

Trabajo de Fin de Grado

Utilización de un cultivo probiótico para  
elaborar una bebida fermentada usando  
harina de pan reciclada

Nutrición Humana y Dietética



**Autor:** Don. Jose Carlos Cáceres Alonso

**Tutor:** Dña. Irma Caro Canales

**Curso 2021 - 2022**

**Facultad de Medicina**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Irma Caro Canales quiero agradecer el tiempo que ha dedicado para transmitirme la pasión que siente por la investigación, así como la ayuda que me ha brindado en la realización de cada experimento, interpretación de los datos y redacción del trabajo y la paciencia que ha tenido conmigo.

Al igual, dar las gracias al departamento de pediatría, inmunología, obstetricia y ginecología, nutrición y bromatología, psiquiatría e historia de la ciencia, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, al cual pertenece mi tutora, por facilitarme el material necesario para su puesta en práctica, y también al Dr. Javier Arias por su ayuda prestada para la realización de los ensayos.

También quisiera agradecer a mis compañeros el apoyo que me han mostrado, y a todos los profesores del Grado de Nutrición Humana y Dietética por su implicación en transmitirnos sus conocimientos y prepararnos como profesionales de cara al mundo laboral.

Por último, quisiera agradecer a mi familia, ya que sin ellos nada de esto hubiese sido posible.

## **SIGLA Y ABREVIATURAS**

**-FAO:** La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**-BAL:** Bacterias ácido lácticas

**- CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**- GRAS:** *General Regarded As Safe*)

**-FDA:** *Food Drug Administration*

**-EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

**- ISAPP:** *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*

**- MRSA:** Agar Man Rogosa y Sharpe

**- M17:** Oxoid, CM0785

## Índice General

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Desperdicio alimentario .....	6
1.2 Bacterias ácido lácticas.....	7
1.3 Tipos de bacterias ácido lácticas.....	8
1.4 <i>Bifidobacterium</i> .....	9
1.5 Cultivos iniciadores.....	10
1.6 Alimentos funcionales: Prebióticos, Probióticos y Postbióticos.....	12
1.7 Pan blanco VS Pan integral.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Cultivo .....	16
4.2 Recuento de <i>Bifidobacterium</i> en Nutrish BY a distintas condiciones de CO <sub>2</sub> .....	17
4.3 Preparación de la bebida fermentada.....	18
4.3.1 Fermentación inoculación e incubación.....	18
4.3.2 Recuentos de Microorganismos.....	19
4.4 Tratamiento de resultados.....	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6. CONCLUSIÓN.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras:

- Figura 1.** Diagrama del procedimiento para la elaboración de los ensayos. .... 21
- Figura 2.** Modelaje de la velocidad de crecimiento (ufc/mL) de los microorganismos *Lactobacillus delbruecki subp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* . .... 25
- Figura 3.** Modelaje de la velocidad de crecimiento (ufc/mL) de *Bifidobacterium*..... 276
- Figura 4.** Disminución del pH de la bebida fermentada por el cultivo Nutrish BY ..... 30

### Tablas:

- Tabla 1.** Composición pan blanco vs pan integral..... 14
- Tabla 2.** Interpretación del score generado por el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) 18
- Tabla 3.** Recuentos de *Bifidobacterium* utilizando distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> de incubación..... 23
- Tabla 4.** Identificación de las colonias aisladas a partir de distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> de incubación. .... 23
- Tabla 5.** Parámetros de crecimiento microbiano de los distintos grupos microbianos que componen el estrter Nutrish BY ..... 28
- Tabla 6.** Velocidad máxima de acidificación del Nutrish BY de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*..... 29

# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1 Desperdicio alimentario

El desperdicio alimentario es un grave problema desde el punto de vista de la sostenibilidad y la seguridad alimentaria (Gustavsson et al., 2011; Otlés et al., 2015).

El volumen de producción de alimento en Europa se estima alrededor de los 400 millones de toneladas al año. En España, se cultiva un medio de 6 millones de hectáreas de cereal, siendo el sector con mayor base territorial. En el año 2020 se estimó una producción alrededor de las 25,4 millones de toneladas siendo en su mayoría de cebada y trigo blando. Castilla y León es la Comunidad Autónoma que produce más cantidad de trigo blando y cebada (2,19 millones t y 2,23 millones de t). De acuerdo con Forbes et al 2021 el 17 % de los alimentos disponibles para el consumo se desperdicia. Del total del cereal europeo producido se pierde un 5% durante el procesamiento (Gustavsson et al., 2011). En España, el pan fresco es alimento después de las frutas, verduras y hortalizas el que más se desperdicia, alcanzando más de 20, 000 toneladas por cada seis meses (MAPA, 2021). España, ha aprobado recientemente un proyecto de ley contra el desperdicio alimentario, para evitar el desperdicio alimentario, que además tiene como objetivo reintroducir los alimentos en toda la cadena alimentaria, desde la cosecha hasta el consumo (MAPA, 2022), de esta forma cumpliría los criterios de desarrollo sostenible (ODS) marcados por la ONU (Organización de Naciones Unidas). Debido a las pérdidas de cereal durante su procesamiento y a la generación de residuos alimentarios a partir del pan tenemos la obligación de dar una tercera vida a este producto ya existe una población en torno a los 800 millones de personas con una subalimentación, por lo tanto, debemos aplicar prácticas de eficiencia de recursos para evitar el desperdicio de materiales alimentarios comestibles (FAO et al., 2014).

Para ayudar a mitigar este desperdicio surgen diversas formas innovadoras que permiten aprovechar los flujos secundarios no solo para la eficiencia de los costes sino también para lograr sistemas alimentarios sostenibles en una economía circular. Por consiguiente para cumplir con los principios de eficiencia y sostenibilidad surge la idea de conocer si los microorganismos probióticos son capaces de sobrevivir en una matriz vegetal, específicamente en la harina del pan blanco que tiene como principal ingrediente almidón.

Además, se busca que este prototipo de bebida pueda tener beneficios añadidos a la salud ya que se le agregan bacterias probióticas que mejoran las propiedades nutricionales de los alimentos.<sup>1,2,3,4,5</sup>

## 1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas, son un grupo heterogéneo de microorganismos que tiene como característica común la producción de ácido láctico como el principal metabolito derivado de la glucólisis. Este grupo de microorganismos se pueden definir como bacterias Gram positivas, no formadores de esporas, cocos o bacilos. Este tipo de bacterias se pueden encontrar en diferentes hábitats, como el tracto intestinal, vegetales, leche, alimentos fermentados entre otros. Los géneros más importantes de BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Tetragonococcus* (De Vuyst, 1994).

Desde el punto de vista de la fermentación de los hidratos de carbono, las BAL se pueden agrupar en dos grandes grupos, según sus patrones de fermentación:

- I) El grupo homofermentativo compuesto los géneros de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y el grupo homofermentativo de *Lactobacillus* que producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis Embden-Meyerhoff (Axelsson, 1998). Estas BAL fermentan 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico (Parra, 2010), generando un rendimiento neto de 2 moles de ATP por molécula de glucosa metabolizada.
- II) El grupo heterofermentativo integrado por los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaeria* y algunos *Lactobacillus* (Carr et al., 2002). Estos microorganismos, producen aproximadamente 50% de ácido láctico; por cada mol de glucosa que fermentan, forman 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO<sub>2</sub> (Devlieghere et al., 2004; Ly et al., 2008), por la vía 6-fosfogluconatofosfocetolasa (Gálvez, 2007). Esta vía heterofermentativa genera un mol neto de ATP.

En la industria alimentaria las BAL tienen un rol importante debido a que no únicamente son iniciadores de la fermentación sino también por la producción de diferentes moléculas

tales como el etanol, compuestos aromáticos, expolisacáridos y bacteriocinas. La producción de estos metabolitos permite a la industria diversificar los productos con características únicas como por ejemplo nutricionales, funcionales y sensoriales (Penga et al., 2020).<sup>6,7,8,9,10,11</sup>

### **1.3 Tipos de BAL**

Los géneros de BAL más relevantes para la industria alimentaria son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus* (Beresford et al., 2001). Sin embargo, en este trabajo de investigación se describirán los géneros de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, porque forman parte del cultivo iniciador utilizado.<sup>12</sup>

#### ***Lactobacillus***

El nombre de *Lactobacillus* está constituido por la palabra “lactis” que significa leche y “bacillus” que es pequeño bacilo. Los lactobacilos miden aproximadamente de 2-6 $\mu$  de largo, se pueden encontrar de forma aislada o formando cadenas cortas. Presentan un buen crecimiento en medios líquidos de laboratorio donde sufren un fenómeno de precipitación cuando su crecimiento comienza a disminuir, son sensibles a la mayoría de los antibióticos que afectan a las bacterias Gram positivas.

La principal fuente de energía que usan estas bacterias son los hidratos de carbono simples como la glucosa, algunos de ellos son capaces de utilizar la galactosa, también usan disacáridos como la lactosa, ya que tienen la enzima  $\beta$ -galactosidasa y polisacáridos como el almidón, debido tienen enzimas como la  $\alpha$  y  $\beta$  glucosidasa. Sin embargo, estas bacterias requieren de ciertos aminoácidos, vitaminas y ácidos nucleótidos para crecer en el laboratorio y en las matrices alimentarias. Muestran un crecimiento adecuado a pH ligeramente ácidos, su crecimiento se detiene con pH alcalinos o los que rozan la neutralidad. Mediante la formación de ácido láctico producen una disminución del pH del sustrato, de manera que evitan o disminuyen el crecimiento de microorganismos competidores y/o microorganismos patógenos. Son un grupo de bacterias microaerófilas es decir su crecimiento máximo se produce cuando el oxígeno se restringe, el incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> durante la incubación estimula su crecimiento. La mayoría de *Lactobacillus* son mesófilos su temperatura optima oscila entre los 30-40 °C, pero su rango de temperatura de crecimiento abarca desde los 2-53°C. Por otra parte, los *Lactobacillus*

termófilos crecen a una temperatura de 55°C. En la industria alimentaria los podemos encontrar en productos lácteos, cervezas, vinos y vegetales fermentados. En el ser humano normalmente se encuentran a lo largo del tracto digestivo (Muller et al., 2009; Caro et al., 2013., Penga et al., 2020).<sup>11,13</sup>

### ***Streptococcus***

Este grupo crece de forma aislada, en pares o formando cadenas (si crece de esta manera puede adquirir forma de bastones). La temperatura de crecimiento abarca desde 10-45°C. Si las condiciones son apropiadas puede disminuir rápidamente el pH del medio por lo que se emplea en la industria láctea para elaborar yogur y queso, en la fermentación de vegetales para obtener chucrut. La bacteria proporciona a los alimentos un sabor ácido. Produce sustancias probióticas y bacteriocinas. Estas últimas son péptidos o tetrapéptido de biológicamente activos (Muller et al., 2009).<sup>13</sup>

### **1.4 *Bifidobacterium***

Las bifidobacterias se pueden presentar solas, en cadenas o en agregados en forma de “V”. Son estrictamente anaerobios y su sensibilidad al oxígeno va a depender de la cepa y la especie, la sensibilidad al oxígeno se debe de la capacidad para acumular peróxido de hidrógeno.

Estas especies constituyen parte de la microflora intestinal de mamíferos. Durante la etapa infantil se encuentran en altas concentraciones en las heces y con el paso de los años disminuye su concentración. El pH óptimo para su crecimiento se encuentra en torno a los 6-7, con un pH 4,5-4 el crecimiento es muy pequeño lo mismo ocurre con pH 8-8,5. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 37-41°C y el crecimiento se enlentece a 25-28°C. Se ha identificado en total 34 especies y 2 subespecies de las cuales 13 provienen de fuentes humanas, 14 de animales, 3 de abejas, 3 de aguas contaminadas y 1 de leches fermentadas. Este género de bacterias es capaz de sintetiza vitaminas solubles, sin embargo, la cantidad de vitaminas sintetizada es diferente entre las especies. Debido a su valor probiótico se utilizan como ingredientes en alimentos funcionales como es el caso del yogurt, este grupo de bacterias no coloniza al huésped por lo que se necesita un consumo periódico para que sus propiedades persistan (Muller et al., 2009;Penga et al., 2020).<sup>11,13</sup>

## 1.5 Cultivos iniciadores

De acuerdo con Beresford et al. (2001) los cultivos iniciadores se definen como aislamientos o cepas de BAL, generalmente lactococos, que producen suficiente ácido para reducir el pH a menos de 5.2 en 6 horas, a una temperatura de 30-37°C. Los cultivos iniciadores son agregados al inicio de la elaboración de alimentos fermentados y pueden alcanzar rápidamente altos recuentos microbianos entre  $10^9$  a  $10^{10}$  ufc/g de los productos fermentados como el yogur o el queso (Montel et al., 2014). La actividad principal de los cultivos iniciadores de BAL es la producción de ácido láctico durante el proceso de elaboración de alimentos fermentados, aunque también participan en el proceso de maduración de los quesos, debido a sus enzimas que son las responsables de llevar a cabo la proteólisis y la conversión de los aminoácidos en compuestos aromáticos (Fox y Wallace, 1997).<sup>12,14,17</sup>

Las BAL son usadas tradicionalmente como estárter y tienen una larga historia en esta aplicación en diversos tipos de alimentos o sustratos. Las bacterias ácido lácticas usadas como estárter son normalmente aisladas de ambientes o hábitats donde ellas se encuentran de forma natural (Hansen 2002). Sin embargo, se utilizan como estárter aquellas BAL que posee algunas propiedades metabólicas específicas como: actividad acidificante, proteolíticas, actividad antagonista y la habilidad de producir exopolisacáridos (Ayad et al., 2004). Estas características permiten producir alimentos con un valor nutricional añadido, por ejemplo, cuando la leche es transformada en yogur, la lactosa se convierte en ácido láctico, se hidrolizan las proteínas en péptidos y aminoácidos o a partir de los lípidos de la leche se producen ácidos grasos libres. Estos procesos, además de producir cambios de forma, textura, sabor, en la leche también mejora el valor nutricional de ésta. El yogur es una buena fuente de proteínas, calcio, riboflavina, folatos y vitamina B<sub>6</sub>, además como gran parte de la lactosa se transforma en ácido láctico, generalmente, las personas que son intolerantes a la lactosa pueden consumir este producto (Das et al., 2019).

Las BAL poseen una gran importancia en la industria alimentaria para la conservación y desarrollo de las características sensoriales de los alimentos. La función de las BAL y otros probióticos despierta el interés de muchos investigadores existiendo una gran cantidad de artículos en la comunidad científica que afirman los beneficios de estos sobre la salud.

Las BAL van a sobrevivir en el alimento además, éstos microorganismos forman parte de la microbiota intestinal y no causan enfermedades en personas con un adecuado sistema inmune, por este motivo se les considera como organismos GRAS (*General Regarded As Safe*), las cepas con este distintivo, aprobado por la FDA (*Food, Drug Administration*).

Los cultivos iniciadores pueden llevar como adjuntos otras cepas de BAL incluidas con los cultivos con fines distintos a la acidificación: aroma, textura, etc.). En este sentido, un gran número de cepas de BAL de los géneros más comunes en los quesos, *Lactobacillus* y *Enterococcus* han sido propuestas para usar como adjuntos de los cultivos iniciadores. No obstante, la European Food Safety Authority (EFSA, 2013) no considera seguro el uso de *Enterococcus spp.* debido a la presencia de factores de virulencia y al incremento de su resistencia a múltiples antibióticos (Jett et al., 1994). Otra de las bacterias que suelen estar presente en algunos cultivos iniciadores son las bifidobacterias, siendo *B. longum* y *B. animalis* las especies más usadas en cultivos probióticos (Klein et al., 1998). La presencia de este género en los cultivos iniciadores es debido a que *Bifidobacterium* es un miembro clave en la microbiota del intestino humano y se ha demostrado que ejerce un efecto beneficioso en el sistema inmune. Así mismo, se ha observado en diversas líneas celulares y en ratones que reduce la inflamación y que podría prevenir algún tipo de alergias (Srutkova et al., 2015). Estas características únicas en las bifidobacterias permiten la elaboración de alimentos que mejoran la salud. Este hecho es utilizado por la industria alimentaria para poner en el mercado alimentos que puedan mejorar la salud del consumidor. Sin embargo, deberíamos de ser cautos ya que no todas las cepas o biotipos de una especie producen los mismos beneficios.<sup>18,19,20,21,22,23</sup>

Los beneficios atribuidos a las BAL son diversos entre los que cabe mencionar: mantener el equilibrio de la flora intestinal, la prevención de ciertas diarreas y como coadyuvante para restablecer la flora intestinal. Otro de los beneficios atribuidos a estas bacterias es la intervención en la modulación del sistema inmune (Gupta y Garg., 2009). Las BAL poseen componentes que actúan como inmunomoduladores e intervienen en la defensa del organismo frente a células malignas. Otra propiedad es la disminución del colesterol sérico sanguíneo (Ooi y col., 2010) debido a la producción de propionato que interviene en el metabolismo del colesterol. También, se atribuye un efecto antihipertensivo debido a la

presencia de péptidos inhibidores de la angiotensina I los cuales son producidos durante la proteólisis de la caseína durante la fermentación de lácteos (Sanders et al., 2000).<sup>24,25,26</sup>

Finalmente, otro uso de la BAL es el uso de sustratos presentes en alimentos de origen vegetal tales como el almidón, la celulosa o la paja. Estos microorganismos convierten esos hidratos de carbono en ácido láctico siendo otra alternativa importante que permite la reintroducción de los alimentos a la cadena alimentaria y con ello disminuir el desperdicio alimentario. Diversos productos a base de alimentos de origen vegetal han sido desarrollados por diversos autores entre los que cabe destacar a la avena, almendra, soja, harinas de arroz, lentejas, garbanzos, quinoa entre otros (Montemurro et al., 2021).<sup>27</sup>

### **1.6 Alimentos funcionales: Prebióticos, Probióticos**

Un alimento funcional se puede definir como “aquel que ejerce una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad” (Bagchi, 2008).<sup>28</sup>

Dentro de estos alimentos según el efecto fisiológico que ejerzan encontramos a los prebióticos y a los probióticos.

La definición de prebiótico ha cambiado con el tiempo, la primera definición surge en 1995 que definía estos compuestos como “un componente alimentario no viable que confiere un beneficio para la salud del huésped asociado a la modulación de la microbiota”. En el año 2017 los expertos de la ISAPP (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* <https://isappscience.org/>) describieron el prebiótico como "un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped confiriendo un beneficio para la salud" (ISAPP 2017 <https://isappscience.org/>). Hoy en día consideramos el término prebiótico como un componente alimentario normalmente oligosacáridos no almidones, no digeribles que ejercen una acción positiva en el huésped, estimulan de forma selectiva el crecimiento y la actividad metabólica de diferentes cepas de bacterias colónicas (WHO et al., 2003). Los prebióticos no son digeribles por las enzimas intestinales. Sin embargo, al nivel del intestino delgado pero principalmente del intestino grueso son degradados por la microbiota intestinal, la degradación de estos compuestos genera metabolitos como los ácidos de cadena corta que contribuye a buen estado de salud y un pH óptimo.

Los compuestos que tienen un especial interés son oligosacáridos, especialmente los fructanos. Los fructanos son un grupo genérico de hidratos de carbono en el que aparecen una o más uniones de fructosil-fructosa dentro de las uniones glucosídicas. Entre los fructanos podemos destacar: inulina, oligofructosa, polidextrosa, galactooligosacáridos y pectinas. Estos últimos compuestos se pueden encontrar frecuentemente en los alimentos de origen vegetal.

El Comité de Expertos de la FAO define a los “probióticos como los microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador” (Hill et al., 2014). Sin embargo, en la legislación de seguridad alimentaria de la Unión Europea no existe una definición de probiótico y este término se utiliza de forma general para referirse a especies bacterianas o especies de microorganismos vivos.<sup>30</sup>

En este sentido, el uso de probióticos en la alimentación está sujeto a los requisitos generales establecidos en el Reglamento (CE) nº 178/2002. Además, del valor nutricional ayudan a mejorar y mantener el estado de salud del organismo teniendo un efecto benéfico adicional terapéutico o preventivo en el huésped. El término probiótico significa a favor de la vida y aunque existen diferentes definiciones, todas indican una misma idea “deben utilizarse microorganismos vivos en cantidades adecuadas para obtener efectos deseados. Un requisito importante es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en alimentos durante el paso gastrointestinal para garantizar su efecto beneficioso en el huésped (A. Bezkorovainy et al., 2001).<sup>31</sup>

Se han descrito diversas propiedades de los alimentos que contienen probióticos entre las que cabe destacar el efecto inmunomodulador, las BAL consideradas probióticos son capaces de inducir una inmunoestimulación. Así mismo, el efecto gastro-protector, debido a la producción de elevadas cantidades de ácido láctico en el estómago. También, la actividad antagonista contra rotavirus que ayuda en el tratamiento de diarreas agudas asociadas a rotavirus. Otro efecto, atribuido a los probióticos es la regulación del tránsito intestinal ya que la producción de ácido acético y otros ácidos orgánicos estimulan la peristalsis intestinal. Finalmente, mejora la salud del hospedador por ejemplo se ha observado que el trasplante

de flora fecal permite la eliminación de la flora resistente a antibióticos en el intestino. También disminuye la ansiedad, mejora la dermatitis atópica y previene el envejecimiento.

### 1.7 Pan blanco vs pan integral

El pan es el producto resultante de la cocción de la masa obtenida por la mezcla de harina y agua con o sin adición de sal, fermentada con la ayuda de levadura de panificación o masa madre (Real Decreto, 2019)<sup>39</sup>. En la elaboración del pan blanco se encuentra como componente principal la harina de trigo refinada mientras que el pan integral se realiza con harina de trigo e la que se encuentra el salvado. Debido a esta diferencia en su composición el pan blanco puede favorecer la aparición de sobrepeso. Hay que aclarar que el valor calórico de ambos productos es muy similar, pero la diferencia radica en la presencia de fibra dietética haciendo que el pan integral posea un menor índice glucémico que el pan blanco, esto se traduce en que el pan integral incrementa menos los niveles de glucosa en sangre produciendo una menor respuesta de la insulina lo cual tiene un efecto en la regulación del peso corporal. El aporte de fibra también estaría relacionado con una disminución en el tránsito intestinal y por lo tanto menor absorción de glucosa, al disminuir la absorción de ciertos componentes y la presencia de fibras no digeribles debido a que existe una mayor cantidad de sustancias nutritivas para las bacterias colónicas.

**Tabla1.** Composición pan blanco vs pan integral

<b>Componente (g/100g)*</b>	<b>Blanco</b>	<b>Integral</b>
<b>Energía (kcal)</b>	261	221
<b>Proteínas</b>	8,5	9
<b>Hidratos de carbono</b>	54	47
<b>Almidón</b>	41,8	36,2
<b>Azúcares sencillos</b>	1,9	1,8
<b>Fibra</b>	3,5	7,5
<b>Lípidos</b>	1,6	2,9
<b>Ácidos grasos saturados</b>	0,39	0,54
<b>Ácidos grasos monoinsaturados</b>	0,28	0,41
<b>Ácidos grasos poliinsaturados</b>	0,34	1,2
<b>Minerales (mg)</b>		
<b>Calcio</b>	56	54
<b>Hierro</b>	1,6	2,7

<b>Magnesio</b>	25,1	76
<b>Fósforo</b>	91	200
<b>Zinc</b>	0,61	1,8
<b>Sodio</b>	540	550
<b>Potasio</b>	110	230
<b>Selenio</b>	28	35
<b>Vitaminas (mg)</b>		
<b>Vitamina K</b>	1,9	3,4
<b>Vit B1- Tiamina</b>	0,086	0,34
<b>Vit B2- Riboflavina</b>	0,06	0,09
<b>Equivalente de niacina</b>	3	5,5
<b>Vitamina B6</b>	0,06	0,09
<b>Equivalente de folato</b>	23	39

Tabla 1. Composición pan blanco vs pan integral.

La harina de pan blanco tiene diferencias con su antecesora ya que ha sufrido un proceso de transformación por lo cual va a existir una degradación de proteínas y podría sufrir un incremento de aminoácidos libres. Además, el almidón ya ha sido gelatinizado por lo que su degradación va a ser mucho más favorable por las bacterias. Estas van a utilizar los azúcares libres y aminoácidos disponibles para su crecimiento de tal manera que al utilizar los hidratos de carbono mediante fermentación produciendo ácido láctico que disminuye el pH del medio acidificando la bebida.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El desperdicio alimentario es un gran problema para la seguridad y la sostenibilidad alimentaria (Immonena et al., 2020). Se estima que un tercio de la producción mundial de alimentos se desperdicia. Estos hechos hacen imprescindibles la búsqueda de alternativa para el re-uso los productos alimentarios, así como la reintroducción de estos alimentos a la cadena alimentaria. El pan es el tercer alimento que se desecha en España y además es un alimento que contiene proteínas e hidratos de carbono, el almidón que puede ser utilizados para el crecimiento de bacterias, en este caso las bacterias ácido lácticas y otras bacterias acompañantes, como *Bifidobacterium*. Es de vital importancia la búsqueda de soluciones para evitar el desperdicio alimentario y también buscar soluciones para mejorar la salud de consumidor. Dar un uso al residuo a la harina de pan al introducirlo en un flujo secundario permitirá aprovechar en su totalidad los recursos empleados en la producción del cereal,

disminuyendo los costes, reduciendo la generación de residuos y practicando una economía circular sostenible.

En este trabajo de investigación ha unido esos dos aspectos por un lado la reutilización de un producto que normalmente es desechado por la industria alimentaria y por el otro el uso bacterias que mejoren el valor nutricional de la harina pan e incluso mejoren la salud de consumidor.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo general

Estudiar el crecimiento de un estárter mixto comercial que contienen bacterias probióticas en una matriz elaborada con harina de pan y agua.

#### 3.1. Objetivos específicos

Establecer las condiciones de crecimiento adecuadas para el recuento de *Bifidobacterium* en una matriz harina de pan y agua.

Encontrar las condiciones ideales para el crecimiento de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* en una matriz con harina pan y agua.

## **4 MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Cultivo**

En este estudio se ha utilizado un estárter comercial (Nu-trish® BY-01 DA) cedido amablemente por la empresa CHR Hansen (Hørsholm, Dinamarca). Este cultivo tiene una mezcla de tres bacterias (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*).

#### **4.2 Recuento de *Bifidobacterium* en Nutrish BY a distintas condiciones de CO<sub>2</sub>**

El recuento de bifidobacterias se llevó a cabo usando cuatro condiciones de crecimiento, de ellas tres condiciones fueron la cantidad de CO<sub>2</sub>: 5%, 5% y doble capa de MRSA (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals) en una estufa de incubación (Giralt S.A.), 10% (Thermo Scientific) y 7 a 15% CO<sub>2</sub> en jarras de anaerobiosis incubadas en una estufa (Giralt S.A) a una temperatura de 37°C durante 72 horas.

Para ello se pesaron 2 gramos del cultivo Nutrish® BY-01 DA que se disolvieron en 18 mL de agua de peptona que contenía un 0,01% de peptona (p/v) (WWR BDH Chemicals, Wayne, Estados Unidos) y un 0,08% de NaCl (Panreac ITW, Barcelona, España). Todos los instrumentos utilizados fueron esterilizados previamente a 121°C durante 10 min. A partir de esta dilución se realizaron las diluciones seriadas necesarias para realizar los recuentos de *Bifidobacterium*. Estos recuentos se realizaron en aquellas placas que contenían 30 y 300 unidades formadoras de colonias (ufc). 1 mL de cada dilución fue depositado en las placas de Petri, posteriormente se agregó aproximadamente 20 mL de agar MRS (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals). Este agar fue previamente esterilizado durante 30 min a 121°C y tras su enfriamiento a 60°C. Se adicionaron 25 ppm de mupirocina y 500ppm de L cisteína. Para asegurar la homogeneidad de las placas se realizan 20 ochos en ambas direcciones y después con cada placa se realizan círculos concéntricos.

A partir de las placas Petri incubadas a 10 y 15% de CO<sub>2</sub> se recogieron 6 colonias de distintas morfologías y se identificaron con ayuda de MALDI-TOF acoplado a un espectro masas, usando método de extracción ácido fórmico (Carballo et al., 2019).<sup>32</sup>

**Tabla 2.** Interpretación del score generado por el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

SCORE	DESCRIPCIÓN	SÍMBOLOS	COLOR
2.3 – 3.0	Alta probabilidad de identificación de especies	(+++)	Verde
2.0 – 2.299	Identificación segura de género y probable de especie	(++)	Verde
1.7 – 1.999	Identificación probable de género	(+)	Amarillo
0.0 – 1.699	Identificación irrelevante	(-)	Rojo

**Tabla 2.** Score probabilidad de identificación

### 4.3. Preparación de las mezclas para la fermentación

La fermentación se llevó a cabo en 200 mL de una mezcla de harina de pan y agua estéril con una relación 20/80 (p/v). Por un lado, se preparó un ensayo (tratamiento) con la mezcla control (sin enzima) y otro con otra mezcla (con enzima) a que se le agregó una combinación de enzimas amilolíticas; glucoamilasa (0,1168 ul/ g **Saczyme® Go** y alfa-amilasa (0,071 ul/g (**Liquoflow® Yield**), amablemente cedidas por Dr.Manuel Gómez Pallares. Por otro lado, se preparó otro ensayo de la misma forma que el anterior, mezcla sin enzimas y mezcla con enzima, estas mezclas fueron centrifugadas con ayuda de una centrífuga marca Beckmann J2-HS a 5000 g durante 5 min en el laboratorio de Dr. Javier Arias. Una vez centrifugadas las mezclas, éstas fueron re-suspendidas hasta alcanzar su volumen inicial (200mL).

Las mezclas preparadas fueron pasteurizadas a  $70\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. A continuación, las mezclas fueron enfriadas en un baño de agua fría con hielo en durante 5 min o hasta alcanzar una temperatura alrededor de los  $38^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.1 Fermentación, inoculación e incubación

Una vez preparadas las mezclas, se inocularon con el cultivo teniendo como criterio alcanzar una concentración de *S. thermophilus* de  $10^7$  ufc/mL. Para ello, se pesaron 2 g del

estárter *Nutrish* BY en una báscula y se diluyeron en 18 ml de agua de peptona estéril. De esta manera, se realizó una dilución 1/10 y se obtuvo una solución más homogénea. La preparación de éste inóculo se realizó 5 min antes de retirar la mezcla del baño de agua fría. Los frascos con las mezclas antes mencionadas se dejaron fermentar a 38°C durante 24 h.

#### **4.3.2. Recuento de microorganismos**

Los recuentos de los distintos grupos microbianos se realizaron a 0, 3, 6, 9 y 24 horas. Para ello se recogió de forma aséptica 10 ml de fermentado en 90 ml de agua de peptona estériles. A partir de esta dilución se realizaron las diluciones 1/10 llegando hasta la dilución  $10^{-7}$ .

Las siembras de cada uno de los grupos microbianos se llevaron a cabo según lo descrito por Caro et al., (2020), así como siguiendo las instrucciones del proveedor de estárter y que se describen a continuación. El recuento de *Streptococcus thermophilus* se realizó en un medio de cultivo agar M17 (Oxoid, CM0785) enriquecido un 0,1% en lactosa. Ambos compuestos antes de ser utilizados fueron esterilizados durante 30 min a 121°C, tras la esterilización se dejó enfriar a 60 °C se añadió la lactosa y se prepararon placas de Petri que se dejaron solidificar. La siembra se llevó a cabo mediante el método por gotas en superficie, de esta manera se sembraron 3 gotas de 10 µL cada gota de las diluciones, desde la dilución  $10^{-1}$  hasta la dilución  $10^{-7}$ . Una vez sembradas las placas Petri, éstas se incubaron a 37°C con ayuda de una estufa (Giralt S.A.) durante 48 horas.<sup>33</sup>

Para el recuento de *Lactobacillus bulgaricus* se utilizó agar MRS (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals) el agar fue esterilizado durante 30 min a 121°C, tras la esterilización se dejó enfriar a 60°C mediante el método de profundidad, es decir 1 ml de las diluciones apropiadas se depositaron en el fondo de la placa de Petri y posteriormente, se añadió 20 mL de agar MRS, a continuación se dejaron solidificar y una vez gelificado el agar se añadió una segunda capa de agar MRS (aproximadamente 5 ml por placa). Las placas fueron incubadas en una estufa bacteriológica (Orbital Shaker, Incubator ES-20 BIOSAN) a 42°C durante 48 horas.

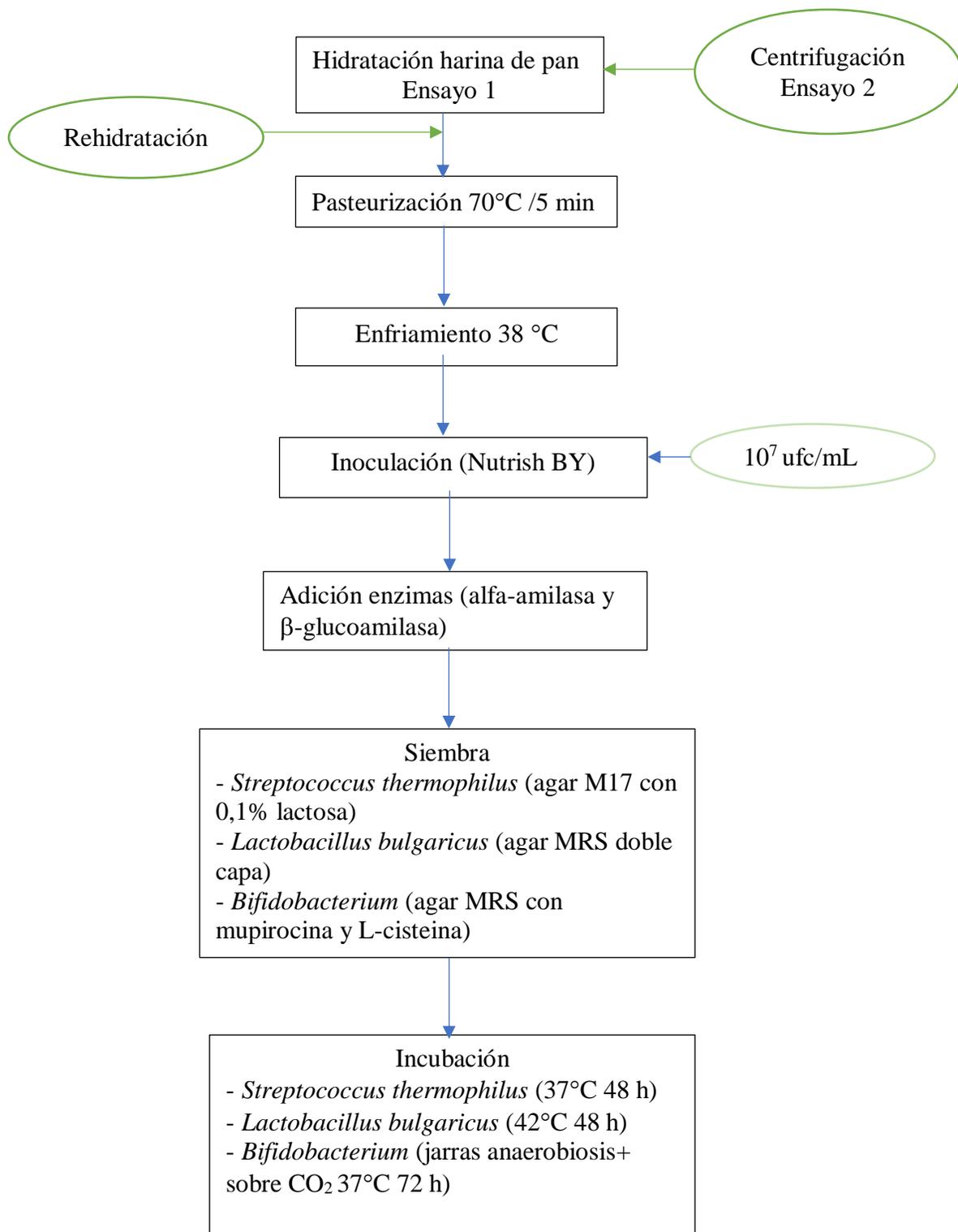
Finalmente, el recuento de *Bifidobacterium* se llevó a cabo en agar MRS (Agar Man Rogosa y Sharpe, VWR BDH, Chemicals) el agar fue esterilizado durante 30 min a 121°C, tras la esterilización se dejó enfriar a 60°C y se le adicionó 25 ppm decmupirocina y 500 ppm de L-cisteina. Posteriormente, se depositó 1 mL de las diluciones apropiadas en fondo de la placa Petri y se agregó 20 mL del agar MRS antes mencionado. Posteriormente, las fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis con la ayuda de una jarra y un sobre (Thermo Scientific) que genera un 10-15 % necesario para eliminar el O<sub>2</sub> presente en la jarra. Finalmente. las jarras fueron incubadas en estufa bacteriológica (Giralt S.A.) durante 72 h a 37°C.

El proceso de fermentación y las condiciones de crecimiento de las bacterias se resumen en la figura 1.

#### **4.4 Tratamiento de Resultados**

La identificación de las bifidobacterias se realizó con el programa *Byotyper* (versión 3,1). El modelado de las curvas se llevó a cabo a través del programa *online DMFit Web* (Barany and Roberts, 1994) a partir de este programa se calcularon la velocidad de crecimiento, la fase de latencia, el número inicial y final de microorganismos.

Los datos de pH, crecimiento microbiano, fueron recogidos en el programa Excel y en este programa se realizaron los cálculos de medias, desviación estándar, las curvas de crecimiento y los cálculos de las velocidades de acidificación, el pH a la cual la velocidad de acidificación fue máxima y el pH a diversos tiempos de incubación. Finalmente, la comparación de medias se realizó mediante el programa SPSS (versión 26), para la comparación de las medias de los recuentos de *Bifidobacterium* a diferentes condiciones de CO<sub>2</sub> se utilizó el estadístico *T-student* y para la comparación de las medias de las velocidades de crecimiento, se utilizó el estadístico análisis de varianza simple.



**Figura 1.** Diagrama del procedimiento de fermentación y recuento de microorganismos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se recogen los recuentos de bifidobacterias incubadas a distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> en los dos ensayos realizados en MRS agar 25 ppm de mupirocina y 500 L-cisteína. No se observó crecimiento de *Bifidobacterium* cuando se incubó a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C y 72 horas incubación, siendo el límite de cuantificación menor de 10 ufc/mL. Sin embargo, los recuentos de estas bacterias a 10 y 15% de CO<sub>2</sub> y a las mismas condiciones de incubación, fueron superiores a 9,96 Log ufc/mL. Además, no observó diferencias significativas entre los recuentos de 10% y 15% de CO<sub>2</sub> (p<0,05). De esta manera, las condiciones de incubación establecidas para el recuento de bifidobacterias en los siguientes experimentos en este trabajo de investigación fueron: 37°C durante 72 horas y 10% de CO<sub>2</sub>. Las especies de *Bifidobacterium* son anaerobias estrictas (Muller et al. 2009)<sup>13</sup> debido a esto, estas bacterias han crecido en medios con mayor presencia de CO<sub>2</sub>. Las condiciones de micro-anaerobiosis generadas con el 5% de CO<sub>2</sub> no fueron suficientes para permitir el crecimiento de estos microorganismos, aun cuando se agregó una segunda capa de medio de cultivo, (ver Tabla 3). Además, el crecimiento de este tipo de microorganismos requiere que los medios sintéticos tengan ciertos componentes entre vitaminas, aminoácidos libres, ácidos nucleicos minerales y algunos azúcares como lactosa (Gomes and Malcata, 1999)<sup>34</sup>. De acuerdo los resultados de este trabajo el medio MRS contiene los nutrientes necesarios para ese crecimiento, sin embargo, en este estudio se agregó la L-cisteína con objeto mejorar el crecimiento de *Bifidobacterium*. Los recuentos obtenidos en este trabajo fueron realizados en un estándar comercial y no se han encontrado datos en la bibliografía para poder comparar estos resultados. Algunos autores como Dave et al., (1995), indican que el MRS Agar es un medio adecuado para el crecimiento de bifidobacterias, en este trabajo se adicionó la mupirocina para inhibir el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* y *Lb. delbrueckii supb. bulgaricus* estas condiciones también fueron aconsejadas por el proveedor de cultivos.

**Tabla 3.** Recuentos de *Bifidobacterium* utilizando distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> de incubación.

Microorganismo/ensayo	% de CO <sub>2</sub> (Log ufc/g)			
	5	5*	10	7-15
<b>1</b>	<LOQ	< LOQ	10,06±0,26	10,21±0,03
<b>2</b>	<LOQ	<LOQ	9,96±0,26	10,24±0,09
<b>Total</b>			10,01±0,22 <sup>a</sup>	10,22±0,06 <sup>a</sup>

Cultivo ensayos 1 y 2 de *Bifidobacterium* en agar MRS con un porcentaje de CO<sub>2</sub> (Log ufc/g)

Atmósfera enriquecida 5% en CO<sub>2</sub>; Atmósfera enriquecida en 5\*% CO<sub>2</sub> con doble capa de agar MRS; CO<sub>2</sub> 7-15% en jarras; CO<sub>2</sub> 10% usando jarras de anaerobiosis; LOQ (1 Log ufc/mL)

superíndices en columnas con las mismas letras no fueron significativamente diferentes p>0,5. prueba T-student

En la Tabla 4, se recogen las características morfológicas, los resultados de la identificación a través de MALDI TOF de las cepas aisladas a partir del crecimiento del cultivo Nutrish BY y recogidas a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>. Las colonias crecidas a distintas concentraciones de CO<sub>2</sub> mostraron morfologías distintas, especialmente color y forma. Cuando las colonias crecieron en superficie tuvieron un color blanco marfil y bordes regulares, mientras que aquellas colonias que crecieron en fondo y en dentro del agar fueron redondas y lenticulares, respectivamente. Sin embargo, todas ellas fueron identificadas por el MALDI-TOF como *Bifidobacterium animalis*, aunque las colonias crecidas en la superficie de agar y en fondo de la placa mostraron las mayores puntuaciones (>2,0) en comparación con aquellas que crecieron dentro del agar (lenticulares). De acuerdo Bourassa, et al., 2015, la presencia de agar puede interferir en la identificación de los aislamientos, es posible que las bajas puntuaciones observadas en los aislamientos de forma lenticular sean debido a la presencia de agar en la placa de MALDI-TOF usada para la identificación.

**Tabla 4.** Identificación de las colonias aisladas a partir de distintas condiciones 10 y 15% de CO<sub>2</sub> en MRSA.

Morfología	No. de aislamientos	No. de aislamientos identificados	Especie identificada	Scores	Pureza
<b>Color blanco marfil, con bordes regulares y crecimiento en superficie</b>	6	2/6	<i>B. animalis</i> <i>B. animalis</i>	2,100 1,874	++

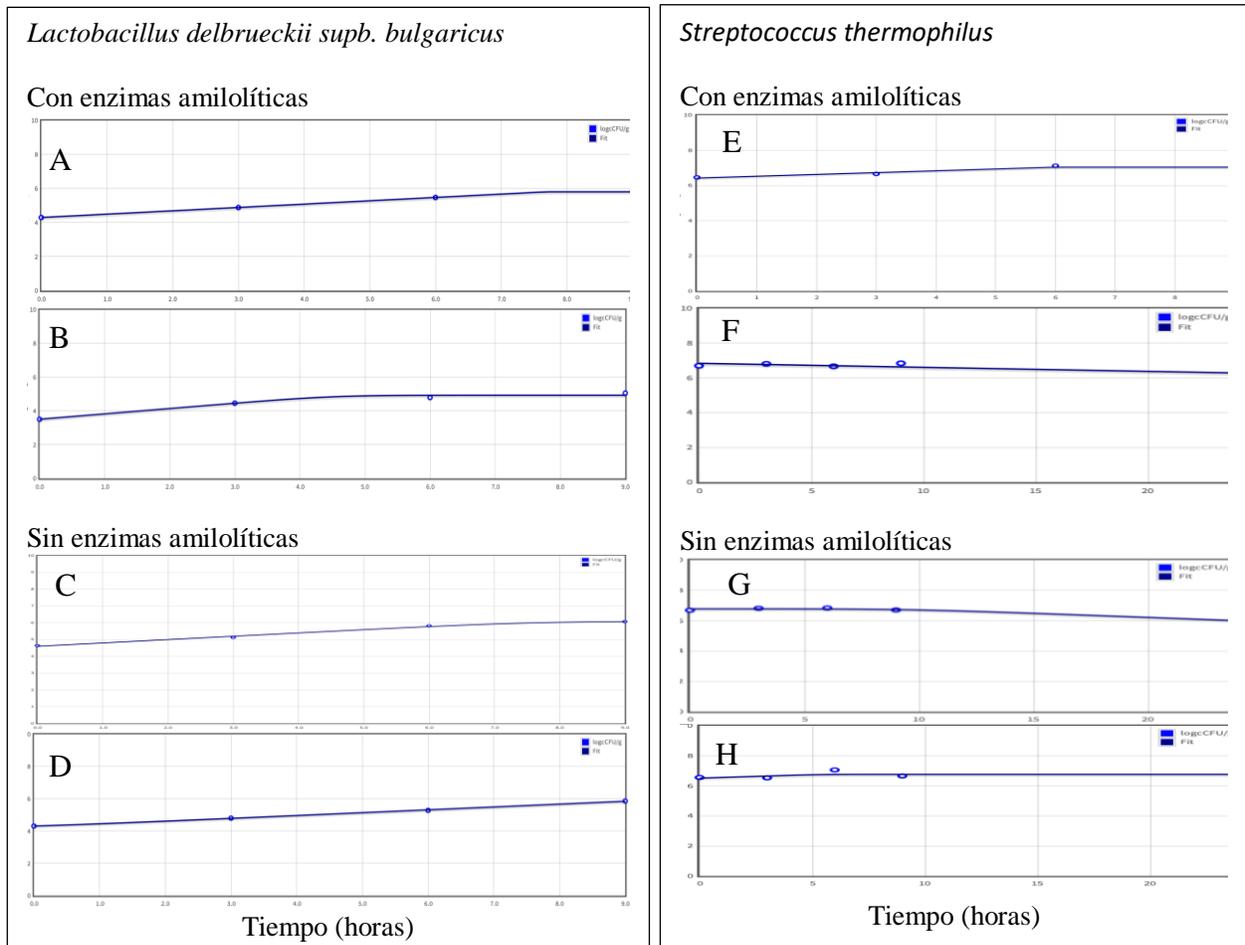
<b>Color blanco, forma lenticular y crecimiento dentro del agar</b>	6	4/6	<i>B. animalis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. animalis</i>	1,863 1,781 1,083 1,849	
<b>Color blanco opaco, redondas con bordes no definidos (halo alrededor) y crecimiento en el fondo de la placa</b>	6	3/6	<i>B. animalis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. animalis</i>	2,059 2,006 1,77	

++ identificación segura de género y probable de especie

+ identificación probable de género

En la Figura 2 se muestra el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* ajustado al modelo de Barany and Roberts (1995). Como se observó *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* creció ligeramente en el tratamiento/ensayo que contenían enzima+sal y curiosamente también creció, en el tratamiento sin enzima+sal pero no creció adecuadamente con sin enzima-sal. La eliminación de sal se llevó a cabo por centrifugación a 5000g durante 5 min, posteriormente a este tratamiento el sobrenadante fue descartado. El sobrenadante está constituido de compuestos solubles de bajo tamaño molecular. Es posible que en el sobrenadante además de contener NaCl, contenga otros compuestos de bajo tamaño molecular, como péptidos o aminoácidos. Es conocido que *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* requiere para su crecimiento péptidos y aminoácidos concretos debido a que tiene una actividad limitada (Robinson, 2002). Respecto a *Streptococcus thermophilus*, no mostró crecimiento en la matriz de harina de pan + agua e incluso en el tratamiento que no contenía enzima, ni sal mostro una inhibición. Esta bacteria es menos proteolítica que *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Crow et al., 2001) posiblemente esta es una de las razones por la cual no se ha observado crecimiento ya que es incapaz de hidrolizar las proteínas presentes en el pan. Además, cuando estas bacterias crecen en simbiosis en la leche, los *Lactobacillus*

proporciona aminoácidos necesarios para el crecimiento *Streptococcus* ya que esa bacteria hidroliza la caseína, pero, se puede intuir que *Streptococcus* no hidrolizar el gluten formado en el amasado del pan.<sup>35,36</sup>

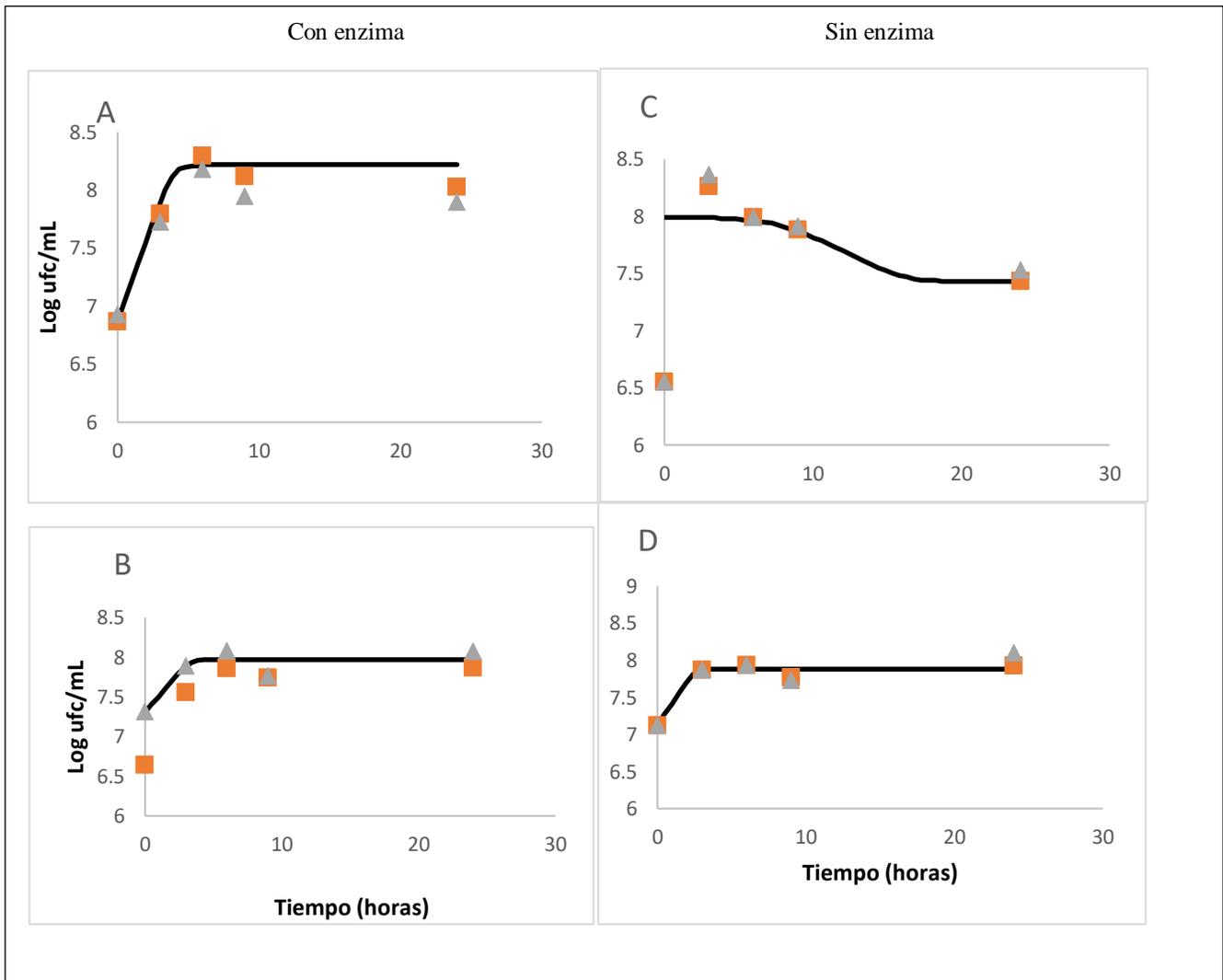


**Figura 2.** se muestra las curvas del crecimiento *Lactobacillus delbrueckii supb. bulgaricus*, y *Streptococcus thermophilus* en una mezcla agua-harina de pan a 38°C modelas con Combase. a) *Lactobacillus* enzima + sal; b) *Lactobacillus* enzima - sal, c) *Lactobacillus* sin enzima+sal, d) *Lactobacillus* sin enzima-sal, Crecimiento de *Streptococcus thermophilus* e) *Streptococcus* enzima + sal, f) *Streptococcus* enzima -sal, g) *Streptococcus* sin enzima+sal, h) *Streptococcus* sin enzima-sal

En la Figura 3, se puede observar el crecimiento de bifidobacterias (ufc/ml) en la matriz agua-pan. Así mismo, se muestra el ajuste (línea sólida) con el modelo del crecimiento de estas bacterias al modelo de Barany y Roberts, (1995). Como se puede observar *Bifidobacterium* creció mejor en presencia de enzimas+sal un incremento 1,2 Log ufc/mL. Sin embargo, *Bifidobacterium* sin presencia de enzimas+sal mostró un crecimiento de aproximadamente de 1,7 Log ufc/m durante las primeras 3 horas de incubación y después

de este tiempo mostrar una inhibición de aproximadamente 1 Log ufc/mL a las 24 h de la fermentación.

Finalmente, el crecimiento de esta bacteria una vez centrifugada la mezcla fue similar en presencia de enzima y sin enzima. Esto podría indicar que *Bifidobacterium* es capaz de hidrolizar parte del almidón o algún producto de la degradación del almidón presente en la matriz harina de pan y agua.



**Figura 3.** Crecimiento de *Bifidobacterium* en una mezcla harina de pan -agua (20/80 p/v) a 38°C. A) *Bifidobacterium* con sal con enzima, B) *Bifidobacterium* sin sal con enzima, C) *Bifidobacterium* con sal sin enzima, D) *Bifidobacterium* sin sal sin enzima.

En la Tabla 5, se muestran los valores de la velocidad máxima de crecimiento, el ajuste al modelo de Barany y Roberts ( $R^2$ ), la fase de latencia, el valor inicial y final del contenido de cada uno de los grupos microbianos presentes en el cultivo Nutrish BY. Los valores de  $R^2$  muestran que algunas cinéticas de crecimiento, especialmente el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* no se ajustaron adecuadamente al modelo de Barany y Roberts, debido a que presentaron valores de  $R^2$  desde -0.483 hasta +0.652 con excepción de la matriz que contenía enzima pero no tenía sal. Para llevar a cabo las cinéticas crecimiento microbiano se ajustó el valor inicial a 7 Log ufc/ml, únicamente teniendo en cuenta la concentración estreptococos presente en el estérter Nutrish BY, debido a esto los valores iniciales de *Lactobacillus* fueron inferiores al resto de grupos microbianos. Los valores de los recuentos de bifidobacterias estuvieron en torno a 7,0 Log ufc/ml, con excepción del tratamiento sin enzima y sin sal que alcanzó valores iniciales de 7,92 Log ufc/ml. Las velocidades máximas de crecimiento fueron observadas para *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* fueron de  $0,31 \pm 0,060$  y  $0,303 \pm 0,020$  Log de ufc/g-h<sup>-1</sup>, respectivamente. La velocidad de crecimiento de bifidobacterias se vio influida por el tratamiento de enzimas (alfa-amilasa y glucoamilasa) mostrando diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al crecimiento de este microorganismo sin tratamiento de enzimas ( $0,256 \pm 0,078$  Log de ufc/g-h<sup>-1</sup>). Así mismo, podemos observar la centrifugación (desalado) tuvo un efecto sobre el crecimiento de estos microorganismos reduciendo significativamente ( $p < 0,05$ ) la velocidad de crecimiento ( $0,0653 \pm 0,003$  Log de ufc/g-h<sup>-1</sup>). Respecto a la velocidad de crecimiento de lactobacilos, ésta no se vio afectada por el tratamiento con enzimas ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, cuando la matriz se centrifugó se observó un incremento significativo de la velocidad de crecimiento. Finalmente, la velocidad de crecimiento *Streptococcus thermophilus* es muy baja, incluso se puede observar una inhibición en su crecimiento (ver Tabla 5). Es posible que este microorganismo no pueda crecer adecuadamente en la mezcla de agua y pan debido a que está preparado para crecer en un sustrato como la leche o los productos lácteos, es decir posee una  $\beta$ -galactosidasa que es capaz de hidrolizar la lactosa (Gomes and Malcata, 1999)<sup>34</sup> y no el almidón.

**Tabla 5.** Parámetros de crecimiento microbiano de los distintos grupos microbianos que componen el estárter *Nutrish BY*

Tratamiento	R <sup>2</sup>	Valor inicial	μ <sub>max</sub>	λ	Valor Final
<b><i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i></b>					
Enzima-sin sal	0,952±0,032	3,611±0,140	0,303±0,020 <sup>a</sup>	NC	4,916
Sin enzima-sin sal	0,9975±0,001	4,386±0,032	0,178±0,000 <sup>c</sup>	0,5335±0,248	NC
Con enzima+sal	1,00±0,001	4,932±0,900	0,184±0,018 <sup>b</sup>	NC	NC
Sin enzima+sal	0,997±0,002	4,341±0,156	0,175±0,004 <sup>d</sup>	0,268±0,136	NC
<b><i>Bifidobacterium</i></b>					
Enzima-sin sal	0,183±0,052	7,376±0,006	0,0653±0,003 <sup>c</sup>	NC	NC
Sin enzima-sin sal	0,569±0,056	7,9215±0,008	- 0,016±0,002 <sup>c</sup>	NC	NC
Con enzima+sal	0,8645±0,107	6,90±0,042	0,31±0,060 <sup>a</sup>	NC	8,01±0,063
Sin enzima+sal	0,824±0,221	6,975±0,474	0,256±0,078 <sup>b</sup>	NC	7,8965±0,104
<b><i>Streptococcus thermophilus</i></b>					
Con enzima+sal	0,652±0,27	6,566±0,20	0,066±0,053 <sup>a</sup>	NC	6,44±0,636
Sin enzima+sal	-0,483±0,004	6,566±0,037	0,026±0,015 <sup>b</sup>	NC	6,71±0,04
Enzima-sin sal	0,589±0,062	6,910±0,098	- 0,023±0,002 <sup>b</sup>	NC	NC
Sin enzima-sin sal	0,968±0,044	6,837±0,081	- 0,085±0,043 <sup>a</sup>	NC	6±0

R<sup>2</sup>, ajuste al modelo de Barany and Roberts; μ<sub>max</sub>- velocidad máxima de crecimiento(log ufc/g/h); λ. fase de latencia(horas); Valor final (Log ufc/mL); superíndices en columnas con las mismas letras no fueron significativamente diferentes p>0,5 a través del análisis de ANOVA de una vía y por tipo de microorganismo

En la Tabla 6 se muestra la velocidad máxima de acidificación, el valor de pH y el tiempo al que se alcanza la velocidad máxima de acidificación. Los valores de Vmax (ΔpH.h<sup>-1</sup>) fueron significativamente superiores en el tratamiento enzima+sal (0.25 ΔpH\*h<sup>-1</sup>). Sin embargo, el valor de pH al que se alcanza la velocidad máxima de acidificación fue similar en ambos tratamientos, es decir los dos tratamientos alcanzan un pH similar a la Vmax de acidificación. No obstante, el tiempo en el que se alcanzó la velocidad máxima fue significativamente inferior en el tratamiento enzima+sal. Esto significa que cuando se usan enzimas amilolíticas el tiempo de fermentación se reduce. Los tiempos necesarios para

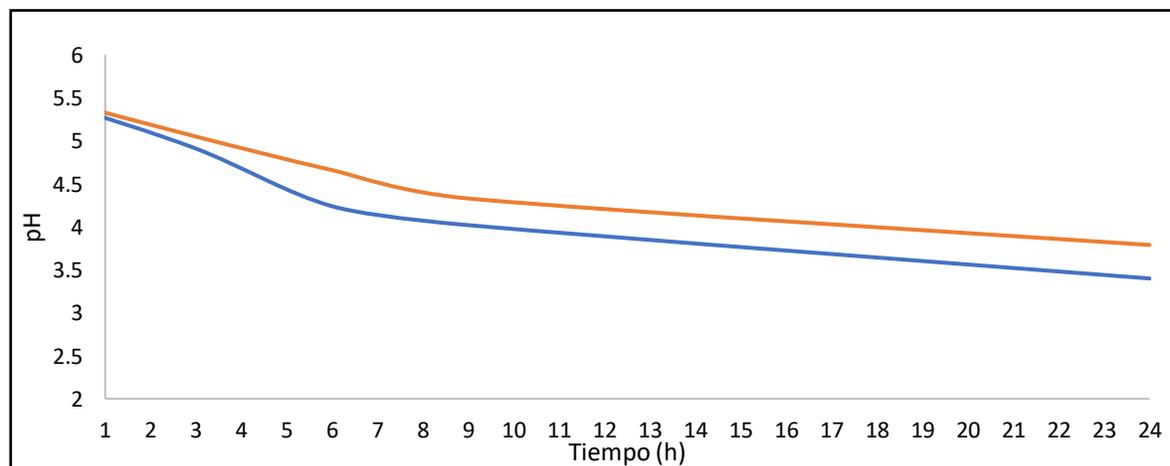
alcanzar un pH 4,5 y 5,0 no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (<0,05). Aunque se puede observar que el ensayo con enzima nuevamente tiene una tendencia a reducir el pH en un menor tiempo. De igual manera se observó que el tratamiento con enzima+sal fue el que menor tiempo necesitó para llegar a pH 5. Es generalmente reconocido que un buen cultivo acidificante disminuya el pH 1,3 unidades de pH en 6 a 30°C (Cogan et al., 2001). El tratamiento con enzima +sal fue capaz de reducir una unidad de pH esto podría indicar que la matriz harina de pan +H<sub>2</sub>O, es un sustrato adecuado para el crecimiento de este cultivo iniciador<sup>37</sup>.

**Tabla 6.** Velocidad máxima de acidificación del Nutrish BY de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*

muestra	V <sub>max</sub> (apH*h <sup>-1</sup> )	pH <sub>Vmax</sub>	T <sub>vmax</sub>	T <sub>pH 5</sub>	T <sub>pH 4,5</sub>
Enzima +sal	0,250±0,014 <sup>a</sup>	4,4±0,07 <sup>a</sup>	5,1 ±0,14 <sup>a</sup>	2,87 ±0,53 <sup>a</sup>	5,02 ±0,02 <sup>a</sup>
Enzima -sal	0,149±0,008 <sup>b</sup>	5,2±0,28 <sup>a</sup>	3,7±0,35 <sup>b</sup>	4,87 ±2.22 <sup>a</sup>	8,00 ±1,41 <sup>a</sup>

V<sub>max</sub> (ΔpH\*h<sup>-1</sup>) velocidad máxima; pH<sub>Vmax</sub> pH al que alcanza la velocidad máxima; T<sub>vmax</sub> tiempo en el que alcanza la velocidad máxima; T<sub>pH5</sub> tiempo en el que alcanza el pH 5; T<sub>pH 4,5</sub> tiempo en el que alcanza el pH 4,5

La Figura 4 muestra la evolución del pH a través del proceso de fermentación con el cultivo Nutrish BY, la cual refleja que pasadas 24 horas. El tratamiento enzima+sal alcanzó un pH de 3,4.



**Figura 4.** Disminución del pH en la matriz harina de pan + agua con el cultivo Nutrish BY

— Con sal con enzima, — Sin sal sin enzima

## 6. CONCLUSIÓN

Las condiciones adecuadas para el recuento de *Bifidobacterium* en la matriz alimentaria harina de pan+agua fueron: anaerobiosis total, 37°C durante 72 y el medio usado es MRS Agar adicionado con mupirocina y L-cisteína.

Cultivo iniciado Nutrish BY mostró un adecuado crecimiento en la matriz harina de pan y agua, sin embargo, el crecimiento no fue similar para todos los microorganismos. *Streptococcus thermophilus* fue el microorganismo que mostró la velocidad de crecimiento más baja en todos los tratamientos (-0,085 a 0.066 Log ufc/g/h), debido a esto la matriz alimentaria no es adecuada para el crecimiento de este microorganismo.

La matriz alimentaria harina de pan+agua adicionada con enzima es un sustrato adecuado para el crecimiento de *Bifidobacterium*, alcanzando  $10^8$  ufc/ml microorganismos viables de esta bacteria. Sin embargo, con objeto de incrementar esas concentraciones se deberían de buscar otras estrategias o realizar otros estudios de investigación.

Finalmente, es posible utilizar la matriz harina de pan +agua para desarrollar alimentos saludables que pueda reintroducirse a la cadena alimentaria.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., Van Otterdijk, R., Meybeck, A., 2011. Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention. FAO, Rome.

- 2) Otles, S., Despoudi, S., Bucatariu, C., Kartal, C., 2015. Food waste management, valor-ization, and sustainability in the food industry. In: Food Waste Recovery: Processing Technol. and Industrial Techniques. Elsevier Inc, pp. 3–23.
- 3) FAO, IFAD, WFP, 2014. The State of Food Insecurity in the World 2014. Strengthening the Enabling Environment for Food Security and Nutrition. FAO, Rome. <http://www.fao.org/3/a-i4030e.pdf>.
- 4) MAPA Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2021). Disponible en [www.epdata.es](http://www.epdata.es). Último acceso el 10/07/2022
- 5) MAPA. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2022). Disponible en [https://www.mapa.gob.es/es/prensa/211011leydesperdicioalimentario\\_tcm30-577760.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/prensa/211011leydesperdicioalimentario_tcm30-577760.pdf).
- 6) De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance. In L. De Vuyst, & E. J. Vandamme (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* (pp. 1–11). US: Springer.
- 7) Axelsson, L., Holck, A. (1995). The genes involved in the production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal of Bacteriology*, 177, 2125-2137.
- 8) Parra R. A. 2010. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 8 (1): 93-100.
- 9) Ly, M. H., Covarrubias-Cervantes, M., Dury-Brum, C., Bordet, S., Voilley, S., Le, T. M., Belin, J. M., Waché, Y. (2008). Retention of aroma compounds by acid lactic bacteria in models food media. *Food hydrocolloids*, 22, 211-217
- 10) Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Ben Omar N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- 11) Penga, K., Koubaab, M., Balsa, O., Vorobieva, E. (2020) Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid. *Food Research International*, 137, doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109544

- 12) Beresford, T., Fitzsimons, N.A., Brennan, N. L., Cogan, T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, *11*, 256-274.
- 13) Muller, J.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (XX) Manufacture of probiotic bacteria.
- 14) Montel. M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Dominique A. Vuitton, D. A., D, A., Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated
- 15) Fox, P. F., & Wallace, J. M. (1997). Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Food Microbiology*, *45*, 17–85.
- 16) Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, *78*(1), 119–131.
- 17) Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. y El-Soda, M., 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. En: *Food Microbiology*, *21*, pp.715-725.
- 18) Das, K., Choudhary, R., & Thompson-Witrick, K. A. (2019). Effects of new technology on the current manufacturing pr rocess of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. *LWT*, *108*, 69–80.
- 19) EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Probiotic LACTINA® (Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis, Streptococcus thermophilus and Enterococcus faecium) for chickens for fattening and piglets: Probiotic LACTINA® for chickens, piglets and pigs. *EFSA journal*, *11*(4), 3170.
- 20) Das, K., Choudhary, R., & Thompson-Witrick, K. A. (2019). Effects of new technology on the current manufacturing pr rocess of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. *LWT*, *108*, 69–80.
- 21) Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, *7*, 462– 478.
- 22) Klein, G., Pack, Al., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacterial *International Journal of Food Microbiology*, *41*, 103–125 benefits. *International Journal Food Microbiology*, *177*, 136-154.

- 23) Srutkova, D., Schwarzer, M., Hudcovic, T., Zakostelska, Z., Drab, V., Spanova, A., Rittich, B., Kozakova, H., & Schabussova, I. (2015). *Bifidobacterium longum* CCM 7952 promotes epithelial barrier function and prevents acute DSS-induced colitis in strictly strain-specific manner. *PloS One*, *10*(7), e0134050.
- 24) Gupta V. y Garg, R (2009). Probiotics. *Indian Journal of medical microbiology*. *27*(3):202-209
- 25) Ooi, L.D, Ahmad, R Yuen, H. y liong, M.T. (2010) *Lactobacillus acidophilus* CHO-220 e Inulina reduced plasma total Cholesterol and low density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *Journal of Dairy Science*. *93*(11):5048-5058.
- 26) Sanders, M.E (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of nutrition*. *130*:384S-390S.
- 27) Montemurro, M., Pontonio, E., Coda R., Giuseppe, Carlo (2021). Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. *Foods*, *10*, 316
- 28) Bagchi D (ed). (2008). *Neutraceutical and Functional Food Regulations*. Elsevier: New York.
- 29) WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organization Tech Rep Ser, 916 (2003), pp. 1-149
- 30) Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *11*(8), 506\_514.
- 31) A. Bezkorovainy. Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr*, *73* (2001), pp. 399S-405S.
- 32) Carballo, D. E., Mateo, J., Andrés, S., Giráldez, F. J., Quinto, E. J., Khanjari, A., Operta, S., & Caro, I. (2019). Microbial growth and biogenic Amine production in a Balkan-style fresh sausage during refrigerated storage under a CO<sub>2</sub>-containing anaerobic atmosphere: Effect of the addition of *Zataria multiflora* essential oil and hops extract. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *8*(4), 227.
- 33) Caro, I., Mateo, J., Sandoval, M.H., Soto, S., García Armesto, M. R., Castro, J.M. (2013). Characterization of Oaxaca raw milk cheese microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. Characterization of Oaxaca raw milk cheese

microbiota with particular interest in *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(6):3461-70.

- 34) Gomes AMP, Malcata FX (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 10:139–157
- 35) Robinson, R. K (2002). *Fermented Milks, Yogurt: Role of Starter Culture*, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*,
- 36) Crow, V., Curry B (2002) *LACTOBACILLUS* spp. *Lactobacillus delbrueckii* Group in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*
- 37) Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P. S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gómez, R. Gómez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M. C. Rea, and E. Rodríguez. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64:409–421
- 38) Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78. Último acceso el 10/07/2022.
- 39) Real Decreto 308/2019, de 26 de abril, por el que se aprueba la norma de calidad para el pan. BOE núm. 113, de 11 de mayo de 2019, páginas 50168 a 50175

