	5,8±0, 4 ^c	7,3±0,2 c	16±0,0 ^c	4,07±0, 02 ^d	4,07±0, 04 ^c	0,22±0, 00 ^{cd}	0,23±0, 01 ^b
C4 E	0,24±0,0 1 ^b	5,15±0, 75 ^{cd}	2,5±0, 0 ^a	4,1±0,1 a	6,5±0,0 a	3,72±0, 01 ^b	3,78±0, 02 ^b	0,30±0, 00 ^e	0,32±0, 00 ^d

Los valores son las medidas de dos experimentos independientes y se expresan como media ± SD (n=2). Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no fueron significativamente diferentes con un p ≤ 0,05.

⁸Bebida de desechos de pan: mezcla 20 harina de pan:80 agua potable (p/v).

¹Cultivos iniciadores utilizados: C1=*Lactobacillus plantarum*, C2=*Lactobacillus rhamnosus*, C3=*Streptococcus thermophilus* y C4= cultivo mixto de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

² El tratamiento aplicado: NE= sin enzima y E= mezcla de enzimas (α-amilasa y glucoamilasa, ambas a una concentración de 0,033%).

³ Las abreviaturas son: V_{máx.} (upH^o h⁻¹) = tasa máxima de acidificación, pH_{v máx.} = pH al cual se alcanza la máxima velocidad de acidificación, t_{pH5,0} = tiempo necesario para alcanzar un pH de 5.0, t_{pH4,5} = pH necesario para alcanzar un pH=4.5 (final de la fermentación); pH_{24h}: pH alcanzado a las 24 horas de fermentación; pH_{15d}: pH alcanzado tras un almacenamiento en refrigeración a 4°C durante 15 días, Á.lac_{24h}(%) = porcentaje de ácido láctico alcanzado a las 24 horas de fermentación, expresado en porcentaje; Á.lac_{15d}(%) = porcentaje de ácido láctico alcanzado tras un almacenamiento en refrigeración a 4°C durante 15 días, expresado en porcentaje.

El cultivo iniciador que mostró mayor V_{máx.} de acidificación fue el C2, tanto con tratamiento enzimático como sin él; mientras que, el cultivo C3 sin tratamiento enzimático fue el que obtuvo el menor valor de V_{máx.} (0,10±0,00). Otros autores también han observado una buena tasa de acidificación de *Lb. rhamnosus* en sustratos de cereales y pseudocereales (Kocková et al., 2013) y en papillas de maíz con cebada malteada (Helland et al., 2004a). El cultivo C4 con tratamiento enzimático fue el más rápido en alcanzar la V_{máx.}, a diferencia del cultivo C3 sin tratamiento enzimático que requirió 24 horas de fermentación para alcanza su V_{máx.}. Así mismo, la presencia de enzimas redujo significativamente el tiempo para conseguir el pH 5 y 4,5, siendo el cultivo C4 con tratamiento enzimático el que consiguió disminuir ese pH en menor tiempo (6,5±0,0). Luana et al., (2014) encontraron que fueron necesarias 8 horas para alcanzar un pH de 4,2 con adicción de enzimas hidrolíticas, mientras que sin su adicción fueron necesarias 12 horas de fermentación. En el presente trabajo de investigación, como ya se mencionó anteriormente, el cultivo C4 con tratamiento enzimático necesitó 6,3 horas para conseguir un pH 4,5. Sin embargo, el resto de cultivo requirieron más de 9 horas de fermentación con tratamiento enzimático y más de 16 horas sin él.

El pH alcanzado tras finalizar el proceso de fermentación de 24 horas también se vio influido significativamente por el tratamiento enzimático para los cuatro cultivos iniciadores ensayados y fueron los que mostraron los valores de pH más bajos, comprendidos entre 3,18 y 3,96. La bebida fermentada con el cultivo C2 y tratamiento enzimático fue la que mostró el valor de pH más bajo. Los valores de pH alcanzados de las bebidas fermentadas tras 15 días de almacenamiento a 4°C mostraron valores muy similares a los encontrados a las 24 horas. Otros autores también han obtenido valores de pH inferiores a 4,5 a 24 horas cuando estudiaron la fermentación de bebidas con bacterias probióticas (Cristina et al., 2014) y tras un periodo de almacenamiento a 4°C durante 14 días (Bernat et al., 2014; Casarotti et al., 2018). Estos valores según Bernat et al., (2014) podrían ser indeseables para los consumidores desde el punto de vista sensorial. Sin embargo, un pH bajo permite mejorar la supervivencia de las bacterias ácido lácticas, con actividad antimicrobiana e impedir el crecimiento de bacterias patógenas en el producto (Kailasapathy & Chin, 2000).

Como era de esperar, el contenido de ácido láctico se vio significativamente influido por el tratamiento enzimático en todas las bebidas fermentadas, al afectar sobre la acidificación y producir una mayor cantidad de este ácido. La bebida con el cultivo C2 y con tratamiento enzimático fue la que mostró un mayor porcentaje de este ácido; mientras que, la bebida con el cultivo C4 sin tratamiento enzimático fue la que obtuvo un mayor porcentaje de ácido láctico tras finalizar el proceso de fermentación de 24 horas. Los valores de acidez obtenidos en este estudio fueron ligeramente superiores a los encontrados por diversos autores en productos fermentados a base de frutos secos y cereales (Bernat et al., 2014; Salmerón et al., 2015), quienes encontraron valores de ácido láctico entre 0,04-0,14% y 0,104%, respectivamente. Parece ser que las bacterias ácido lácticas cuando utilizan sustratos a base de cereales para la fermentación producen una menor cantidad de ácido láctico respecto al yogur estándar, que alcanza valores de este ácido entre 0,8 y 1 g por 100 ml (Tamime & Robinson, 2000). Esta diferencia en la producción de ácido láctico podría deberse a una mayor cantidad de azúcares fermentables en el yogur (lactosa). El cultivo C2 con tratamiento enzimático que contenía *Lb. rhamnosus* GG fue el que mejor utilizó los hidratos carbono derivados de la hidrólisis el almidón presente en la bebida a base de harina de pan, alcanzando una cantidad de ácido láctico de 0.47 % y un pH de 3,18 a 24 horas. Helland et al., (2004a) también observaron una mayor producción de ácido láctico junto con la reducción más rápida y acentuada del pH en las papillas de maíz que fueron fermentadas con *Lb. rhamnosus* GG en comparación con el resto de bacterias ácido-lácticas, como resultado de su óptimo crecimiento. Además, parece ser que este

microorganismo se adapta adecuadamente a la temperatura de almacenamiento 4°C, observándose un incremento de 0.15% de ácido láctico a los 15 días de almacenamiento.

4.2 Cinética de crecimiento y recuento microbiano

En la Tabla 2 se recogen los principales valores de los parámetros de crecimiento y los recuentos microbianos a 10, 24 horas y 15 días de los cultivos iniciadores utilizados durante fermentación de una bebida a base de harina de pan, con y sin adición de una preparación enzimática (α -amilasa y glucoamilasa). La $\mu_{\text{máx}}$ de crecimiento de los cultivos indicadores estudiados se vio influida significativamente por el tratamiento enzimático, con excepción del C1 que contenía *Lb. plantarum*. El cultivo C4 con tratamiento enzimático fue el que mostró la mayor $\mu_{\text{máx}}$ ($p < 0,05$); mientras que, el cultivo C1 con y sin tratamiento enzimático fue el que mostró el menor valor de ese parámetro. La velocidad de crecimiento de *Lb. plantarum* obtenida en el presente trabajo ($0,10 \pm 0,01 - 0,12 \pm 0,01$) fue inferior a la mostrada por Charalampopoulos et al., (2002) en la fermentación de un sustrato a base de harina de malta ($0,41 \pm 0,03$). Este hecho podría deberse a un menor contenido de monosacáridos (glucosa y fructosa) y disacáridos (maltosa y sacarosa) de las bebidas elaboradas en el presente trabajo, que parecen ser necesarios para un crecimiento óptimo de esta bacteria (Charalampopoulos et al., 2002).

Tabla 2. Parámetros de la cinética de crecimiento obtenidos de diversos cultivos iniciadores utilizando en una bebida de pan⁸, con y sin enzimas².

Muestra	$\mu_{\text{máx}}^{3,4}$ (Log ufc/(g ³ h))	N.º inicial (Log ufc/g)	N.º máx (Log ufc/g)	Log ufc/g t_{10h}	Log ufc/g t_{24h}	Log ufc/g t_{15d}
C1 ¹ NE ²	0,10±0,01 ^a	7,08±0,03 ^b	8,35±0,07 ^b	7,95±0,00 ^{bc}	8,30±0,00 ^{bc}	7,85±0,07 ^b
C1 E	0,12±0,01 ^a	7,02±0,06 ^b	8,29±0,00 ^b	8,05±0,07 ^c	8,35±0,07 ^c	8,25±0,07 ^c
C2 NE	0,23±0,01 ^b	6,16±0,14 ^a	8,13±0,27 ^b	8,05±0,21 ^c	8,15±0,21 ^b	7,90±0,14 ^b
C2 E	0,26±0,06 ^b	6,23±0,02 ^a	8,80±0,00 ^c	8,10±0,00 ^c	8,80±0,00 ^d	8,75±0,07 ^d
C3 NE	0,13±0,03 ^a	6,31±0,04 ^a	7,75±0,07 ^a	6,3±0,00 ^a	7,75±0,07 ^a	6,40±0,14 ^a
C3 E	0,27±0,02 ^{bc}	6,29±0,01 ^a	7,78±0,01 ^a	7,80±0,00 ^b	7,80±0,00 ^a	8,15±0,07 ^c
C4 NE	0,26±0,00 ^b	11,13±0,14 ^c	13,39±0,01 ^e	13,30±0,00 ^e	11,90±0,00 ^e	10,90±0,00 ^d
C4 E	0,32±0,03 ^c	10,81±0,03 ^c	12,93±0,06 ^d	13,00±0,00 ^d	12,30±0,00 ^f	8,90±0,00 ^d

Los valores son las medidas de dos experimentos independientes y se expresan como media \pm SD (n=2). Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no fueron significativamente diferentes con un $p \leq 0,05$.

⁸Bebida de desechos de pan: mezcla 20 harina de pan:80 agua potable (p/v).

¹Los cultivos iniciadores utilizados fueron los siguientes: C1=*Lactobacillus plantarum*, C2=*Lactobacillus rhamnosus*, C3=*Streptococcus thermophilus* y C4=combinación de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

²El tratamiento aplicado: NE= sin enzima y E= mezcla de enzimas (α -amilasa y glucoamilasa, ambas a una concentración de 0,033%).

³ Las abreviaturas son: $\mu_{m\acute{a}x.}$ = velocidad máxima de crecimiento bacteriano expresado en Log ufc/g, N° inicial = número de microorganismos iniciales expresado en log ufc/g, N° máx (Log ufc/g) = número máximo de microorganismos expresado en log ufc/g, Log ufc/g t_{10h} = número de microorganismos a 10 horas de la fermentación expresado en log ufc/g, Log ufc/g t_{24h} = número de microorganismos a 24 horas de la fermentación expresado en log ufc/g (fin de la fermentación), Log ufc/g t_{15d} = número de microorganismos tras un periodo de almacenamiento 15 días de la bebida fermentada.

⁴ Los valores de cinética de crecimiento se obtuvieron modelando con el DMFit web edition (Barany and Roberts, 1994) siempre que la R fue > a 0,93 (C1 NE: 0,94; C1 E: 0,97; C2 NE: 0,98; C2 E: 0,99; C3 NE: 0,98; C3 E: 0,99; C4 NE: 0,95; C4 E: 0,98).

El número inicial de microorganismos estuvo comprendido entre 6 y 7 Log ufc/g para todos los cultivos, excepto para el cultivo C4 cuyo número inicial de colonias fue 11 Log ufc/g. El número máximo de microorganismos alcanzado fue de 8,80 log ufc/g para cultivo C2 con tratamiento enzimático, mostrando diferencias significativas con resto el resto de cultivo. Este dato fue muy similar a los mostrados por otros autores en sustratos de cereales y pseudocereales (Kocková et al., 2013) o en pudines de cereales a base de leche y agua (Helland et al., 2004b) y papillas de maíz con cebada malteada (Helland et al., 2004a). Así mismo, Helland et al., (2004a) también observaron recuentos de *Lb. rhamnosus* significativamente más altos en comparación de otras bacterias ácido-lácticas, cuando se utilizaron para la fermentación de papillas de maíz con cebada malteada. Este hecho podría deberse al menor porcentaje de proteínas del maíz respecto al trigo, y, por tanto, mayor contenido en almidón que permite una mayor capacidad de generar azúcares fermentables. El cultivo C4 con tratamiento enzimático también mostró un número de microorganismos elevado (12,3 Log ufc/g), pero este recuento es la suma de dos de las tres bacterias que contenía el cultivo iniciador. Mientras que, el cultivo que contenía *Streptococcus thermophilus* fue el que obtuvo un menor número de microorganismos a las 24 horas del proceso de fermentación (ver Fig. 2), mostrando diferencias significativas. Este hecho podría deberse a que este microorganismos no tiene preferencia por la glucosa como principal fuente de energía, en comparación con otras bacterias gram positivas (Fontaine et al., 2005; Iyer et al., 2010).

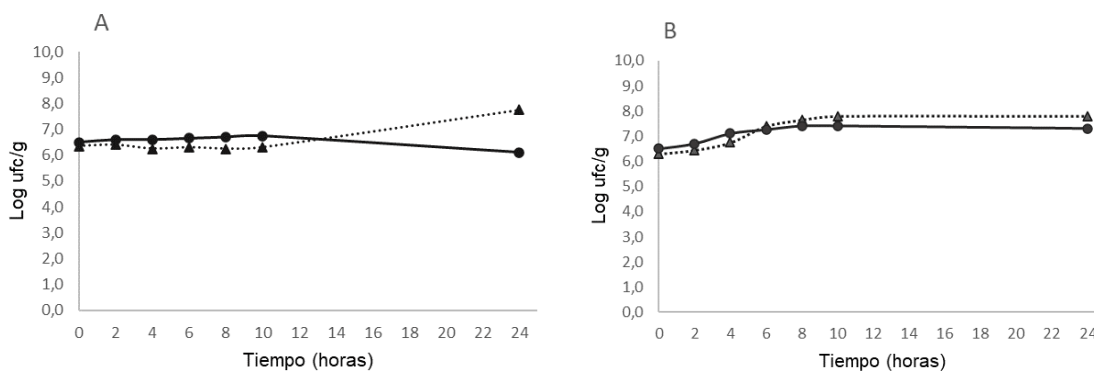


Figura 2. Crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en cultivo C3 y C4 sin tratamiento y con tratamiento enzimático. A: Crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en cultivo C3 sin tratamiento enzimático (—●—) vs. Crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en cultivo C4 (····▲····) sin tratamiento enzimático. B: Crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en cultivo C3 con tratamiento enzimático (—●—) vs. Crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en cultivo C4 (····▲····) con tratamiento enzimático.

El tratamiento enzimático también parece influir sobre los recuentos de los distintos cultivos, observándose un menor contenido de microorganismos después de 15 días de incubación en los cultivos sin tratamiento enzimático, excepto para el cultivo C4 con tratamiento enzimático que mostró un menor recuento en ese tiempo de almacenamiento. En este trabajo de investigación el C4 E mostró una reducción 3,4 Log ufc/g. La baja viabilidad mostrada por este cultivo puede ser debida a diversas razones; i) el crecimiento y la viabilidad de las bifidobacterias parecen estar influidos por los péptidos y aminoácidos derivados de la proteólisis producida por el crecimiento de bacterias como *Lactobacillus spp.* (Gomes et al., 1998), en este producto fermentado *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* no creció adecuadamente, i) así mismo, los lactobacilos también pueden disminuir el potencial de oxido-reducción mejorando el ambiente anaerobio del producto fermentado (Gomes et al., 1998) y ii) teniendo en cuenta que *Bifidobacterium* tiene un pH óptimo de crecimiento entre 6-7 y por lo tanto a un pH inferior de 4,4 podría no sobrevivir (Gomes & Malcata, 1999), pH superior al encontrado en este estudio (ver Tabla 1).

Todas las bebidas a base de harina de pan formuladas en este estudio permitieron un buen crecimiento de los cultivos iniciadores, pudiendo ser una fuente de probióticos alternativa a los productos lácteos para aquellas personas vegetarianas o veganas, intolerantes a la lactosa o alérgicas a la proteína de leche. Varios autores también han demostrado el crecimiento y supervivencia de diferentes cepas probióticas en productos fermentados a base de cereales (Bernat et al., 2014; Emma et al., 2017; Helland et al., 2004b; Salmerón et al., 2015). Se ha sugerido que los productos fermentados requieren una concentración de bacterias viables, como las probióticas, superior a 7 Log UFC/g para producir efectos beneficiosos sobre la salud (Sanz & Dalmau, 2008). En este trabajo de investigación todos cultivos mostraron recuentos superiores a los anteriormente mencionados, excepto el cultivo C3 NE. Por lo tanto, la bebida fermentada realizada en el presente trabajo permite mantener una concentración adecuada de células viables que pueden producir esos efectos saludables.

4.3 Capacidad de retención de agua y color

En la Tabla 3 se recogen la capacidad de retención de agua y los parámetros L*, a y b de las bebidas a base de harina de pan con diversos cultivos iniciadores, con y sin adición de una preparación enzimática (α -amilasa y glucoamilasa). El tratamiento enzimático influyó significativamente sobre la capacidad de retención de agua (WHC%) mostrando valores más bajos a las 24 horas de fermentación. Las bebidas fermentadas con los cultivos C1 y C2 sin tratamiento enzimático fueron las que mostraron una mayor

capacidad de retención de agua (WHC%) a las 24 horas; mientras que, la menor capacidad de retención de agua fue observada para los cultivos con tratamiento enzimático. La capacidad de retención de agua (WHC%) a los 15 días mostró la misma tendencia que a 24 horas. Estos resultados fueron similares a los observados por Luana et al., (2014) quienes encontraron una menor capacidad de retención de agua en bebidas de avena fermentadas con tratamiento enzimático, 48% de WHC. Estos autores, también encontraron una menor capacidad de retención de agua en las bebidas fermentadas sin tratamiento enzimático (52% WHC) que en el presente trabajo de investigación. Las diferencias entre este estudio y el de los autores antes mencionados puede deberse dos razones principalmente; i) la diferencia del sustrato de fermentación, ii) al tipo de bacterias utilizadas, en este estudio respecto a la utiliza por esos autores. Cabe destacar la elevada capacidad de retención de agua que mostraron los cultivos sin tratamiento enzimático C1, C2 frente a la baja WHC de los cultivos C3 y C4. Esta diferencia puede ser debida a que estos últimos cultivos incluían a *S. thermophilus*, bacteria que presenta: i) actividad proteolítica, que puede generar los aminoácidos necesarios para su crecimiento (Iyer et al., 2010) y que por lo tanto hidrolizó en mayor medida las proteínas presentes en la harina de pan y ii) a cierta capacidad de esta bacteria para degradar polímeros complejos como el almidón (Fontaine et al., 2005).

Tabla 3. Características de capacidad de retención de agua y color de bebidas vegetales fermentadas a base de harina de pan¹, con y sin adición de una preparación enzimática².

Muestra	WHC _{24h} (%) ³	WHC _{15d} (%)	L*	a*	b*
C1 ¹ NE ²	66,7±2,4 ^c	58,1±4,3 ^c	60,88±0,76 ^d	3,83±0,31 ^{ab}	15,75±1,15 ^{abcd}
C1 E	38,4±2,3 ^a	41,7±0,9 ^a	57,97±0,06 ^{bc}	4,09±0,04 ^b	16,47±0,24 ^{abcd}
C2 NE	66,7±0,0 ^c	60,2±2,5 ^c	61,23±0,13 ^d	3,59±0,04 ^a	15,32±0,15 ^a
C2 E	40,0±0,0 ^a	41,5±0,1 ^a	58,99±0,18 ^c	3,92±0,06 ^{ab}	16,98±0,28 ^d
C3 NE	50,0±0,0 ^b	48,6±4,6 ^b	58,52±0,52 ^c	4,20±0,26 ^{bc}	15,68±0,18 ^{abc}
C3 E	41,7±2,4 ^a	41,2±1,1 ^a	56,81±1,25 ^{ab}	4,25±0,20 ^{bc}	16,67±0,39 ^{bcd}
C4 NE	53,4±0,0 ^b	51,0±0,1 ^b	58,29±0,33 ^c	4,10±0,06 ^b	15,43±0,04 ^{ab}
C4 E	40,9±1,2 ^a	41,8±2,2 ^a	56,09±0,04 ^a	4,62±0,37 ^c	16,72±0,82 ^{cd}

Los valores son las medidas de dos experimentos independientes y se expresan como media \pm SD (n=2). Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no fueron significativamente diferentes con un $p \leq 0,05$.

¹Los cultivos iniciadores utilizados fueron los siguientes: C1=*Lactobacillus plantarum*, C2=*Lactobacillus rhamnosus*, C3=*Streptococcus thermophilus* y C4=combinación de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

²El tratamiento aplicado: NE= sin enzima y E= mezcla de enzimas (α -amilasa y glucoamilasa, ambas a una concentración de 0,033%).

³Las abreviaturas son: WHC (%) = capacidad de retención de agua expresado en porcentaje, parámetros del color (L* = luminosidad, a* y b* = cromaticidad).

Respecto a los parámetros del color, la luminosidad (L^*) de las bebidas fermentadas se vio significativamente influida por el tratamiento enzimático, produciendo una disminución de luminosidad en las bebidas fermentadas con tratamiento enzimático, con excepción del cultivo C2 E que mostró valores similares a los cultivos C3 NE y C4 NE. La bebida fermentada con el cultivo C2 sin tratamiento enzimático fue la que mostró la mayor luminosidad siendo significativamente superior a todas las otras bebidas fermentadas, con excepción del C1. Estos fueron similares a los encontrados por otros autores (Luana et al., 2014) quienes encontraron una mayor luminosidad para los productos fermentados sin tratamiento enzimático. Este hecho puede ser debido a que el tratamiento enzimático al hidrolizar el almidón deja pasar las ondas luz, evitando su refracción. El tratamiento enzimático no mostró un efecto significativo claro sobre los valores a^* . Sin embargo, el cultivo C4 con tratamiento enzimático mostró valores superiores de las tonalidades rojas; mientras que, el cultivo C2 sin tratamiento enzimático fue el que mostró los valores más bajos de este parámetro. De la misma manera, no se observa un efecto claro del tratamiento enzimático sobre los valores de b^* , siendo el cultivo C2, con tratamiento enzimático, el que mostró los valores más altos color amarillo ($16,98 \pm 0,28$) y fueron significativamente diferentes con respecto a los cultivos que no recibieron el tratamiento enzimático, con excepción del cultivo C. Este hecho puede deberse a que la dispersión de la luz está relacionada con el tamaño de la partícula de la solución coloidal, es decir, posiblemente una reducción del tamaño de partícula puede incrementar los valores de b^* (color amarillo) y disminuir los valores luminosidad.

5 CONCLUSIONES

La harina de desechos de pan es un buen sustrato para el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas presentes en los cuatro cultivos iniciadores, a excepción del cultivo C1 que contenía *Lactobacillus plantarum*.

El tratamiento enzimático duplicó y triplicó los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y $\mu_{m\acute{a}x}$ de los cultivos iniciadores utilizados en la fermentación de las bebidas a base de harina de pan, a excepción del cultivo C1 que contenía *Lactobacillus plantarum*.

Entre los cultivos iniciadores puros, *Lactobacillus rhamnosus* fue el que mostró una velocidad de acidificación más alta y una mejor viabilidad en las bebidas fermentadas.

El cultivo que contenía *Bifidobacterium* y *S. thermophilus* fue el que mostró una menor viabilidad bacteriana tras el periodo de almacenamiento a 4°C a 15.

El tratamiento enzimático produjo una disminución en la capacidad de retención de agua en las bebidas fermentadas.

La combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y tratamiento enzimático resultó ser la mejor opción para la fermentación de la bebida a base de desechos de pan.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Adessi, A., Venturi, M., Candelieri, F., Galli, V., Granchi, L., & Philippis, R. De. (2018). Bread wastes to energy: Sequential lactic and photo-fermentation for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(20), 9569-9576. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.04.053>
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., & Hristozova, T. (2006). Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.015>
- Bernat, N., Ch afer, M., Chiralt, A., & Gonz alez, C. (2014). Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(2007), 2553-2562. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12585>
- Blandino, A., Al-aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527-543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7)
- Bo, L., Jose, V., Mari, F., & Gonzalez-ronquillo, M. (2015). The effect of feeding fresh swine manure , poultry waste , urea , molasses and bakery by-products ensiled for lambs. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 4, 273-278. <https://doi.org/10.1007/s40093-015-0106-2>
- Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan., (2019). https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2019-6994
- Cáceres, P. J., Peñas, E., Martínez-villaluenga, C., García-mora, P., & Frías, J. (2019). Development of a multifunctional yogurt-like product from germinated brown rice. *LWT - Food Science and Technology*, 99(July 2018), 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.008>
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations : role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2017). The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Casarotti, S. N., Borgonovi, T. F., Batista, C. L. F. M., & Penna, A. L. B. (2018). Guava ,

- orange and passion fruit by-products : Characterization and its impacts on kinetics of acidification and properties of probiotic fermented products. *LWT - Food Science and Technology*, 98(August), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.010>
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S., & Webb, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 851-859.
- Chavan, M., Gat, Y., Harmalkar, M., & Waghmare, R. (2018). Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. *LWT - Food Science and Technology*, 91(October 2017), 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.070>
- Coda, R., Cagno, R. Di, Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2014). Sourdough lactic acid bacteria: Exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.018>
- Cristina, C., Santos, A., Libeck, S., & Schwan, R. F. (2014). Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.011>
- Emma, F., Urquizo, L., Melissa, S., Torres, G., Tolonen, T., Jaakkola, M., Grazzia, M., Wright, A. Von, Hannu, R. R., & Carme, K. (2017). Development of a fermented quinoa based beverage. *Food Science and Nutrition*, 5(July 2016), 602-608. <https://doi.org/10.1002/fsn3.436>
- Europea, C. (2008). *Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008 , sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas*. 34(Estrasburgo, Francia), 99-126.
- FAO/OMS. (2006). *Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*.
- Fontaine, L., Hols, P., Prozzi, D., Leblond-bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S. D., Gue, E., Renault, P., & Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 435-463. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.008>
- Gomes, A. M. P., & Malcata, F. X. (1999). Bifidobacterium spp. and Lactobacillus

- acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 139-157.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X., & Klaver, F. A. M. (1998). Growth Enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by Milk Hydrolyzates. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2817-2825. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75840-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75840-0)
- Gupta, M., & Kumar, B. (2017). Development of fermented oat fl our beverage as a potential probiotic vehicle. *Food Bioscience*, 20(September 2016), 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.007>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., & Sonesson, U. (2011). Global Food Losses and Food Waste. *Save Food Congress*, May.
- Helland, M. H., Wicklund, T., & Narvhus, J. A. (2004a). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.007>
- Helland, M. H., Wicklund, T., & Narvhus, J. A. (2004b). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal*, 14, 957-965. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.03.008>
- Immonen, M., Maina, N. H., Wang, Y., Coda, R., & Katina, K. (2020). Waste bread recycling as a baking ingredient by tailored lactic acid fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 327(January), 108652. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108652>
- Iyer, R., Tomar, S. K., Maheswari, T. U., & Singh, R. (2010). Streptococcus thermophilus strains : Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20(3), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.10.005>
- Jurgilevich, A., Birge, T., Kentala-lehtonen, J., Korhonen-kurki, K., Pietikäinen, J., Saikku, L., & Schösler, H. (2016). Transition towards Circular Economy in the Food System. *Sustainability*, 8(1), 69. <https://doi.org/10.3390/su8010069>
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp . *Immunology and Cell Biology*, 78, 80-88. <https://doi.org/10.1046/j.1440->

1711.2000.00886.x

- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
- Kocková, M., Dilongová, M., Hybenová, E., & Valík, L. (2013). Evaluation of Cereals and Pseudocereals Suitability for the Development of New Probiotic Foods. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Leroy, F., & Vuyst, L. De. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Luana, N., Rossana, C., Antonio, J., Kaisa, P., Marco, G., & Giuseppe, C. (2014). Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.004>
- Melikoglu, M., & Webb, C. (2013). Chapter 4 - Use of Waste Bread to Produce Fermentation Products. En *Food Industry Wastes* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00004-4>
- Mena, C., Adenso-diaz, B., & Yurt, O. (2011). The causes of food waste in the supplier–retailer interface: Evidences from the UK and Spain. *Resources, Conservation and Recycling*, 55(6), 648-658. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.09.006>
- Montemurro, M., Pontonio, E., Coda, R., & Rizzello, C. G. (2021). Plant-Based Alternatives to Yogurt : State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. *Foods*, 10(2), 316.
- Panahi-kalamuei, M., Amiri, O., & Salavati-niasari, M. (2020). Green hydrothermal synthesis of high quality single and few layers graphene sheets by bread. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(3), 2679-2690. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.01.001>
- Petrova, P., & Petrov, K. (2020). Lactic Acid Fermentation of Cereals and Pseudocereals: Ancient Nutritional Biotechnologies. *Nutrients*, 12(4), 1118.
- Poutanen, K. (2012). Past and future of cereal grains as food for health. *Trends in Food Science & Technology*, 25(2), 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.02.003>
- Prado, C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic

- beverages. *Food Research International*, 41, 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- Salmerón, I., Thomas, K., & Pandiella, S. S. (2014). Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.008>
- Salmerón, I., Thomas, K., & Pandiella, S. S. (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*, 15, 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.012>
- Sanz, Y., & Dalmau, J. (2008). Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediátrica Española*, 66(1), 27-31. <https://doi.org/10.1080/10408690490263774>
- Smith, J. P., Daifas, D. P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., & El-Khoury, A. (2010). Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products — A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 19-55. <https://doi.org/10.1080/10408690490263774>
- Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004>
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2000). *Yoghurt* (3rd Editio). Science and Technology.
- Torres, C., Ramírez, N., Londoño, L., Martínez, G., Díaz, R., Navarro, V., & Aguilar, C. (2018). Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2(September), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00052>
- Vilariño, M. V., Franco, C., & Quarrington, C. (2017). Food loss and Waste Reduction as an Integral Part of a Circular Economy. *Frontiers in Environmental Science*, 5(May). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00021>
- Vuyst, L. De, & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria : Production , Purification, and Food. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199. <https://doi.org/10.1159/000104752>

Zhou, M., Robards, K., Glennie-holmes, M., & Helliwell, S. (1999). Analysis of Volatile Compounds and Their Contribution to Flavor in Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3941–3953.