

Optimización de las propiedades sensoriales de una bebida fermentada elaborada a partir de pan desechado



Trabajo de fin de grado en Nutrición Humana y
Dietética

Curso: 2024-2025

Alumno: Jorge Manjarrés Alonso

Tutores: Irma Caro Canales y Teresa Sigüenza Andrés

GLOSARIO

- **PDA.** Pérdidas y desperdicio alimentario
- **MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- **FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- **HMF:** (5-hidroximetilfurfural)
- **BAL:** Bacterias ácido lácticas
- **EPS:** Exopolisacáridos
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
- **GRAS:** Generalmente Reconocido como Seguro (Por la FDA)
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias
- **QPS:** Presunción Cualificada de Seguridad
- **Log UFC/mL:** Logaritmo de unidades formadoras de colonias por mL

RESUMEN

El desperdicio alimentario es un gran problema a nivel global. Según la FAO, se desechan aproximadamente 1300 millones de toneladas de alimentos anualmente. Para contrarrestarlo, la ONU propone planes de reutilización y revalorización de alimentos basados en el concepto de economía circular. En el presente trabajo se emplearon BAL para dar un segundo uso a restos de pan desechado, elaborando una bebida vegetal funcional fermentada.

Para la fermentación, la matriz (harina y agua al 20% p/v), se trató enzimáticamente con dos enzimas amilolíticas, alfa-amilasa y glucoamilasa, y las BAL seleccionadas se inocularon a una concentración mínima de 10^5 UFC/mL empleando cepas y/o cultivos iniciadores. El proceso de fermentación se realizó en un baño de agua a 38°C durante 24 horas.

Finalmente, se llevó a cabo una prueba de aceptación sensorial de las bebidas elaboradas con la adición final de diferentes combinaciones de sabores. Posteriormente, se realizó un análisis de resultados de la evaluación sensorial en conjunto con los datos de parámetros de crecimiento microbiano y de pH obtenidos a lo largo del proceso de fermentación.

Palabras clave: Desperdicio alimentario, BAL, probióticos, fermentación, pH, recuentos microbianos, análisis sensorial.

ABSTRACT

Food waste is a major global issue. According to the FAO, approximately 1.3 billion tons of food are discarded annually. To counteract this, the UN proposes food reuse and revalorization strategies based on the concept of a circular economy. In the present study, LAB (lactic acid bacteria) were used to give a second life to discarded bread residues by producing a functional fermented plant-based beverage.

For the fermentation process, the matrix (flour and water at 20% w/v) was enzymatically treated with two amylolytic enzymes, alpha-amylase and glucoamylase. The selected LAB strains were inoculated at a minimum concentration of 10^5 CFU/mL using strains and/or starter cultures. Fermentation was carried out in a water bath at 38°C for 24 hours.

Finally, a sensory acceptance test was conducted on the beverages prepared with the final addition of different flavor combinations. Subsequently, the sensory evaluation results were analyzed together with data on microbial growth parameters and pH levels obtained throughout the fermentation process.

Keywords: Food waste, LAB, probiotics, fermentation, pH, microbial counts, sensory analysis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Desperdicio alimentario	6
1.2 Concepto y estrategias de la economía circular	7
1.3 Fermentación.....	11
1.4 Probióticos	15
1.5 Bebidas fermentadas a base de vegetales.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Materiales	17
3.2 Preparación de la matriz de fermentación.....	18
3.3 Fermentación de la matriz	19
3.4 Control de la fermentación	20
3.5 Análisis sensorial	21
3.6 Análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 pH.....	22
4.2 Crecimiento microbiano	24
4.3 Análisis sensorial	25
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desperdicio alimentario

Cada año se pierden grandes cantidades de alimentos que han sido producidos para el consumo humano. Según la FAO, el desperdicio alimentario podría alcanzar un total de 1300 millones de toneladas anuales, lo que equivale a un tercio de los alimentos que se producen en todo el mundo (1). Sobre esto, se debe profundizar en dos conceptos clave en este ámbito. El primero es pérdida, que hace referencia a la disminución de alimentos para consumo humano durante la cadena de suministro.

Esto es más común en los países Sur Global (en vías de desarrollo), donde se desechan muchos alimentos por la falta de tecnología y desconocimiento para la recolección, manejo, conservación, especialmente con el almacenamiento, la refrigeración y el envasado (2) (3). Básicamente, todos estos problemas derivan del nivel económico y el retraso en el desarrollo, haciendo que sea mucho más difícil producir a gran escala sin comprometer la seguridad y la calidad alimentaria (3).

En cambio, en los países del Norte Global ("mundo industrializado")(2), entra en juego el otro término mencionado anteriormente: desperdicio, que está directamente relacionado con el consumidor final, quien, deshecha grandes cantidades de comida por mala planificación en la compra, desconocimiento sobre el aprovechamiento culinario o creencias erróneas en torno a la seguridad alimentaria (4) (5).

Además, otra causa de desperdicio alimentario en estos países, son los estándares de calidad estética que los consumidores imponen a los productos. En algunos casos, estos estándares son muy altos y los alimentos se eliminan porque no son visualmente atractivos a pesar de que responden a la normativa alimentaria. Otras causas están relacionadas con el mal cálculo del stock y del pronóstico de venta de los mayoristas y distribuidores, que se ven en la necesidad de rechazar grandes volúmenes de estos productos (3).

Todo esto, genera indirectamente un aumento de la huella hídrica y de carbono, ya que según el informe “Emisiones de gases de efecto invernadero en el sistema agroalimentario y huella de carbono de la alimentación en España” (6), el desperdicio alimentario es responsable de una cuarta parte de las emisiones generadas procedentes del sistema agroalimentario. Asimismo, el medio ambiente también resulta perjudicado de otras formas, ya que se utiliza aproximadamente un 30% de la superficie agraria global para producir alimentos que finalmente no se consumen, dando como resultado la

deforestación de grandes hectáreas según la “Ley 1/2025, de 1 de abril, de prevención de las pérdidas y el desperdicio alimentario” (7).

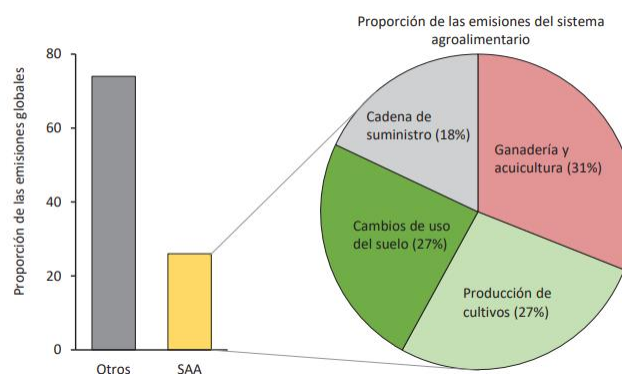


Figura 1: Cantidad de las emisiones globales que corresponden al sector agroalimentario y división de éstas (6).

Según el panel de cuantificación de desperdicio alimentario elaborado por el MAPA en 2020, se desecharon aproximadamente 25 millones de Kg por semana en los hogares españoles. Cerca de 1,4 kg por hogar, siendo las frutas, las verduras y los lácteos los productos más desperdiciados. A pesar de que mejoraron las cifras de desperdicio, siguieron siendo altas, 3 de cada 4 hogares españoles desecharon alimentos (8) (9).

Fuera del ámbito doméstico, casi el 50% de los españoles desperdiciaron algún alimento, bebida o aperitivo. De estos, destaca el desperdicio alimentario que alcanzó los 11,2 millones de kg de desecho, esencialmente de verduras y hortalizas, carne y pan. En concreto, el desperdicio de pan fuera del hogar fue de 1,5 millones de kg (10).

A largo plazo, la senda del desperdicio sigue siendo decreciente, ya que en el año 2023 el desperdicio en hogares disminuyó un 13,2% con respecto al año 2020. Fuera del hogar, existe una mejora del aprovechamiento, pero no tan positiva ya que se redujo en un 0,4% con respecto al año 2022. Como en el año 2020, los alimentos más desaprovechados fueron verduras y hortalizas, carne y pan (11) (12).

1.2 Concepto y estrategias de la economía circular

El concepto de economía circular nace para ayudar a cambiar los modelos tradicionales, como la economía lineal, donde el material se extrae del medio ambiente, se procesa y luego finalmente se elimina. En el modelo circular, esta última parte se omite, porque los productos utilizados pasan a un nuevo ciclo de producción que los convierte en nuevas materias primas. De esta forma, se optimiza el uso de los recursos, asegurando la

eficiencia de la producción, en palabras de Janez Potocnik, Comisario Europeo de Medio Ambiente (13).

En la Unión Europea, la economía circular es una estrategia política y económica que busca producir recursos y bienes lo más eficaz y eficiente como resulte posible, preservando el medio ambiente y el adecuado uso de materias primas y fuentes de energía. Esta iniciativa cuenta con el respaldo del Consejo Europeo y del Parlamento Europeo, que insisten en la importancia de reducir la huella de carbono tanto como sea factible (3).

Esta estrategia es novedosa porque considera los impactos ambientales del producto, desde su creación y hasta el final de su vida útil, promoviendo su reutilización y reciclaje (3).

El objetivo final, es crear riqueza y empleo obteniendo un beneficio ambiental y buscando siempre la constante innovación (3).

En España, la estrategia europea de economía circular ha servido de inspiración para crear cada vez más campañas y programas de concienciación y programas de investigación y de capacitación. No solamente para reducir el desperdicio alimentario, sino también, para mejorar el medio ambiente (14). Además, España, tiene una estrategia individualizada de economía circular con el objetivo de obtener una serie de logros basados en la agenda 2030, que básicamente persiguen reducir la generación de residuos alimentarios a nivel tanto de hogar, como en la cadena de suministro; minorista, cadena de producción, contribuyendo a incrementar la reutilización de productos usados y reducir la emisión de gases de efecto invernadero. Otras estrategias recogidas en la mencionada agenda, se centran en contribuir a un uso correcto del agua doméstica y en aumentar la eficiencia energética de cara a cumplir con lo acordado en el acuerdo de París (15). Otras medidas que adopta esta agenda, es la de dotar de libertad a las comunidades autónomas para implementar sus propias políticas institucionales, cuyas medidas están en pleno aumento (14). Todas estas medidas estiman buenos resultados a largo plazo según las comparaciones de desperdicio alimentario anual realizadas por el MAPA, a través del “Panel de cuantificación del desperdicio alimentario en hogares” (8).

*** Formas de reutilización alimentaria**

Existen diferentes formas para reintroducir un alimento a un modelo de economía circular, por ejemplo, la introducción de desechos como manzanas, tomates, zanahorias

o patatas en piensos para animales de consumo humano. Otro posible uso, puede ser con fines cosméticos, ya que los carotenoides en cremas protegen del daño oxidativo al igual que subproductos cítricos (3). Otro método, es la digestión anaeróbica de los residuos alimentarios, este procesado permite, por un lado, utilizar el desecho como fertilizante de hongos o de vegetales y por el otro lado, como biogás o como HMF (precursor de resinas y bioplásticos). El único inconveniente es que la bioconversión a metano a veces es ineficiente, siendo necesario algún pretratamiento como la extrusión mecánica, química, biológica o térmica, como ejemplificación (16).

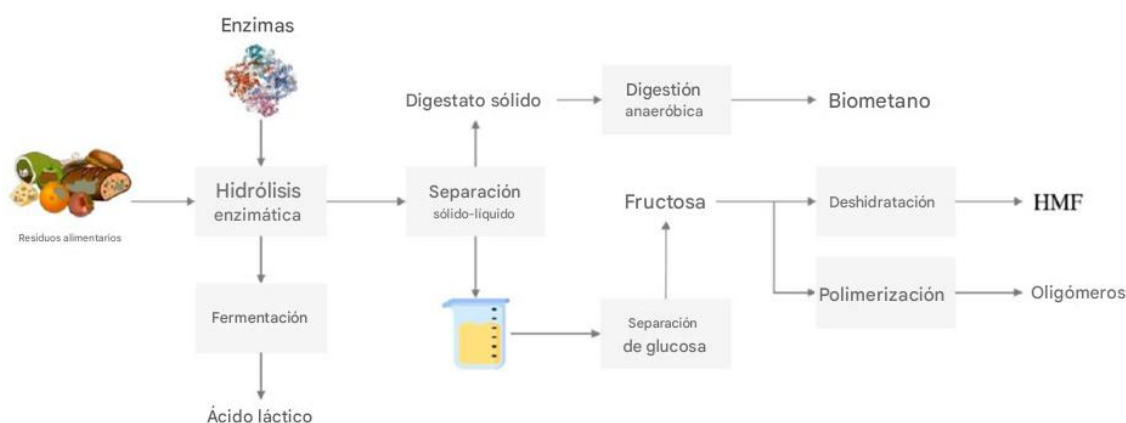


Figura 2: Diagrama de flujo sobre la reintroducción integral de alimentos a un nuevo ciclo de vida útil a través de distintas etapas y utilizando técnicas de valoración múltiple para maximizar la obtención de diferentes compuestos (16).

Como se puede observar en la **Figura 2**, la hidrólisis enzimática rompe los enlaces $\alpha 1-4$ con ayuda de la α -amilasa para formar glucosa libre. Esta glucosa libre es utilizada por las BAL como sustrato para iniciar la fermentación en una matriz y producir principalmente ácido láctico y al mismo tiempo, el residuo sobrante, se puede aprovechar separando su parte sólida (dará lugar a biometano) de la parte líquida que se usará para producir hidroximetil furfural y fracciones más pequeñas de seis moléculas llamadas oligómeros (se obtiene como resultado HMF y polímeros diversos) (16).

Recientemente se están usando los desechos alimentarios como alimento de larvas de mosca soldado-negra (BSFL), que son capaces de convertir residuos inservibles en proteínas y grasas de alto valor biológico para animales (3).

Otro uso reciente del alimento o de sus estratos, es la microencapsulación, el secado o el liofilizado para obtener minerales, fibras, vitaminas u otras sustancias para múltiples

finés, especialmente farmacéuticos. Con los futuros avances en biotecnología aplicada a residuos orgánicos, cada vez serán más prácticos y escalables estos procesos (17).

*** Procesos tecnológicos utilizados en la reintroducción de residuos alimentarios a la cadena de producción y consumo de alimentos**

Existen diferentes formas de pretratamiento entre las que podemos mencionar; físicas, químicas, térmicas y biológicas. La elección de pretratamiento viene determinada por el tipo de desecho. Dentro de los pretratamientos físicos encontramos fundamentalmente máquinas mecánicas de alta presión. En este apartado destaca la extrusión, una técnica que combina el tratamiento térmico debido a que, por un breve período de tiempo, se somete al alimento a alta temperatura y presión, con la intencionalidad de que sus polímeros se degraden en unidades más sencillas, permitiendo romper estructuras complejas, algo que también sucede en el tratamiento industrial con microondas que es otra forma de pretratamiento térmico (18).

Dentro de los tratamientos biológicos, se encuentra la hidrólisis enzimática, una técnica eficiente para la producción de múltiples componentes sencillos, es decir monosacáridos o aminoácidos, a partir de la matriz íntegra, como se explicó anteriormente mediante la **Figura 2**. Esta técnica también se puede llevar a cabo mediante una hidrólisis ácida o alcalina, denominada hidrólisis química que consta del mismo proceso que su homóloga, pero en vez de emplearse el uso de enzimas, se utiliza para la hidrólisis, un ácido o una base fuerte (16) (19).

No todos los pretratamientos o procesos utilizados son seguros para el medio ambiente, ya que hay alguna técnica como la pirólisis, que degrada los residuos a altas temperaturas (en torno a los 600 °C, aunque depende del tipo de reactor que se emplee), generando energía en forma de alquitrán o de carbón. Es decir, libera grandes cantidades de hidrocarburos condensables (20).

A pesar de que esta opción térmica no es tan recomendable, existe una similar también llevada a altas temperaturas que mitiga las producciones de contaminantes atmosféricos, al producirse prácticamente en ausencia de oxígeno y generando gases ricos en hidrógeno. Esta es la gasificación (20).

Existen diversos procesos para conservar los alimentos, uno de ellos es la liofilización, proceso que aumenta la vida útil del producto. Este proceso consta de dos etapas, primero

el alimento se congela, para posteriormente deshidratarlo por sublimación. De esta forma se mantienen sus propiedades organolépticas y funcionales por un período mayor. Es ideal para matrices sensibles, aunque su inconveniente es su elevado coste (21).

Otra opción más económica para alargar la conservación de un producto es la fermentación, la cual vamos a analizar en profundidad en el siguiente apartado (22).

1.3 Fermentación

Es un proceso que puede ser anaeróbico o desarrollarse en condiciones aerobias a través del uso diferentes microorganismos que utilizan hidratos de carbono y otras sustancias orgánicas para producir diversos metabolitos. Los más conocidos son etanol, ácidos orgánicos, vitaminas y biopéptidos activos con funciones fisiológicas que mejoran la salud de las personas. Como ejemplo, los tripéptidos Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP), son inhibidores de la angiotensina y vasodilatadores y, por lo tanto, disminuyen la presión arterial. Además, estos biopéptidos aumentan la biodisponibilidad de minerales y liberan enzimas que degradan los antinutrientes presentes en los alimentos o materias primas (23). Los metabolitos producidos durante la fermentación dependen tanto del tipo de microorganismo utilizado como del residuo como del sustrato alimentario utilizado. Entre los principales compuestos formados en la fermentación encontramos diversos tipos como; etanol, ácido láctico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido acético, acetona (22). Desde el punto de vista alimentario puede ser inducida o controlada, como ocurre en casos industriales. Este proceso alarga vida útil, mejora las propiedades y la seguridad de los alimentos y se utilizan cultivos iniciadores también conocidos como *estárter*; sin embargo, la fermentación puede ser espontánea, es decir, producirse de forma natural, por los microorganismos que contiene el propio alimento (22).

A los alimentos o productos fermentados se les atribuyen numerosas ventajas como el control del peso, la mejora de enfermedades cardiovasculares, y gastrointestinales. Así como el fortalecimiento de las funciones inmunológicas. Estos beneficios se atribuyen a los metabolitos producidos por los microorganismos presentes en el alimento, que modulan la microbiota intestinal mejoran la integridad de la barrera intestinal y regulan respuestas inflamatorias en el individuo (24).

El consumo de bebidas fermentadas es cada vez más habitual, representando el 25% de la ingesta dietética en Europa (25).

*** Tipos de fermentación**

En cuanto a tipos de fermentaciones se diferencian según el principal compuesto formado durante la fermentación y se conocen principalmente cuatro básicas. La primera es la fermentación alcohólica, en la cual se produce principalmente etanol y se lleva a cabo a partir de la acción de levaduras, para dar lugar a productos como el vino, la cerveza o tipos de pan (26). La segunda, es la fermentación acética, que convierte el alcohol en acetato mediante la intervención de la especie *Acetobacter*, un alimento característico proveniente de este proceso es el vinagre (27).

En tercer lugar, encontramos la fermentación “alcalina” en alimentos ricos en proteínas, donde los microorganismos descomponen los aminoácidos generando amoníaco que eleva el pH del medio. Algo útil en el caso de algunas salsas y ciertos condimentos (27). Finalmente, existe la fermentación láctica, que ocurre en cereales, frutas, verduras y lácteos, con la consecuente formación de ácido láctico por la intervención de las BAL, que degradan azúcares fermentables (27).

A su vez existen dos tipos, la llevada a cabo por la vía de la glucólisis Embden-Meyerhoff (EMP), denominada homofermentativa, donde se produce casi exclusivamente ácido láctico. Por otra parte, está la vía heterofermentativa realizada por la vía de los fosfatos que solo genera un 50% de ácido láctico. La otra mitad generada es ácido acético, etanol y CO² (28) (29).

La fermentación láctica es una de las formas más antiguas de preservación, por sus propiedades antimicrobianas en todo tipo de alimentos. Recientemente, está siendo utilizada, para mejorar las propiedades funcionales y sensoriales de matrices vegetales (30).

*** Bacterias ácido-lácticas**

El término BAL es usado por la comunidad científica para agrupar y/o nombrar a un tipo de bacterias con características morfológicas y bioquímicas similares, y que se emplean en la industria alimentaria para efectuar la fermentación del alimento, principalmente una fermentación láctica, (producción de ácido láctico a partir de monosacáridos sencillos). Existen unas 530 especies y subespecies que forman parte de este grupo de bacterias. Desde el punto taxonómico estas bacterias, se clasifican según

su homología de ADN, y algunas similitudes morfológicas y fisiológicas. Los principales géneros son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (31).

Este grupo de bacterias presenta unas características comunes. Pueden ser cocos o bacilos, gran positivos y catalasa-negativos. Su hábitat es diverso, pero principalmente se pueden encontrar en los vegetales y en los ambientes en los que se elaboran productos lácteos y llegan a los alimentos a través del contacto alimento-planta o aire-alimento. Así mismo colonizan el tracto digestivo, especialmente el intestino grueso y el tracto urogenital (32). Además, son microorganismos aerotolerantes, porque a pesar de no contener catalasa como las bacterias anaerobias, pueden sobrevivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. (31) (32)

Las BAL durante la fermentación láctica producen ácido láctico y etanol en menor cantidad. La formación de ácido láctico de diversos sustratos es debida a la gran cantidad de enzimas con actividad glucolítica, lipolítica y proteolítica. Así mismo, producen una importante cantidad de EPS, que intervienen en la textura y en la viscosidad del alimento final. Estas bacterias, muestran propiedades probióticas al formar una barrera intestinal y evitar la colonización de bacterias patógenas en el intestino (32). También, producen diversas vitaminas, en especial ácido fólico y riboflavina (33).

En la industria, las BAL suelen usarse como cultivos iniciadores. Un cultivo iniciador es una mezcla de muchas células de al menos un microorganismo vivo o latente que se agrega intencionalmente a una matriz alimentaria para provocar y controlar su fermentación (34). Los principales géneros de BAL utilizado como cultivos iniciadores son: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Ligilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*.

*** *Lactobacillus***

El género *Lactobacillus*, ha sido uno de los taxones bacterianos más importantes desde el punto de vista industrial. Se observó que su presencia en las leches fermentada mejoraba la salud de los consumidores, pero también es de los más complejos, desde el punto de vista taxonómico. En un principio la taxonomía de este género se basó en sus características fisiológicas similares (tinción de pared celular, morfología de las células y apariencia de las colonias, así como los parámetros de crecimiento (pH, tiempo óptimo de incubación, tolerancia a la acidez y requerimientos de oxígeno) y en la composición de su pared celular (35). Este género hace algunos años estaba compuesto por

aproximadamente 200 especies de amplia variabilidad genética y fisiológica entre sí (36). Recientemente, a través de una aproximación polifacética en la que incluyó un análisis genómico con características fenotípicas y hábitats ecológicos, se dividió el género *Lactobacillus* en 26 linajes con 23 nuevos géneros (37). La nueva clasificación tiene un valor industrial y de salud porque tiene en cuenta el metabolismo, el hábitat y los productos derivados de ese metabolismo. Este hecho, es de vital importancia para la industria de los alimentos porque la capacidad de un microorganismo para producir un producto deseado requiere de parámetros de crecimiento estrictamente definidos y reproducibles, es decir el producto obtenido del crecimiento microbiano depende tanto de la bacteria usada como de la matriz (38).

Los lactobacilos como cultivos iniciados ayudan a controlar el pH del producto fermentado, influyen en el crecimiento de otros microorganismos y causan proteólisis y lipólisis que afecta a la textura y el aroma. Además, ayudan a la conservación de los alimentos, debido a la producción de alcohol, ácidos orgánicos CO₂, diacetilo, peróxido de hidrógeno y otras sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables (35) (39). No obstante, algunas especies pueden ser peligrosas, especialmente en inmunodeprimidos (40).

Respecto a las condiciones óptimas de crecimiento de este género, la temperatura suele oscilar entre 30-40 °C (la mayoría son mesófilos) y el pH se sitúa entre 5,5-6,2 (si el pH fuese alcalino no habría crecimiento). Aun así, estas BAL tienen la capacidad de crecer a temperaturas entre 2-53°C (39) (41).

*** *Streptococcus***

El género *Streptococcus* comprende 99 especies reconocidas, algunas de las cuales se encuentran en humanos: en la cavidad oral, en las vías respiratorias, en las mucosas o en tracto intestinal y en el genitourinario. El grupo está formado por cocos dispuestos en pares o en cadenas. No son móviles ni formadores de esporas y son halotolerantes (hasta un 6,5% de NaCl) (42) (43).

En cuanto a condiciones de crecimiento, la mayoría son anaerobios facultativos, exceptuando algún caso de anaerobio obligado. Su rango de crecimiento comprende de los 20 a los 42 °C, encontrándose el punto óptimo de crecimiento en los 37°C. Además, algunos son capnófilos, ya que necesitan CO₂ para crecer y son homofermentativos, por lo que sólo producen ácido láctico (43).

A pesar de producir en algunos casos sustancias probióticas o bacteriocinas, hay determinadas cepas que pueden ser patógenas como el *Streptococcus mutans* en la placa dentaria o el *Streptococcus pyogenes* que coloniza la piel y los epitelios de la nasofaringe (44).

1.4 Probióticos

La OMS define probiótico como los microorganismos vivos que cuando se administra en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del huésped (45). Ahora bien, deben cumplir una serie de directrices propuestas en el Codex para poder considerarse como tal. Como es lógico, debe demostrarse su seguridad e inocuidad y sus propiedades funcionales y efectos beneficiosos en el alimento mediante ensayos tanto in vivo como in vitro (46). En Europa, la EFSA tiene su propia designación para valorar la seguridad microbiana, denominada QPS (un equivalente a la designación GRAS de la FDA). Ninguna especie del género *Enterococcus* es poseedora de ella, por su capacidad de funcionar como patógenos oportunistas. En cambio, la mayoría de *Lactobacillus* y algunos *Streptococcus*, portan esta insignia (31) (47).

Además, debe de incluir una caracterización taxonómica y de la cepa y estar en concentraciones adecuadas previas al consumo (al menos 10^9 UFC por porción diaria). Si ha pasado estos requisitos se debe de comprobar su resistencia a la acidez gástrica, a los ácidos biliares y a la lisozima. Si se adhiere a moco o a las células epiteliales y es capaz de eliminar bacterias patógenas, superaría los ensayos opcionales (46). Finalmente, se comprueba que el microorganismo no induzca a translocación bacteriana (paso de bacterias desde el tracto gastrointestinal a sitios extraintestinales) (48), ni produzca toxinas, ni posea genes específicos de resistencia a antibióticos. Si cumple esto y todo lo visto anteriormente se podría comercializar como probiótico. (46)

La mayoría de las BAL, tienen propiedades probióticas, pero no tienen por qué ser probióticos.

Las BAL consideradas probióticos, cuentan con importantes beneficios a nivel digestivo, ya que regulan los niveles de pH intestinal, mejoran los síntomas de la intolerancia a la lactosa o modulan el microbioma del colon entre otras (49). Además, reducen los niveles de colesterol, mejoran el pronóstico de la diabetes y son inmunomoduladores. Todo esto

sumando a las propiedades que ya se mencionaron en el apartado dedicado a esta línea de bacterias (49).

1.5 Bebidas fermentadas a base de vegetales

Cada vez una parte mayor de la población busca alternativas a los productos fermentados de origen animal. Las causas de esto son diversas, en algunos casos, debido a intolerancias, ya que algunos individuos por razones genéticas producen menos lactasa (enzima que degrada la lactosa) y no digieren bien este disacárido. Por el contrario, otros grupos de población presentan molestias digestivas por reacciones inmunitarias ante las proteínas de este alimento, en especial la caseína (50). Este hecho puede ser debido al polimorfismo genético que presenta el ganado europeo, que produce la variante de β -caseína A1. Esta proteína es probablemente el agente causal del dolor abdominal (50).

Otros motivos de búsqueda de alternativas a los alimentos de origen animal, son las cuestiones referentes al bienestar animal y al daño ambiental. Esto sumado a la búsqueda de un patrón saludable, ha tenido el efecto de que se busquen otro tipo de bebidas sustitutivas de buena composición nutricional y de buenas propiedades sensoriales. Aquí aparece la idea de las bebidas vegetales fermentadas. Estas bebidas, son emulsiones coloidales con material vegetal disperso que reproducen al lácteo tradicional y que son fermentadas por la acción de microorganismos. Las bebidas fermentadas vegetales, no contienen ni lactosa, ni proteínas lácteas, ni colesterol (51).

No obstante, estas bebidas presentan una serie de limitaciones. Por ejemplo, una peor calidad proteica, (salvo en algún caso concreto como en la bebida de soja); que presentan cantidades más bajas de micronutrientes respecto a la leche animal y que pueden contener, tanto alérgenos proteicos como anti nutrientes como fosfatos de inositol, ácido fítico e inhibidores de tripsina (51).

Las bebidas de origen vegetal se pueden clasificar en cinco categorías: Bebidas de legumbres, de frutos secos, de cereales, de semillas y de pseudocereales. Además, en el mercado se pueden encontrar otros fermentados, como los jugos de frutas o algunas infusiones, a pesar de ser prácticamente acalóricas (51).

En cuanto a las bebidas de cereales, al ser fuentes ricas de carbohidratos y minerales, ofrecen numerosas ventajas sensoriales y nutricionales. Este tipo de productos destaca por su contenido en fibra, flavonoides, compuestos fenólicos, antioxidantes, ácidos grasos

omega-3 y biopéptidos entre otros (52). En Europa, existe una gran cantidad de bebidas tradicionales fermentadas de origen cereal, como el kvass y la boza en la región oriental. Éstas son tradicionalmente elaboradas con malta de cebada y centeno fermentada, harina de centeno y harina de mijo (53).

2. OBJETIVOS

* **Objetivo general**

El objetivo general de este trabajo es optimizar el proceso de elaboración de una matriz fermentada a base de harina de pan desechado, mediante el uso de diversos ingredientes alimentarios.

* **Objetivos específicos**

- Proponer un cultivo iniciador para la elaboración de una bebida fermentada a base de pan.
- Establecer ingredientes alimentarios que mejoren el sabor de la bebida fermentada para que sea aceptable por los consumidores de bebidas fermentadas de origen vegetal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Harina de pan: Molida en molino con un tamiz de 200 μm .

* **Enzimas:**

* α -amilasa (Liquoflow® Yield), cuya dosis recomendada se recoge en la Tabla 1

Tabla 1. Dosis recomendada para α -amilasa

Producto	* Dosis en gramos por tonelada de almidón	* Dosis en gramos por tonelada de grano
Liquoflow® Yield	105-315	70-210
Producto	* Dosis en μl por gramo de almidón	* Dosis en μl por tonelada de grano
Liquoflow® Yield	0,09-0,269	0,06-0,179

* β -glucoamilasa (**Saczyme® Go**), la dosis recomendada usada fue la indicada por el fabricante (0,023 a 0,033%).

*** BAL utilizadas**

Las bacterias lácticas utilizadas en este trabajo de investigación fueron cepas específicas de microorganismos (colección de cultivo de la Dra. Irma Caro Canales) y cultivos lácticos procedente la empresa Christian Hansen y cedidos amablemente por la empresa Novonesis. Las cepas y los cultivos lácticos fueron conservadas a -80°C. Las cepas fueron crecidas previamente en TSB + YE (0,5%: Difco) durante 24 horas con excepción de *L. reuteri* que necesitó dos pases de 24 horas. Mientras los cultivos lácticos fueron manipulados según las recomendaciones del proveedor (Christian Hansen). Los cultivos fueron diluidos brevemente, en agua de peptona estéril hasta alcanzar la concentración deseada para la inoculación de la bebida.

Para realizar los cálculos de la concentración inicial de las BAL utilizada se usó la siguiente ecuación:

$$V_i * C_i = V_f * C_f$$

Dónde: V_i es el volumen inicial del inóculo, C_i es la concentración cepa o cultivo láctico utilizado, V_f es el volumen final (250 mL) y C_f es la concentración final (10^5 UFC/mL).

Cepas

- *Lactiplantibacillus plantarum*
- *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG
- *Limosilactobacillus reuteri*
- *Lacticaseibacillus casei* subsp. *paracasei*

Cultivos iniciadores

- Harvest LB-1 (*Lactiplantibacillus plantarum*)
- YoFlex ® (*Lactobacillus delbrueckii*+ *Streptococcus thermophilus*)
- Vega TM Mild (*Streptococcus thermophilus*)

3.2 Preparación de la matriz de fermentación

En primer lugar, se mezclaron 50g de harina con 200 mL de agua, previamente esterilizada, (p/v: 80% de agua y un 20% de harina fina), dando como resultado 250 mL de bebida.

A continuación, se agitó la bebida con ayuda de un agitador mecánico (Micra D9) durante 1 minuto. El vástago del agitador fue previamente esterilizado con alcohol al 96 % y limpiado con agua estéril para eliminar la posibilidad de contaminación cruzada. Posteriormente, la matriz fue pasteurizada a 75°C durante 10 minutos.

Una vez terminada la pasteurización, la matriz fue conservada a 4°C.

3.3 Fermentación de la matriz

Tras 24 horas de la preparación de la matriz, se añadieron dos enzimas: la β - glucoamilasa (0,033% v/v) y la α -amilasa (0,021% v/v), según las recomendaciones del proveedor. Una vez agregadas las enzimas, se añadió la cepa o cultivo iniciador a una concentración inicial desde 10^5 UFC/mL.

Inmediatamente se inició la fermentación, esta se llevó a cabo en un baño de agua (Selecta P) a 38°C $\pm$ 1°C durante 24 horas. Durante este periodo de tiempo, se midió el pH y se realizaron recuentos microbianos a 0 (T0), 4 (T4) y 24 horas (T24).

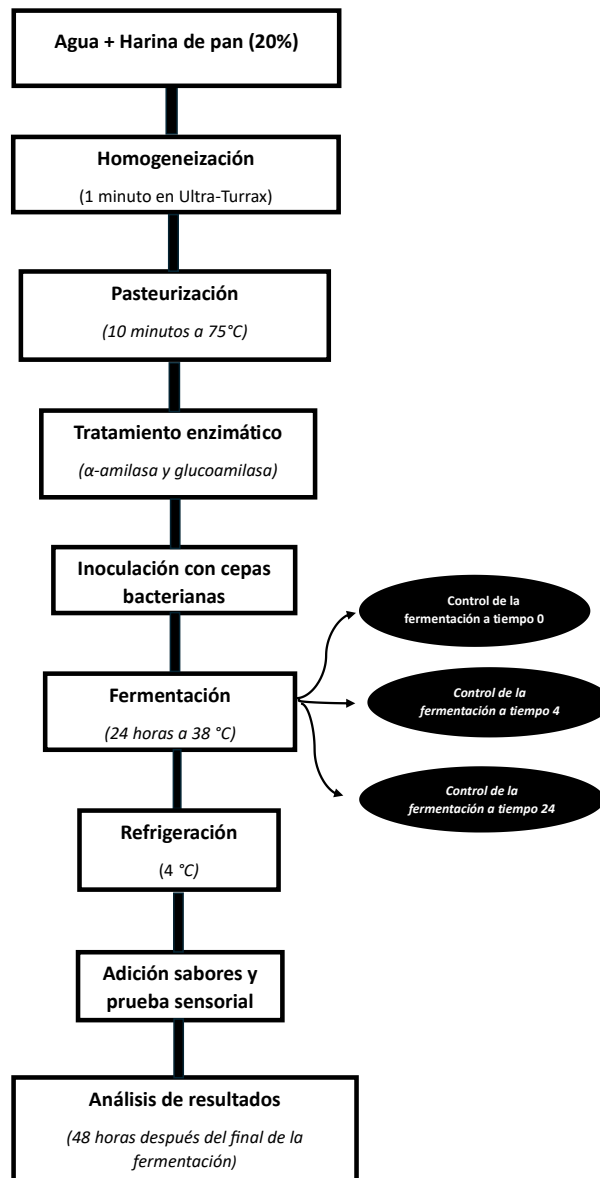


Figura 3: Diagrama de flujo del proceso de elaboración completo de la bebida. Creación de la matriz/Homogeneizado/Pasteurizado/Enzimas/Inoculación/Fermentación/Refrigeración/Adición de sabores y prueba sensorial/Toma de resultados.

Finalizada la fermentación, la bebida se refrigeró a 4°C en el frigorífico hasta el comienzo del análisis sensorial y posteriormente, dio comienzo éste.

3.4 Control de la fermentación

Como se explicó en el diagrama de flujo, durante la fermentación, se llevaron a cabo los recuentos microbianos y el pH a los tiempos 0, 4 y 24 horas.

* Recuentos microbianos

1 g de cada muestra fue tomado a los tiempos de incubación T0(a las 0 horas de la inoculación), T4(tras 4 horas) y T24(tras 24 horas) y diluido en agua de peptona (0,01% peptona, 0,6% de NaCl; WWR BDH Chemicals) en un frasco de 5 mL. Posteriormente, la muestra fue agitada y se realizaron diluciones seriadas para contar entre 30 y 300 colonias por placa. Las diluciones fueron sembradas en placas Petri con Agar MRS (Agar Man, Rogosa and Sharpe (WWR BDH Chemicals) e incubadas en estufa a 37°C durante 48 horas, exceptuando el cultivo comercial Harvest -LB-1 que se incubó a 30°C. Tras 48 horas de incubación se realizaron los recuentos microbianos.

*** Determinación del pH**

El pH fue medido a 0, 4 y 24 horas durante el periodo de fermentación. Para realizar su medida se tomaron 5 mL de la bebida fermentada que se depositaron en 1 tubo falcón de 15 mL y se midió con ayuda de un pH-metro BASIC 20 (Crison) previamente calibrado.

3.5 Análisis sensorial

Se efectuó el análisis sensorial con consumidores para comparar las diferentes matrices. En este análisis se evaluaron los parámetros de textura, sabor, olor, apreciación del grado de acidez y aceptación global de las bebidas fermentadas elaboradas sin adición de ingredientes (natural) y con la adición de ingredientes alimentarios como; canela, vainilla, nueces, dátiles, café, chocolate al 10% (v/v). Se evaluaron 5 mL de cada una de las bebidas formuladas con los ingredientes antes mencionados.

El análisis fue realizado por 15 catadores voluntarios de la Facultad de Medicina con edades comprendidas entre 18-57 años. Además, fue ejecutado en una sala cerrada siguiendo las recomendaciones de (55) y con ayuda de la ficha de cata que se encuentra en el **Anexo I**, que evaluó mediante una escala hedónica el grado de aceptación de los parámetros antes mencionados (56). Escala de 1 (“Me disgusta muchísimo”) a 9 (“Me gusta muchísimo”).

3.6 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media y su desviación estándar, Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) STATGRAPHICS Centurion XIX (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EE. UU.) para pH, tipos de BAL e ingredientes o

sabor utilizado. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$ según las diferencias mínimas significativas del estadístico LSD.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 pH

En la **Tabla 2**, se recogen los valores medios de pH de distintos microorganismos probióticos a 0, 4 y 24 horas de incubación. El pH inicial de la mezcla fue cercano a 5,9 al principio de la fermentación. Sin embargo, tras 4 horas de incubación el cultivo mixto YoFlex (c.6) mostró una disminución significativa de pH (1,21 unidades) en comparación con otras cepas o cultivos iniciadores. Tras 24 horas de la fermentación, tanto las cepas de BAL, como los cultivos iniciadores disminuyeron el pH a valores por debajo de 4,0, exceptuando *L. casei* (c.4).

El cultivo iniciador Vega-Mild (c.7) fue el que mostró los valores de pH más altos (3,67) y la cepa que menos acidificó fue *L. casei* con un pH de 4,57. La disminución de pH observada en este trabajo, indica que la matriz hidrolizada proporciona un adecuado sustrato para el crecimiento de las BAL. Asimismo, indica que el proceso de elaboración utilizado, que implica por un lado la pasteurización de la matriz y, por otro su hidrólisis por enzimas amilolíticas es correcto o necesario para incrementar la glucosa disponible (55). Por tanto, estas dos condiciones contribuyen al crecimiento de BAL y a la producción de ácido láctico como principal metabolito a través de la ruta de Embden-Meyerhof (35).

Tabla 2: Valores medios (DE $\pm$) de pH de diversos microorganismos probióticos a diferentes tiempos del proceso de fermentación

Espece LAB empleada	código	cepa	pH T0	pH T4	pHT 24
<i>L. plantarum</i>	-	1	6,03 $\pm$ 0,01 ^a	5,86 $\pm$ 0,12 ^c	3,36 $\pm$ 0,02 ^{ab}
<i>L. rhamnosus</i>	-	2	5,7 $\pm$ 0,05 ^a	5,75 $\pm$ 0,18 ^c	3,19 $\pm$ 0,09 ^a
<i>L. plantarum</i>	Harvest	5	5,88 $\pm$ 0,04 ^a	5,85 $\pm$ 0,03 ^c	3,32 $\pm$ 0,11 ^{ab}
<i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i>	YoFlex	6	5,86 $\pm$ 0,15 ^a	4,65 $\pm$ 0,14 ^a	3,47 $\pm$ 0,07 ^b
<i>S. thermophilus</i>	Vega-Mild	7	5,88 $\pm$ 0,31 ^a	5,1 $\pm$ 0,18 ^b	3,67 $\pm$ 0,05 ^c

BAL: bacterias ácido-lácticas; T0:0 horas (inicio de la fermentación); T4:4 horas (Tras 4 horas de fermentación; T24:24 horas; Valores con letras distintas en superíndice en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Desde el punto de vista industrial se considera que las BAL, que producen una disminución de 1,3 unidades de pH a 30°C durante 6 horas, son cultivos o cepas acidificantes (57). Esta característica tecnológica de las BAL evita el crecimiento de microorganismo indeseables y mejora las características de textura, sabor y olor de los alimentos fermentados (58).

En cuanto a las cepas, no se encontraron diferencias significativas a ningún tiempo en la cepa 1 y el cultivo iniciador 5, ambas *L. plantarum*. Las dos alcanzaron un pH final de los más ácidos del experimento, gracias a su capacidad para metabolizar la glucosa, el monosacárido presente tras hidrolizar la matriz (α -amilasa y glucoamilasa). Además, las cepas de esta especie toleran adecuadamente pH ácidos (59) (60).

Sin embargo, la velocidad de acidificación de *L. plantarum* a T4 fue significativamente inferior en comparación con el resto de probióticos utilizados con excepción *L. rhamnosus* (c.2). Es posible que este microorganismo requiera de una adaptación al sustrato de fermentación, o que necesite un nutriente derivado de la hidrólisis de los componentes de la matriz fermentable, por ejemplo, aminoácidos derivados de la proteólisis. En este sentido es conocido que *L. casei* subp *paracasei* activa una ruta denominada fermentación maloláctica, que convierte el malato en lactato, liberando CO₂ que incrementa el pH del medio (61).

L. reuteri (c.3) mostró una capacidad de acidificación constante a lo largo de la fermentación alcanzando valores de pH a T 24 horas de 3,66. Estos valores son similares a los encontrados por otros autores para bebidas vegetales de cereal a base de mijo y arroz integral (62).

Por el contrario *L. rhamnosus*, experimentó un descenso importante del pH al final de la fermentación. A T4, su valor se situó en 5,75 dato promedio o incluso alto en comparación con los otros cultivos. Mientras que a T24, obtuvo un valor más bajo, con un pH promedio de 3,19. Este fenómeno se puede explicar, porque *L. rhamnosus* presenta una fase de adaptación más lenta (tiempo de ajuste al medio de cultivo) y, por tanto, tardó más tiempo en realizar la fermentación con la consecuente producción más baja de ácido láctico. Por otra parte, esta cepa es capaz de tolerar pH extremos y seguir produciendo ácido láctico siempre y cuando haya glucosa, lo cual explica la disminución en la fase final de la fermentación (63).

Sobre los cultivos iniciadores que contenían *S. thermophilus*, el cultivo iniciador YoFlex, alcanzó los valores de pH más bajos. Este hecho puede ser debido a que *S. thermophilus*, requiere péptidos para crecer óptimamente y que estos compuestos no estuvieran presentes en la matriz vegetal (64). Por otra parte, *L. delbrueckii* genera aminoácidos, péptidos y CO₂, lo cual contribuye a la activación completa de *S. thermophilus*, produciéndose una sinergia metabólica entre ambas cepas. El resultado final es una mayor fermentación del cultivo mixto en comparación con el monocultivo. (65).

4.2 Crecimiento microbiano

La **Figura 4**, recoge los recuentos medios de las BAL a través de la fermentación de la matriz de harina de pan y agua. La concentración inicial de inoculación osciló en torno a 10⁵ UFC/mL. Después de 4 horas de fermentación, todas las bacterias estudiadas mostraron un incremento, con excepción de Vega Mild. A las 24 horas de fermentación, se alcanzaron recuentos microbianos comprendidos entre 10⁸ y 10⁹ UFC/mL. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* y Harvest, fueron los que lograron recuentos microbianos de 10⁹ UFC/mL.

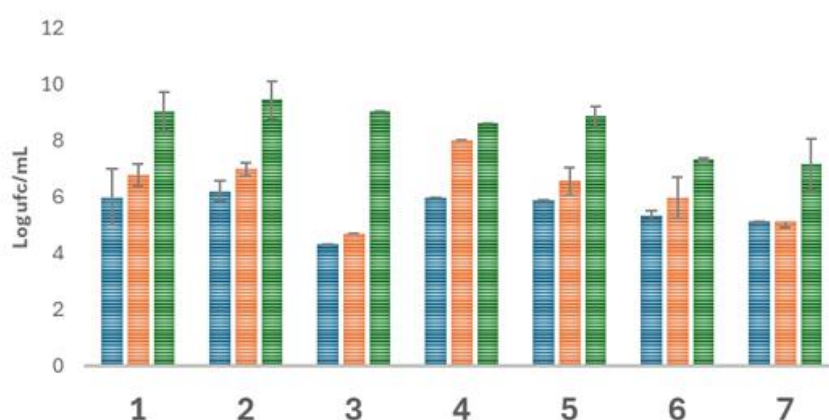


Figura 4: 1(*L. plantarum*); 2(*L. rhamnosus*); 3(*L. reuteri*); 4(*L. casei*); 5(Harvest); 6(YoFlex); 7(Vega-Mild). Recuentos bacterias ácido lácticas a lo largo de la fermentación de la bebida a base de pan. Las barras representan el promedio de los recuentos microbianos en **Log UFC/mL**, de cada BAL a cada tiempo. Siendo ■ **T0** (inicio fermentación), ■ **T4** (tras 4 horas del comienzo) y ■ **T24** (tras 24 horas). I, representa las barras de error, es decir la desviación estándar (DE). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado (n=2), salvo *L. reuteri* y *L. casei*.(n=1).

En las dos bacterias de *L. plantarum*(c.1 y c5) hubo diferencias mínimas y no significativas a lo largo de la fermentación, creciendo un poco mejor la cepa no comercial

(c.1). Aun así, el crecimiento en ambos casos fue muy positivo gracias a la tolerancia de *L. plantarum* a ambientes ácidos y a su flexibilidad metabólica (66) (67).

L. casei, (c.4) alcanzó 10^8 UFC/mL en 4 horas, a pesar de que no mostró un descenso de pH durante este tiempo, éste hecho puede explicarse debido a que esta especie favorece su crecimiento, mediante sistemas de descarboxilación de amoniácidos y bomba de protones su crecimiento no implica una mayor formación de ácido láctico (68). La disminución de los recuentos de este microorganismos a las 24 horas se pueden deber a un déficit de algún nutriente esencial, por ejemplo apéptidos y aminoácidos que se agotaron al inicio de la fermentación (69).

En el caso de *L. reuteri* (c.3), el fenómeno fue el opuesto. Durante las primeras 4 horas apenas hubo crecimiento y finalmente a las 24 horas superó las 10^9 UFC/mL. Por tanto quiere decir, que *L. reuteri* tardó más tiempo en adaptarse al entorno (mayor fase lag o de latencia). Este hecho podría deber a una la falta de nitrógeno libre en la matriz, componente necesario para el crecimiento de esta especie microbiana (70).

Los recuentos microbianos de los cultivo iniciadores de *S. thermophilus* (c.6 y c.7), a 24 horas fueron cercanos a Log 7 UFC/mL. El cultivo YoFlex fue el que alcanzó un recuento ligeramente superior ($7,32 \pm 0,07$ Log UFC/mL). Este cultivo iniciador contenía además de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* especie que produce metabolitos útiles para el crecimiento, mostrando una acción sinérgica de ambas cepas (71).

4.3 Análisis sensorial

En la **Figura 5**, se recogen las propiedades sensoriales de olor, sabor, textura, acidez, y apreciación global de la bebida fermentada con un 10% de café y sin café (natural). Esta bebida fue evaluada por 15 consumidores que, ingieren bebidas fermentadas similares y se presentan los resultados según el tipo de microorganismo. Como se puede observar en las **Figuras 5b** y **5c**, las bebidas elaboradas con *L. rhamnosus* y *L. reuteri* fueron las bebidas que obtuvieron las puntuaciones más altas en todos los parámetros estudiados, especialmente, la bebida elaborada con *L. reuteri* y 10 % de café alcanzo puntuaciones de 6,4 en la valoración global. Estos resultados fueron superiores a los observados en (72) , quiénes obtuvieron bajas puntuaciones por los consumidores (2,95-3,18 sobre 9) para una bebida fermentada con *L. reuteri* y a base de cereales (cebada, malta, trigo y avena). *L. reuteri* es una bacteria heterofermentativa, es decir, además de producir ácido láctico produce compuestos como acetaldehído, acetoína, ácido butírico que mejoran el sabor de

las bebidas fermentadas (73). Además, esas puntuaciones pudieron estar influenciadas por un pH no muy ácido (3,66). Finalmente, este microorganismo probiótico produce β -hidroxi-propional-aldehído, es decir reuterina que inhibe a microorganismos patógenos presentes en el intestino del hospedador confirmando su carácter probiótico (35).

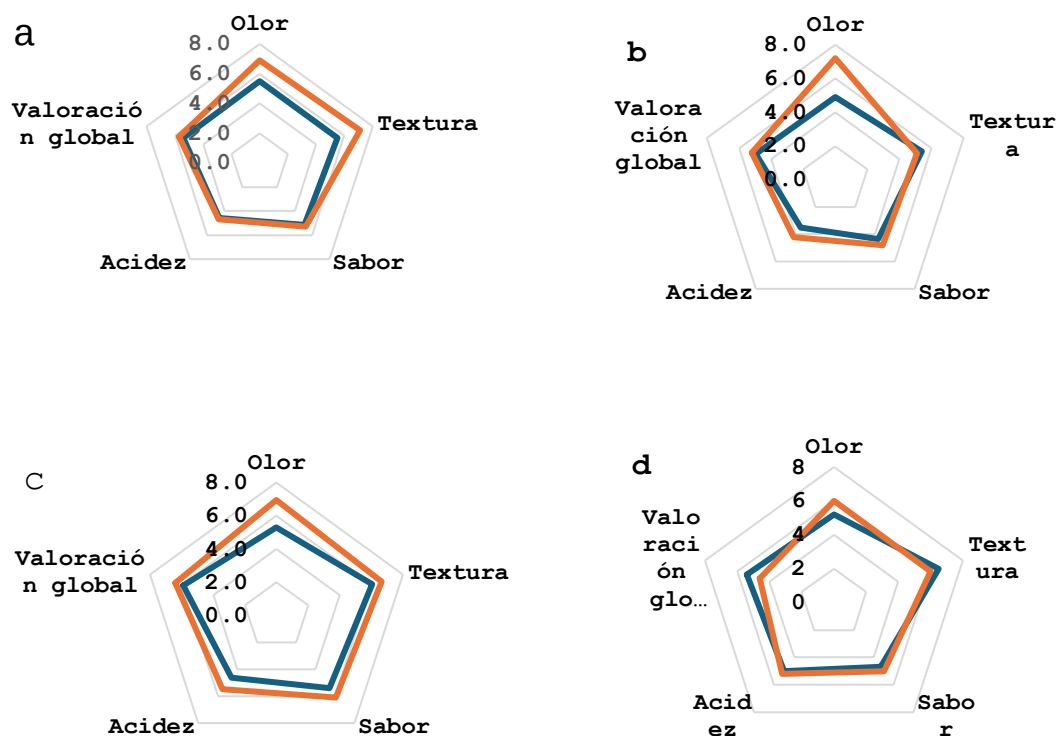


Figura 5: Perfil sensorial de bebidas fermentadas elaboradas con diversos microorganismos probióticos a en . a) *L. plantarum*; b) *L. rhamnosus*; c) *L. reuteri*; d) *L. casei*; (—) sabor natural y (—) sabor a café. Se presentan la media de los resultados (n=15)

La adición de café, mejoró las puntuaciones de todas las bebidas indistintamente del tipo de microorganismo utilizado. Este hecho permite suponer que la bebida fermentada con ingredientes alimentarios puede mejorar aún sus puntuaciones. Este efecto, también, se observa en las bebidas fermentadas con el cultivo iniciador de Haverst que contiene *L. plantarum* (ver **Figura 6**). En este caso el atributo de olor fue significativamente más alto para la bebida adicionada con café en comparación con la bebida natural.

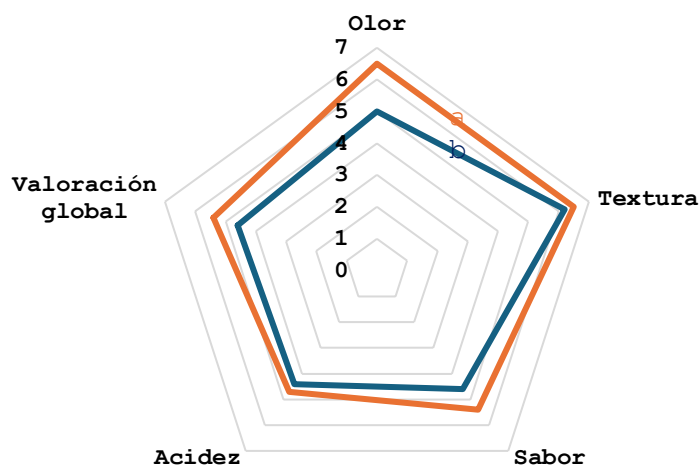


Figura 6: Perfil sensorial de bebida fermentadas elaborada a base de una matriz de pan de desecho y agua, con cepa comercial de *L. plantarum* (Harvest); (—) Sabor natural y (—) sabor a café. Se presentan la media de los resultados (n=15). Valores con letras distintas en un mismo parámetro muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Color de letra y orden según posición en figura. Si no presencia de letras, no diferencias significativas para ese parámetro.

En la **Figura 7**, se recogen las puntuaciones de los consumidores para las bebidas fermentadas con 4 cepas y 3 cultivos iniciadores para el sabor natural (**Figura 7a**) y con sabor a café (**Figura 7b**). La bebida con el iniciador Vega-MildTM sin adición de café obtuvo valores significativamente más altos para los atributos de olor, sabor, acidez y valoración global. Este cultivo iniciador, que está compuesto por *S. thermophilus*, mostró un pH de 3,66 y alcanzó un recuento medio de $7,15 \pm 0,9$ Log UFC/mL. Esta especie genera compuestos que aportan notas suaves y aromáticas, como son los acetaldehídos y diacetilos, contribuyendo así a la mejora gustativa de la bebida final (74).

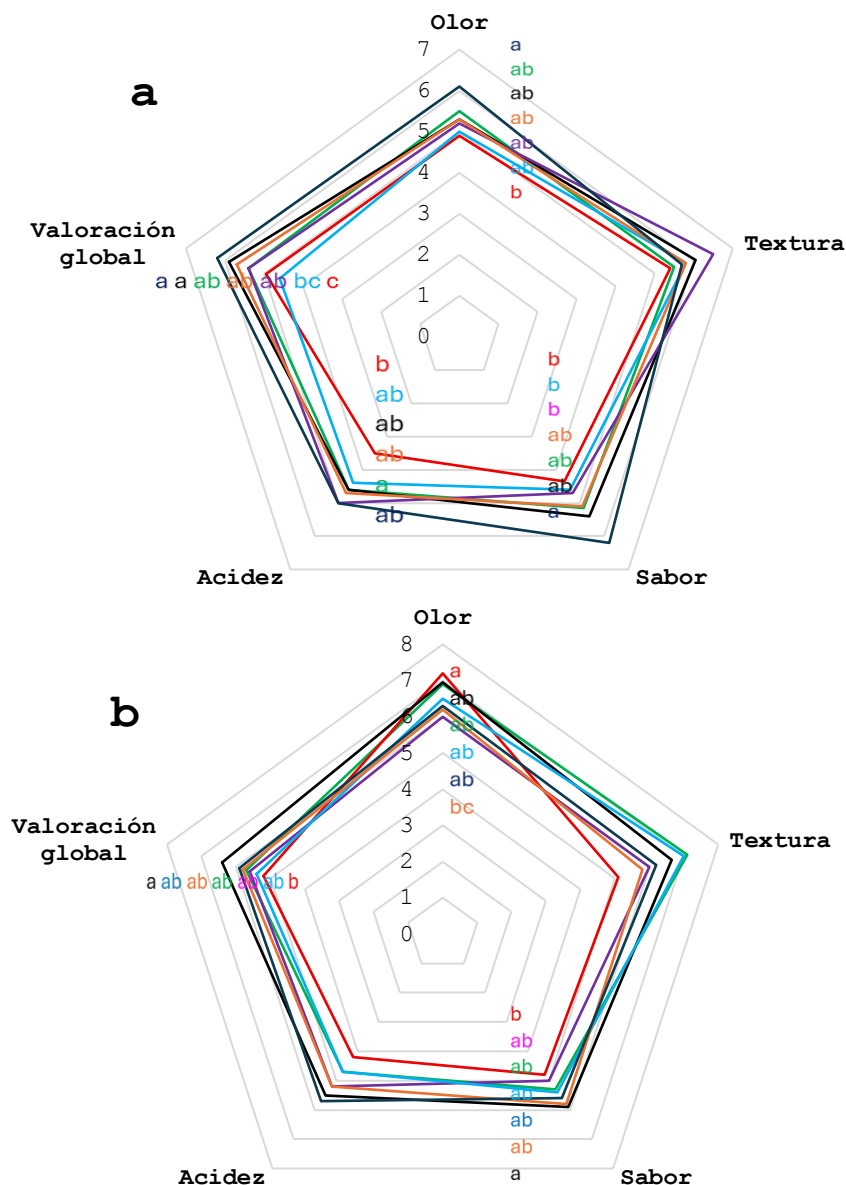


Figura 7: Perfil sensorial de bebidas fermentadas elaboradas con diversos microorganismos probióticos a base de una matriz de pan de desecho y agua. **a)** sabor natural; **b)** sabor a café; (■) *L. plantarum*, (■) *L. rhamnosus*, (■) *L. reuteri*, (■) *L. casei*, (■) *L. plantarum* (harvest), (■) *S. thermophilus*+*L. delbrueckii* (YoFlex) y (■) *S. thermophilus* (Vega-Mild). Se presentan la media de los resultados (n=15). Valores con letras distintas en un mismo parámetro muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Color de letra y orden según posición en figura. Si no presencia de letras, no diferencias significativas para ese parámetro.

En la **Figura 7b** se observaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, fueron menos marcadas que en la **Figura 7a**, posiblemente debido a que el sabor amargo del café enmascara las diferencias sensoriales entre las distintas bacterias. A pesar de que

el café es un sabor apreciado por muchos consumidores, ninguna de las muestras superó los 6 puntos sobre 9 en la escala hedónica. Esto podría indicar que la concentración de café utilizada fue excesiva o que las combinaciones de sabores en otras muestras resultaron sensorialmente más atractivas, relegando al café a una posición menos favorable.

La adición de ingredientes alimentarios permitió mejorar el sabor de la bebida fermentada y ampliar la gama de sabores disponibles. Los consumidores evaluaron durante varias semanas distintos sabores en los cultivos iniciadores que presentaron diferencias significativas en alguno de los atributos estudiados; YoFlex y Vega-Mild. Asimismo, debido que en los ensayos anteriores se observó que el pH podría influir en el sabor, se optó por usar los cultivos con menor capacidad acidificación. En el análisis sensorial final se utilizaron los sabores de chocolate, dátil y canela en ambas formulaciones. Además, con el fin de diversificar aún más la oferta sensorial, se incorporó un cuarto sabor para cada cepa: vainilla para YoFlex y nuez para Vega-Mild. En la **Figura 8** se presentan también las valoraciones obtenidas por los consumidores respecto al sabor a café y natural, con el propósito de evaluar si los nuevos sabores generan un impacto positivo en la percepción sensorial de la bebida.

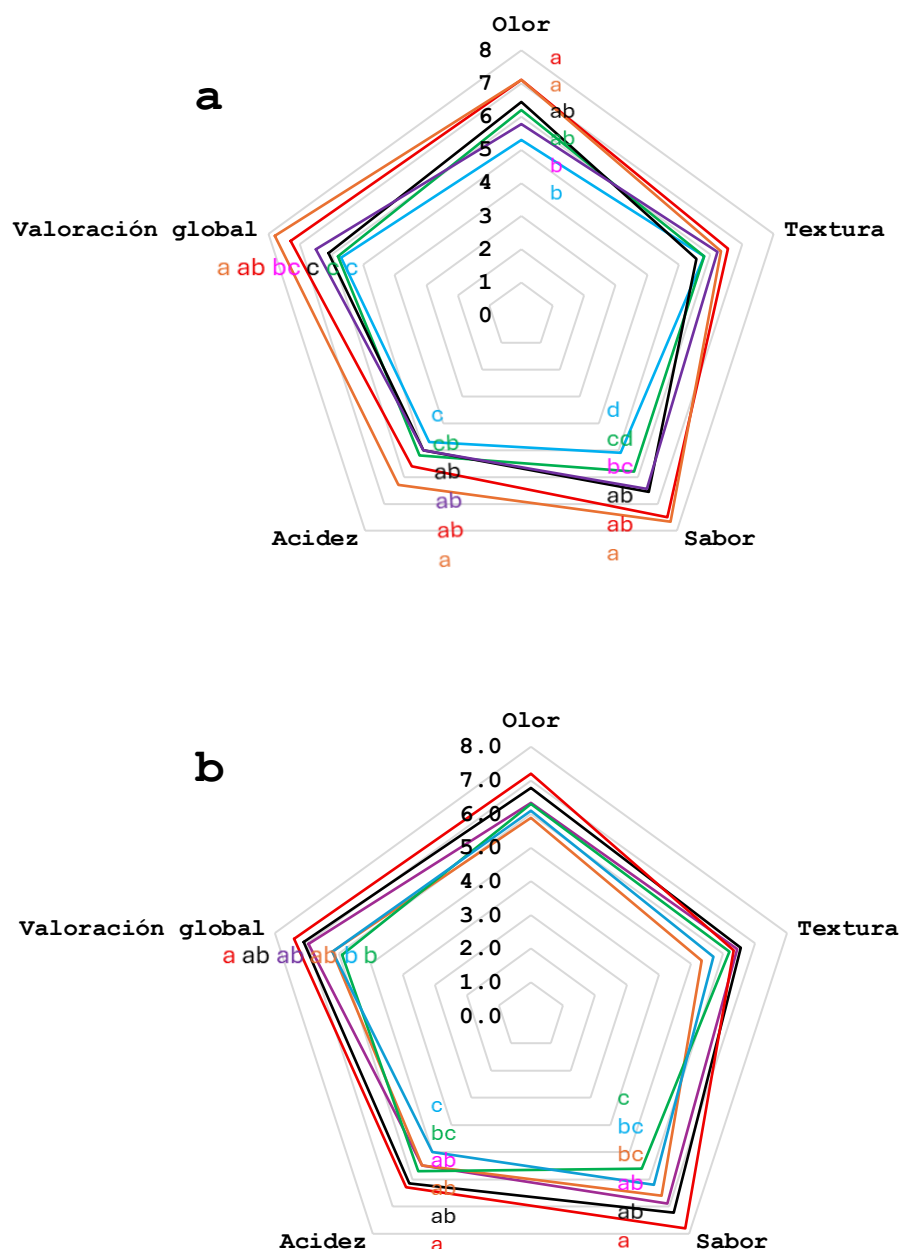
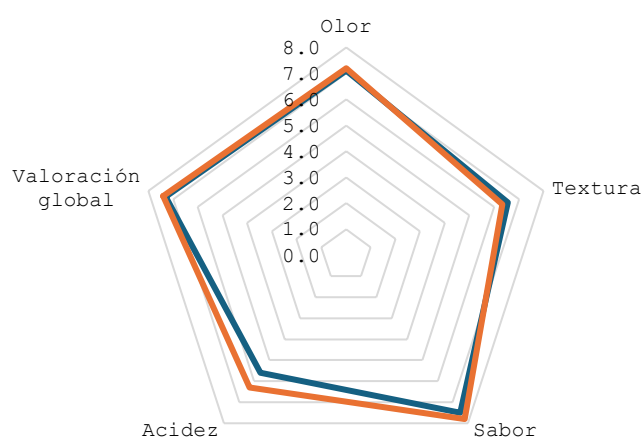


Figura 8: Perfil sensorial de bebidas fermentadas elaboradas con diversos microorganismos probióticos a base de una matriz de pan de desecho y agua. **a)** *S. thermophilus*+*L. delbrueckii* (YoFlex); **b)** *S. thermophilus* (Vega-Mild); (—) sabor natural, (—) sabor a a café,(—) sabor a chocolate,(—) sabor a dátil,(—)sabor a canela y (—) sabor a vainilla en **a)** o sabor a nuez en **b)**. Se presentan la media de los resultados (n=15). Valores con letras distintas en un mismo parámetro muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Color de letra y orden según posición en figura. Si no presencia de letras, no diferencias significativas para ese parámetro.En la **Figura 8a**, se muestra la comparación de sabores para YoFlex: Natural, café, chocolate, dátil, canela y vainilla. Los sabores natural y café obtuvieron puntuaciones significativamente más bajas mientras que se observaron valores significativamente más altos para los sabores de canela y

vainilla (**Figura 8 a y 8b**) tanto para Yo-Flex como para VegaMild, siendo los sabores mejor valorados por los consumidores la canela en ambas cepas y la vainilla en YoFlex. La predilección por estos sabores se puede deber a que su nivel de dulzor neutraliza la acidez de la matriz, siendo ésta la característica que genera más descontento en las bebidas fermentadas vegetales por BAL (75).

Investigaciones previas, indican que la adición de sabores cálidos y dulces puede contribuir a reducir la percepción de acidez (76). Esto explica el gusto por el sabor a canela y a vainilla.

En la **Figura 9** se recogen las puntuaciones de los consumidores de las bebidas fermentadas por ambos cultivos iniciadores y para el sabor canela. En el caso de YoFlex, el sabor vainilla fue el más aceptado por los catadores. Sin embargo, dado que este sabor no se utilizó en la formulación con Vega-Mild, y con el fin de evitar sesgos en la comparación, se seleccionó el sabor mejor valorado común de ambos cultivos. Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos cuando se agregó canela como ingrediente. No obstante, Vega-Mild fue ligeramente mejor valorado en cuanto a percepción de acidez. En el resto de los parámetros, las diferencias fueron mínimas, aunque Vega-Mild obtuvo puntuaciones superiores en todos ellos, excepto en textura.



base de una matriz de pan de desecho y agua. **I)** sabor canela; (—) *S. thermophilus*+*L. delbrueckii* (YoFlex), (—) *S. thermophilus* (Vega-Mild). Se presentan la media de los resultados (n=15).

5. CONCLUSIONES

Una vez completado el proceso experimental, es posible extraer conclusiones tanto desde el punto de vista microbiológico como sensorial, que respaldan el desarrollo de la bebida funcional elaborada.

A nivel microbiológico, todas las BAL mostraron un crecimiento adecuado para este tipo de fermentación. Esto se confirmó mediante el control del pH y los recuentos microbianos a lo largo del proceso.

Se observó un descenso del pH a valores inferiores a 4 a las 24 horas (T24), e incluso por debajo de 3,5 en más de la mitad de los microorganismos utilizados, este hecho evidenció el uso de la glucosa para la formación de ácido láctico.

El nivel de crecimiento microbiano fue el esperado, alcanzándose niveles superiores a 10^7 UFC/mL en todas las cepas y en algunos casos, como *L. plantarum*, *L. rhamnosus* o *L. reuteri*, superando los 10^9 UFC/mL.

Estos resultados sugieren que tanto la preparación de la matriz como el proceso de fermentación fueron eficaces, permitiendo una correcta adaptación y actividad de las cepas y cultivos seleccionados, así como que el pan desechado, demostró ser un sustrato adecuado para las bacterias, favoreciendo su viabilidad y funcionalidad.

A nivel sensorial, el cultivo comercial Vega-Mild fue el mejor valorado por los catadores, destacando la bebida con sabor a canela al 10% (v/v). No obstante, no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con la bebida sabor canela inoculada con el cultivo YoFlex.

Por tanto, YoFlex también representa una opción viable para futuros desarrollos de la bebida. Además del sabor canela, también sería interesante incluir el sabor vainilla, ya que fue el que obtuvo las mejores valoraciones dentro de las formulaciones con YoFlex.

Dado que las bebidas vegetales fermentadas están en auge, resulta especialmente relevante continuar investigando en esta línea. Además, esta bebida, aparte de ser una alternativa saludable a los productos lácteos, es sostenible y no requiere del uso de aditivos, como edulcorantes. En este contexto, la escalabilidad del proyecto adquiere un interés particular, abriendo la posibilidad de su aplicación a nivel comercial en el medio-largo plazo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ResearchGate [Internet]. [citado 9 de junio de 2025]. (PDF) Global Food Losses and Food Waste- Extent, Causes and Prevention. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/285683189_Global_Food_Losses_and_Food_Waste-_Extent_Causes_and_Prevention
2. Kc KB, Haque I, Legwegoh AF, Fraser EDG. Strategies to Reduce Food Loss in the Global South. Sustainability. julio de 2016;8(7):595.
3. Tamasiga P, Miri T, Onyeaka H, Hart A. Food Waste and Circular Economy: Challenges and Opportunities. Sustainability. enero de 2022;14(16):9896.
4. Eliopoulos C, Markou G, Langousi I, Arapoglou D. Reintegration of Food Industry By-Products: Potential Applications. Foods. 21 de noviembre de 2022;11(22):3743.
5. [informedeldesperdicioalimentarioenespana2023mapa_tcm30-691059.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/informedeldesperdicioalimentarioenespana2023mapa_tcm30-691059.pdf). [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/informedeldesperdicioalimentarioenespana2023mapa_tcm30-691059.pdf
6. Aguilera E, Piñero P, Amate JI, de Molina MG, Lassaletta L, Cobeña AS. REAL ACADEMIA DE INGENIERÍA. 2020;
7. BOE-A-2025-6597 Ley 1/2025, de 1 de abril, de prevención de las pérdidas y el desperdicio alimentario. [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2025-6597>
8. [memoria_estrategia_mamd_2020_0_tcm30-627833.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/13memoria_estrategia_mamd_2020_0_tcm30-627833.pdf) [Internet]. [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/13memoria_estrategia_mamd_2020_0_tcm30-627833.pdf
9. [informe_desperdicio_alimentario_hogares_2020_tcm30-620745.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/15informe_desperdicio_alimentario_hogares_2020_tcm30-620745.pdf) [Internet]. [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/desperdicio/15informe_desperdicio_alimentario_hogares_2020_tcm30-620745.pdf
10. [Informe_desperdicio_alimentario_fuera_de_hogares_2020.pdf](https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/alimentacion/temas/estrategia-desperdicios/nueva-web-2022/3.-desperdicio-extradomestico/otros-documentos/6informe_desperdicio_alimentario_fuera_de_hogares_2020.pdf) [Internet]. [citado 19 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/alimentacion/temas/estrategia-desperdicios/nueva-web-2022/3.-desperdicio-extradomestico/otros-documentos/6informe_desperdicio_alimentario_fuera_de_hogares_2020.pdf
11. [informesobreeldesperdicioalimentarioenloshogares2023_tcm37-693307.pdf](https://www.mapa.gob.es/gl/alimentacion/temas/desperdicio/informesobreeldesperdicioalimentarioenloshogares2023_tcm37-693307.pdf). [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/gl/alimentacion/temas/desperdicio/informesobreeldesperdicioalimentarioenloshogares2023_tcm37-693307.pdf

12. informesobreeldesperdicioalimentariofuera deloshogares2023.pdf [Internet]. [citado 19 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/alimentacion/temas/estrategia-desperdicios/nueva-web-2022/3.-desperdicio-extradomestico/otros-documentos/informesobreeldesperdicioalimentariofuera deloshogares2023.pdf>
13. Ness DA. Technological efficiency limitations to climate mitigation: why sufficiency is necessary. *Buildings & Cities*. 3 de mayo de 2023 [citado 9 de junio de 2025];4(1). Disponible en: <https://journal-buildingscities.org/articles/10.5334/bc.297>
14. Políticas e iniciativas para el abordaje de las pérdidas y el desperdicio alimentario en España. Red sin desperdicio. En: ResearchGate [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/363187000_Políticas_e_iniciativas_para_el_abordaje_de_las_perdidas_y_el_desperdicio_alimentario_en_España_Red_sin_desperdicio
15. spa204164.pdf. [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: <https://faolex.fao.org/docs/pdf/spa204164.pdf>
16. Usmani Z, Sharma M, Awasthi AK, Sharma GD, Cysneiros D, Nayak SC, et al. Minimizing hazardous impact of food waste in a circular economy – Advances in resource recovery through green strategies. *Journal of Hazardous Materials*. agosto de 2021;416:126154.
17. Lainez M. La bioeconomía como herramienta para el crecimiento económico sostenible. *C3-BIOECONOMY: Circular and Sustainable Bioeconomy*. 2020;(1):31-67 (EN).
18. Gao A, Tian Z, Wang Z, Wennersten R, Sun Q. Comparison between the Technologies for Food Waste Treatment. *Energy Procedia*. 1 de mayo de 2017;105:3915-21.
19. Cost-Benefit Analysis of Enzymatic Hydrolysis Alternatives for Food Waste Management. [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mdpi.com/2304-8158/14/3/488?utm_source
20. Pham TPT, Kaushik R, Parshetti GK, Mahmood R, Balasubramanian R. Food waste-to-energy conversion technologies: Current status and future directions. *Waste Management*. abril de 2015;38:399-408.
21. Muñoz-López C, Urrea-García GR, Jiménez-Fernández M, Rodríguez-Jiménez G del C, Luna-Solano G, Muñoz-López C, et al. Efecto de las condiciones de liofilización en propiedades fisicoquímicas, contenido de pectina y capacidad de rehidratación de rodajas de ciruela (*Spondias purpurea* L.). *Agrociencia*. febrero de 2018;52(1):1-13.
22. Caplice E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 15 de septiembre de 1999;50(1-2):131-49.

23. Aleixandre A, Miguel M, Muguerza B. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria*. agosto de 2008;23(4):313-8.
24. Praveen M, Brogi S. Microbial Fermentation in Food and Beverage Industries: Innovations, Challenges, and Opportunities. *Foods*. 3 de enero de 2025;14(1):114.
25. Cai X, Wijesekara T, Xu B. New insights into recent development, health benefits, emerging technologies, and future trends of cereal-based fermented products. *Process Biochemistry*. 1 de diciembre de 2024;147:433-9.
26. Fermentation - an overview | ScienceDirect Topics [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/fermentation>
27. Fermentation - an overview | ScienceDirect Topics [citado 10 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/fermentation>
28. Coldea T, Mudura E. Fermentative Bioprocesses. En: *Biotechnological Progress and Beverage Consumption* [Internet]. Elsevier; 2020 [citado 19 de junio de 2025]. p. 377-406. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128166789000126>
29. John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 de marzo de 2007;74(3):524-34.
30. Monica S, Bancalari E, Siroli L, Tekiner IH, Tainsa M, Ennahli S, et al. Lactic acid fermentation of non-conventional plant-based protein extract. *Food Research International*. 1 de mayo de 2025;208:116174.
31. Freire TT, Silva ALT e, Ferreira BKO, Santos TM dos. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. *Research, Society and Development*. 7 de septiembre de 2021;10(11):e513101119964-e513101119964.
32. Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol*. 12 de mayo de 2021;9:612285.
33. Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol*. 12 de mayo de 2021;9:612285.
34. Taxonomy and Physiology of Lactic Acid bacteria, Effects and Function on Nutrition [Internet]. [citado 10 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/268364087_Taxonomy_and_Physiology_of_Lactic_Acid_bacteria_Effects_and_Function_on_Nutrition

35. Oberg TS, McMahon DJ, Culumber MD, McAuliffe O, Oberg CJ. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. *Journal of Dairy Science*. 1 de abril de 2022;105(4):2750-70.
36. Zheng J, Ruan L, Sun M, Gänzle M. A Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. *Appl Environ Microbiol*. octubre de 2015;81(20):7233-43.
37. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*. abril de 2020;70(4):2782-858.
38. Stefanovic E, Thierry A, Maillard MB, Bertuzzi A, Rea MC, Fitzgerald G, et al. Strains of the *Lactobacillus casei* group show diverse abilities for the production of flavor compounds in 2 model systems. *Journal of Dairy Science*. 1 de septiembre de 2017;100(9):6918-29.
39. Salvetti E, Torriani S, Felis GE. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics & Antimicro Prot*. 1 de diciembre de 2012;4(4):217-26.
40. Slover CM, Danziger L. *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*. 15 de febrero de 2008;30(4):23-7.
41. TFG-M-N2582.pdf [citado 10 de junio de 2025]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/54678/TFG-M-N2582.pdf;jsessionid=6FDA70B4BE447D95E4465D48308B54C8?sequence=1>
42. Estreptococo: características, clasificación e importancia clínica - Científico de laboratorio médico MLS [Internet]. 2025 [citado 11 de junio de 2025]. Disponible en: <https://medicallabscientist.org/streptococcus/>
43. Streptococcus: una visión general | Temas de ScienceDirect [citado 11 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/streptococcus?utm_source=chatgpt.com
44. Laabei M, Ermert D. Catch Me if You Can: *Streptococcus pyogenes* Complement Evasion Strategies. *Journal of Innate Immunity*. 28 de septiembre de 2018;11(1):3-12.
45. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. agosto de 2014;11(8):506-14.
46. ar.pdf [citado 9 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ar/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsit>

47. Khalid K. An overview of lactic acid bacteria.
48. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol.* 1999;473:11-30.
49. Ayed L, M'hir S, Nuzzolese D, Di Cagno R, Filannino P. Harnessing the Health and Techno-Functional Potential of Lactic Acid Bacteria: A Comprehensive Review. *Foods.* enero de 2024;13(10):1538.
50. Pal S, Woodford K, Kukuljan S, Ho S. Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Nutrients.* septiembre de 2015;7(9):7285-97.
51. Hidalgo-Fuentes B, de Jesús-José E, Cabrera-Hidalgo A de J, Sandoval-Castilla O, Espinosa-Solares T, González-Reza RM, et al. Plant-Based Fermented Beverages: Nutritional Composition, Sensory Properties, and Health Benefits. *Foods.* enero de 2024;13(6):844.
52. Ignat MV, Salanță LC, Pop OL, Pop CR, Tofană M, Mudura E, et al. Current Functionality and Potential Improvements of Non-Alcoholic Fermented Cereal Beverages. *Foods.* 1 de agosto de 2020;9(8):1031.
53. Ashaolu TJ, Reale A. A Holistic Review on Euro-Asian Lactic Acid Bacteria Fermented Cereals and Vegetables. *Microorganisms.* agosto de 2020;8(8):1176.
54. ICSP - Subcommittee on taxonomy of Bifidobacterium, Lactobacillus and related organisms [citado 11 de junio de 2025]. Disponible en: <https://site.unibo.it/subcommittee-lactobacillus-bifidobacterium/en>
55. Sigüenza-Andrés T, Pando V, Gómez M, Rodríguez-Nogales JM. Optimization of a Simultaneous Enzymatic Hydrolysis to Obtain a High-Glucose Slurry from Bread Waste. *Foods.* enero de 2022;11(12):1793.
56. Characterization of a Fermented Beverage from Discarded Bread Flour Using Two Commercial Probiotics Starters [Internet]. [citado 19 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/6/951>
57. Monteagudo-Mera A, Caro I, Rodríguez-Aparicio LB, Rúa J, Ferrero MA, García-Armesto MR. Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products. *Journal of Food Protection.* 2011;74(8):1379-86.
58. Oyeniran A, Ibrahim SA, Gyawali R, Tahergorabi R, Zimmerman T, Krastanov A. A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in a mixed culture. *Journal of Dairy Science.* 1 de junio de 2020;103(6):5030-42.

59. Horáčková Š, Vrchotová B, Koval D, Omarova A, Sluková M, Štětina J. Use of *Lactiplantibacillus plantarum* for dairy and non-dairy fermented products. Czech J Food Sci. 27 de octubre de 2022;40(5):392-9.
60. Wu S, Chen Y, Wei F, Chen Z, Fan J, Luo Y, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* ZJ316 alivia el estrés oxidativo y la apoptosis celular mediante la modulación de la vía de señalización Nrf2/HO-1. Journal of Functional Foods. 1 de octubre de 2024;121:106409.
61. Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. J Bacteriol. mayo de 2010;192(9):2445-58.
62. Yang Z, Zhu X, Wen A, Qin L. Development of probiotics beverage using cereal enzymatic hydrolysate fermented with *Limosilactobacillus reuteri*. Food Science & Nutrition. 2022;10(9):3143-53.
63. Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Appl Environ Microbiol. junio de 2005;71(6):3060-7.
64. Rodríguez-Serrano GM, García-Garibay M, Cruz-Guerrero AE, Gómez-Ruiz L, Ayala-Niño A, Castañeda-Ovando A, et al. Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. J Microbiol Biotechnol. 28 de octubre de 2018;28(10):1581-8.
65. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. ResearchGate 7 de febrero de 2025 [citado 17 de junio de 2025]; Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/5288279_Unraveling_Microbial_Interactions_in_Food_Fermentations_from_Classical_to_Genomics_Approaches
66. Filannino P, Di Cagno R, Gobbetti M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. Current Opinion in Biotechnology. 1 de febrero de 2018;49:64-72.
67. Siezen RJ, van Hylckama Vlieg JET. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. Microb Cell Fact. 30 de agosto de 2011;10 Suppl 1(Suppl 1):S3.
68. Key Stress Response Mechanisms of Probiotics During Their Journey Through the Digestive System: A Review | Probiotics and Antimicrobial Proteins [citado 18 de junio de 2025]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-022-09981-x>
69. Nguyen Thi L, Champagne CP, Lee BH, Goulet J. Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey. International Journal of Food Microbiology. 15 de diciembre de 2003;89(1):67-75.

70. *Limosilactobacillus reuteri* Regulating Intestinal Function: A Review [citado 18 de junio de 2025]. Disponible en: https://www.mdpi.com/2311-5637/9/1/19?utm_source=chatgpt.com
71. Zourari A, Accolas JP, Desmazeaud MJ. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait*. 1992;72(1):1-34.
72. Salmerón I, Thomas K, Pandiella SS. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*. 1 de mayo de 2015;15:106-15.
73. Gómez-Torres N, Ávila M, Delgado D, Garde S. Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2 de septiembre de 2016;232:103-10.
74. Oyeniran A, Ibrahim SA, Gyawali R, Tahergorabi R, Zimmerman T, Krastanov A. Un medio clostridial reforzado modificado para el aislamiento y enumeración de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* en un cultivo mixto. *Journal of Dairy Science*. 1 de junio de 2020;103(6):5030-42.
75. Plant-Based Fermented Beverages: Nutritional Composition, Sensory Properties, and Health Benefits. [citado 20 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/6/844>
76. Filannino P, Di Cagno R, Gobbetti M. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*. 1 de febrero de 2018;49:64-72.

ANEXOS

FICHA DE CATA

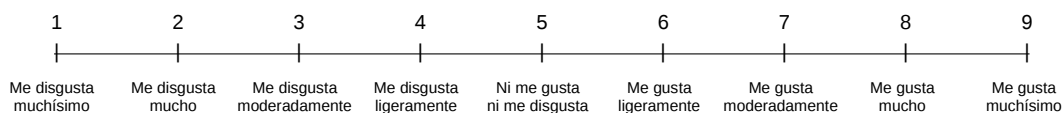
Estamos realizando un estudio de consumidores sobre la mejora de la una bebida fermentada a base de pan, y para ello necesitamos tu colaboración. Por favor contesta a las siguientes preguntas, marcando con una cruz la opción elegida.

Sexo: ☐ Hombre ☐ Mujer

Edad: ☐ De 16 a 24 años ☐ De 25 a 34 años ☐ De 35 a 44 años
☐ De 45 a 54 años ☐ De 55 a 64 años ☐ Más de 65 años

A continuación, te presentamos diferentes muestras para que las evalúes de una en una en orden aleatorio.

Puntúa cada uno de los parámetros solicitados del 1 al 9 en función de la siguiente escala:



	8749	4321	9451
Aspecto visual			
Olor			
Textura			
Sabor			
Acidez			
Valoración Global			

Por favor, comenta en observaciones las características de cada una de las que más te hayan llamado la atención. ¿Notas diferencia en el grado de acidez o intensidad aromática entre las muestras?

Observaciones:

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Anexo 1: Ficha de cata para el análisis sensorial