



INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUIMICA

Presenta:

Ivan Hernández López

**“EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE LACTOBACILLUS
PLANTARUM EN PAN VEGANO ADICONADO CON MORINGA
OLEIFERA”**

ASESORA:

M.C LUCIA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

ENERO-JUNIO 2017

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides, de los extractos de harina de moringa (*moringa oleífera*) de manera libre y adicionado en panes empleando técnicas espectrofotométricas, así como también se realizaron análisis proximales de los panes adicionado con diferentes porcentajes de harina de chaya, los cuales fueron 0%, 3% y 5%. La harina utilizada se obtuvo a partir de hojas frescas de *moringa oleífera*. Se realizaron curvas de calibración para cada determinación, utilizando estándares de ácido gálico, quercetina y ácido ascórbico para fenoles, flavonoides y actividad antioxidante respectivamente, siendo la concentración madre de 1 mg/ml para todos los estándares. Los panes fueron adicionados con la BAL KY131967, esperando obtener un producto con propiedades probióticas, pero después del proceso de horneado no se obtuvo ninguna sobrevivencia de la bacteria en ninguno de los panes. Las técnicas usadas para los análisis fitoquímicos demostraron que el contenido de fenoles y flavonoides, estandentro de los valores reportados, para el contenido encontrado en los panes fue para el caso de fenoles el 5% el cual presentó un contenido mayor con respecto a los otros dos tratamientos, con respecto al contenido de flavonoides se encuentra una diferencia estadística significativa entre los porcentajes 0%, 3% y 5% siendo el 5% con mayor contenido de flavonoides. En los análisis proximales, para el caso de humedad los datos obtenidos demuestran que no hay diferencia para ninguno de los porcentajes, el mismo caso es para el contenido de cenizas, en el análisis del contenido de proteína se encontró que no hay diferencia significativa entre los tratamientos de 0%, 3% y 5%.

INDICE

INDICE	3
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	6
5. INTRODUCCIÓN	7
6. DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA.....	8
7. PROBLEMAS A RESOLVER	9
8. OBJETIVOS	10
9. JUSTIFICACIÓN.	11
10.- MARCO TEÓRICO:	12
10.1. Alimento	12
10.1.1 Alimento funcional.....	13
10.1.2 Alimento vegano	14
10.2 Pan.....	14
10.2.1 Pan funcional	16
10.2.2 Pan vegano.....	16
10.3 Probioticos	16
10.3.1 Probioticos en alimentos.....	17
10.3.2. Probióticos microencapsulados	17
10.3.2.1.- Lactobacillus plantarum	18
10.3.2.1.- Lactobacillus plantarum <i>KY131967</i>	19
10.4 <i>Moringa oleífera</i>	19
10.5 Metabolitos secundarios de plantas	21
10.5.1 Terpenos o terpenoides:	23
10.5.2 Alcaloides	24
10.5.3 Compuestos fenólicos.....	24
10.5.3.1 Flavonoides.....	25
10.5.3.2 Actividad antioxidante	27
10.6 Análisis proximal	29
10.6.1.- Humedad	29
10.6.1.1.- Métodos de secado.	30
10.6.1.1.1.- Método por secado en estufa de vacío.	30
10.6.1.1.2.- Método de secado en termo balanza.....	30

10.6.2.- Cenizas.....	31
10.6.2.1.- Método de cenizas totales	31
10.6.3.- Lípidos.	31
10.6.3.1.- Métodos de extracción y cuantificación.	32
10.6.3.1.1.- Método de Soxhlet.....	32
10.6.4.- Método de Kjeldahl.	33
11 METODOLOGÍA.....	35
11.1 Obtención de la harina de moringa	35
11.2.- Cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967 (Gutiérrez-Sarmiento, 2016).....	35
11.2.1.- Cultivo en matraz.....	35
11.2.2.- Cultivo en Biorreactor.	35
11.2.3.- Cosecha de la biomasa.	35
11.3.- Preparación de los agentes encapsulantes (Robles-Flores, 2015).....	36
11.3.1.- Leche de soya.	36
11.3.2.- Maltodextrina al 35%.	36
11.3.3.- Goma arábiga al 7.5%.	36
11.4.- Preparación de la emulsión.....	36
11.4.1.- Secado por aspersion.....	37
11.4.2.- Viabilidad del <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967.	37
11.5.- Productos de panificación.....	38
11.5.1.- Diseño experimental.	38
11.6.- Análisis proximal de los productos de panificación.	38
11.6.1.- Cenizas.....	38
11.6.2.- Nitrógeno total	39
11.7.- Preparación de los extractos vegetales.	39
11.8.- Obtención del extracto de pan (Chlopicka & et.al, 2012).	40
11.9 Análisis cuantitativo de metabolitos secundarios por método espectrofotométrico.....	40
11.9.1 Cuantificación de fenoles totales	40
11.9.2 Cuantificación de flavonas y flavonoles	41
11.9.3 Barrido espectral de DPPH.....	41
11.9.4 Evaluación de actividad antioxidante	41

11.10.- Sobrevivencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> KY131967 en los productos de panificación.	42
12.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
12.1.- Rendimiento de la harina de <i>moringa</i>	43
12.2.- Rendimiento <i>L. Plantarum</i> KY131967 en fermentador.....	43
12.3.- Porcentaje de viabilidad en el encapsulado.....	43
12.4.- Productos de panificación.....	44
12.5.- Análisis proximal.	44
12.6.- Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante.....	46
12.6.1 Barrido espectral DPPH.....	46
12.6.2 Curvas de calibración	46
12.7.- Sobrevivencia.	51
13.- CONCLUSIONES	52
14.- COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS.....	53
ANEXOS.	54
BIBLIOGRAFIA	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Hojas de moringa Oleífera.....	21
FIGURA 2 Esquema de la principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2006).....	23
FIGURA 3. Estructura de un fenol.....	24
FIGURA 4. Fenoles simples.....	25
FIGURA 5. Estructura base de un Flavonoide.....	26
FIGURA 6. Clasificación de Flavonoides.....	26
FIGURA 7. Esquema de extracción soxhlet.....	32
FIGURA 8. Barrido espectral dpph.....	46
FIGURA 9 Curva estándar de Ácido Gálico.....	46
FIGURA 10. Curva estándar de Quercetina.....	47
FIGURA 11. Curva estándar de Ácido Ascórbico.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> después de la encapsulación.....	43
Tabla 2. Formulación de los panes.....	44
Tabla 3. Resultados de Análisis proximales.....	44
Tabla 4. Fenoles y Flavonoides en la Harina de Moringa.....	48
Tabla 5. Fenoles y Flavonoides en Productos de panificación.....	48
Tabla 6 Actividad antioxidante para los panes 0%, 3%, y 5% en el tiempo 0,5 y 10 (días).....	50
Tabla 7. Actividad antioxidante en harina de <i>moringa oleifera</i>	50

5. INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años el paradigma de la nutrición ha ido cambiando. En los años 50 el énfasis estuvo puesto en las proteínas, y lo más importante en un alimento era su calidad proteínica. En los 70, se le dio mayor importancia al total de energía aportada por la alimentación, priorizando la cantidad y no la calidad. En los años 80 comienzan a valorizarse los micronutrientes, y en los 90 aparece el concepto de calidad nutricional, para que, a comienzos del nuevo siglo surja la relación alimentación y estilo de vida.

Actualmente, la tendencia en nutrición, es la importancia de generar en las personas hábitos de vida saludables, basándose, no solo en la composición nutricional de los alimentos, sino también en sus propiedades. Así nace la definición de nutrición óptima, definida como aquella que tiene la finalidad de optimizar las funciones fisiológicas de cada persona para asegurar el máximo de bienestar, salud y calidad de vida. De aquí surge el concepto de alimento funcional, que son aquellos que actúan beneficiosamente sobre una o más funciones del organismo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar, y/o reduciendo el riesgo de enfermedad.

Al presente, diversas investigaciones han estudiado los microorganismos utilizados en la producción de leche fermentada y productos afines y sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo humano y animal. Estos microorganismos vivos, conocidos como probióticos, son considerados como suplementos alimenticios que afectan benéficamente la fisiología del huésped, mediante la modulación intestinal y del sistema inmunológico y que mejoran el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal.

Aunado a esto las personas veganas han ido en aumento ya que se ha comprobado que una dieta vegana en la cual queda estrictamente prohibido el consumo de alimentos de origen animal, mejora la calidad de vida de muchas personas. Por ejemplo, los índices de obesidad y problemas cardíacos en la población vegana son significativamente menores a los demás. Por supuesto, siguiendo un régimen de alimentación balanceado. Ya que si bien no se están consumiendo grasas animales, sin duda se compromete la salud. Por lo que los beneficios quedarían muy limitados. Es importante que se consuman porciones que garanticen vitaminas, minerales, fibras, proteínas y lípidos en cada comida.

Por lo tanto se propone evaluar un producto panificación vegano adicionado con *L. plantarum* libre y microencapsulado y siguiendo el régimen vegano también se le adiciona harina de Moringa oleífera para que se dé un aumento en las propiedades nutricionales y así poder ser considerado un alimento funcional.

6. DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA

El proyecto se desarrollará en el laboratorio de Investigación ubicado en el edificio D, en el laboratorio de Microbiología ubicado en el Polo Tecnológico, en el laboratorio de Analítica ubicado en el edificio Z, todos ellos dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en carretera panamericana kilómetro 1080, Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Misión

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

Visión

Ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

7. PROBLEMAS A RESOLVER

-Las técnicas utilizadas para las determinaciones están en función de factores como la temperatura, pH, la luz, tiempos de extracción por la cual para un rendimiento óptimo y datos confiables sobre las determinaciones se tratara de minimizar estos factores.

8. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* libre y microencapsulado en pan vegano adicionado con harina de *Moringa oleífera*.

Objetivos Específicos

Determinar la sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* en los productos de panificación.

Caracterizar fitoquímicamente harina de *Moringa oleífera* en términos de quercetina, y fenoles totales.

Evaluar la actividad antioxidante en harina de *Moringa oleífera* y en productos de Panificación

Evaluar las características proximales de los productos de panificación

Cuantificar fitoquímicamente los productos de panificación durante el almacenamiento.

Realizar Análisis microbiológico a los productos de panificación

9. JUSTIFICACIÓN.

Una buena alimentación debe considerar la ingestión de alimentos conocido como funcionales, que además de nutrir, tienen componentes que producen un impacto positivo en la salud como los probióticos.

En las últimas décadas los hábitos alimentarios han variado. Los nuevos estilos de vida han provocado el abandono de ciertos hábitos alimentarios saludables que formaron parte durante años de la historia y la tradición. Esto lleva, a que, en nuestra sociedad, los desequilibrios y desajustes alimentarios provocados por la falta de tiempo para cocinar, el ritmo de vida actual, y la enorme oferta de alimentos que dificulta la toma de decisiones adecuadas, se relacionen con la aparición de un gran número de enfermedades, debido en gran parte, a la alteración de la flora intestinal provocada por la ingesta inadecuada. Y, es por eso, que ya no se trata solo de que se reduzcan los alimentos cuyo exceso puede ser perjudicial para nuestra salud, sino de buscar también, aquellos que tengan beneficios saludables, ayudando a compensar estos desequilibrios y garantizando las ingestas adecuadas de nutrientes recomendadas, y nos ayuden a retrasar la aparición de algunas enfermedades. No sólo es importante la calidad de los nutrientes que ingerimos, sino también, y sobre todo, la capacidad que tenga nuestro organismo de incorporarlos o asimilarlos, lo que dependerá muy directamente, en primer término, de la idoneidad de nuestra microbiota intestinal, de cuya importancia solo estamos empezando a darnos cuenta.

10.- MARCO TEÓRICO:

10.1. Alimento

Un alimento es todo producto que, por sus componentes químicos y por sus características organolépticas, puede formar parte de una dieta con el objeto de calmar el hambre, satisfacer el apetito y aportar los nutrientes que resultan necesarios para mantener al organismo en un estado de salud, Es decir, un alimento es un producto, natural o transformado, capaz de suministrar al organismo que lo ingiere la energía y las estructuras químicas necesarias para que pueda desarrollar sin problemas sus procesos biológicos.

Todo alimento puede ser considerado como un Sistema Alimentario, es decir, un sistema, complejo de naturaleza fisicoquímica, integrado por sustancias químicas que van a desempeñar funciones concretas y específicas, mediante las cuales contribuyen a las propiedades de ese alimento.

No obstante, solamente cuatro especies químicas van a ser mayoritarias desde el punto de vista de su presencia y concentración en el alimento: agua, proteínas, carbohidratos y lípidos.

Agua: El agua es el único componente químico de los alimentos que se puede considerar presente en todos ellos. Su ubicuidad en los productos alimenticios es una consecuencia de su carácter indispensable para la vida de los organismos vivos, de los cuales proceden los alimentos: suministra el medio físico ambiental para que se puedan desarrollar las reacciones bioquímicas más esenciales; sirve como medio de transporte para los nutrientes celulares y sus metabolitos de desecho; facilita el transporte de los gases implicados en la respiración celular (CO_2 y O_2).

Proteínas: Las proteínas forman parte de la composición química de casi todos los alimentos, aunque en la mayoría de ellos se encuentren en proporciones reducidas.

Las tres funciones esenciales de la materia viva (nutrición, crecimiento y reproducción) están vinculadas a las moléculas proteicas y a las estructuras que las integran: péptidos y aminoácidos. Su carácter de componente indispensable para la materia viviente, convierte en fundamental su presencia en la dieta del ser humano porque, al igual que los animales superiores, necesita de unas fuentes de aminoácidos con las que elaborar sus propias proteínas y esas fuentes han de proceder de las proteínas suministradas por la dieta.

Carbohidratos: Son compuestos orgánicos que en sus estructuras químicas sólo contienen C, H y O, estos últimos en una proporción semejante a la del agua; responden a la siguiente fórmula básica: $\text{C}_x(\text{H}_2\text{O})_y$. Después del agua, los carbohidratos son los componentes más abundantes de los alimentos y los más ampliamente distribuidos. Desempeñan un papel relevante en los sistemas biológicos y tienen una gran importancia en la alimentación humana por su carácter de nutriente energético.

Además, suelen ser valiosos favorecedores de las propiedades sensoriales de los alimentos, con efectos de interés sobre la consistencia, textura y palatabilidad de los mismos, que derivan de su capacidad para modificar, o incluso mejorar, la viscosidad, las propiedades coligativas y la estabilidad de las dispersiones alimenticias.

Lípidos:

Los lípidos son destacados componentes estructurales y funcionales de los alimentos. Su presencia incide de modo bastante significativo sobre la calidad de los mismos, incluso cuando se hallan en proporciones reducidas. Los más abundantes se encuentran bajo la forma de triacilgliceroles, a los que se les suele aplicar las denominaciones de grasas y aceites, según sean sólidos o líquidos a la temperatura ordinaria. No sólo contribuyen a las propiedades sensoriales de sabor, olor y fiavor, sino que aportan suavidad a la textura, facilitan la masticabilidad y proporcionan una sensación de saciedad cuando son consumidos.

10.1.1 Alimento funcional

Los alimentos funcionales son aquellos que además de presentar propiedades nutricionales, que son las que se relacionan con la capacidad que tenga el alimento de contribuir a la dieta alimenticia con las estructuras químicas o nutrientes, necesarias para que el organismo desempeñe las funciones fisiológicas y bioquímicas propias de sus procesos vitales; también presentan propiedades Funcionales.

Se considera como propiedades funcionales aquellas que, al margen del valor nutritivo, presentan los ingredientes o las especies químicas y determinan el comportamiento del sistema alimentario. La mayoría de las estructuras químicas presentes en un alimento son capaces de desempeñar diversas funciones vinculadas a las propiedades de los alimentos, distintas a la función de nutriente.

De hecho, estas propiedades funcionales pueden abarcar tres ámbitos importantes, en relación con el uso y consumo de los alimentos:

- Propiedades organolépticas o sensoriales. Son las que hacen referencia a la capacidad de hacer apetecible o atractivo un alimento, en virtud de las cualidades que son percibidas por los órganos de los sentidos: color, sabor, olor, flavor, textura, jugosidad, apariencia, etc.
- Propiedades tecnológicas. Son las que permiten contribuir, o al menos facilitar, los procesos vinculados a la tecnología de fabricación industrial, o a las operaciones culinarias, siempre orientados a proporcionar aquellas condiciones que resultan más aptas para su consumo.
- Propiedades saludables. Son las que contribuyen para que el consumo del alimento no resulte perjudicial desde un punto de vista higiénico-sanitario.

Todas ellas son propiedades que cada vez tienen mayor incidencia en la demanda de alimentos por parte del consumidor actual, como respuesta al hecho de que los conceptos entorno al uso del alimento han entrado en un ámbito de nuevos reconocimientos científicos. En consecuencia, se admite casi sin discusión que los alimentos han de ser productos que no sólo deben ser nutritivos, sino también apetecibles, además de proporcionar en la medida de lo posible sustancias que tengan capacidad para ofrecer al organismo humano algún efecto que le resulte beneficioso para mantener un estado de buena salud.

Esta preocupación de la sociedad actual por el binomio Alimentos - Salud ha conducido a la necesidad de establecer nuevos atributos con los que calificar los alimentos que hoy día se comercializan:

- Alimento sano. Cuando su composición carece de sustancias tóxicas, o de microorganismos patógenos, que puedan ocasionar alguna intoxicación o enfermedad en el que lo consume. Es un requisito que debe ser cumplido por todo alimento en uso, para que desde un punto de vista higiénico-sanitario pueda ser calificado como seguro.
- Alimento saludable. Cuando carece de sustancias, o al menos no las contiene en cantidades importantes, cuyo frecuente consumo pueda significar algún riesgo de padecer una enfermedad crónica.
- Alimento para la salud. Cuando en su composición participa algún tipo de estructura química, cuya ingestión tenga acreditada actividades preventivas frente a ciertas enfermedades de tipo crónico.

10.1.2 Alimento vegano

Al principio de la humanidad, la ingesta de alimentos que satisficieran las necesidades nutricionales del hombre se basaba en los vegetales, fuentes ricas y abundantes en el entorno en que se desarrollaba el ser humano. Hoy, aunque las sociedades desarrolladas no tienen su base dietética en este tipo de alimentos, se registra un incremento de la población que, por distintas causas, han optado por recurrir a dietas vegetarianas. Entre ellas se encuentran la dieta vegana o los alimentos veganos la cual se caracteriza por la exclusión estricta de los productos animales y se basan en alimentos como frutas, granos, leguminosas, nueces, semillas y vegetales así como sus derivados (Molina, 2008).

10.2 Pan

El pan es el producto perecedero resultante de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo, sal comestible y agua potable, fermentada por especies propias de la fermentación panaria, como *Saccharomyces cerevisiae*.

Las materias primas utilizadas en la elaboración del pan son:

Harina: La denominación harina, sin otro calificativo, designa exclusivamente el producto obtenido de la molienda del endospermo del grano de trigo limpio. Si se

trata de otros granos de cereales o de leguminosas hay que indicarlo, por ejemplo: harina de maíz, harina de cebada, etc. Si en la harina aparece no sólo el endospermo, sino todos los componentes del grano se llama harina integral.

La composición media de las harinas panificables oscila entre los siguientes valores:

Humedad: 13 - 15%.

Proteínas: 9 - 14% (85% gluten).

Almidón: 68 - 72%.

Cenizas: 0.5 - 0.65%.

Materias grasas: 1 - 2%.

Azúcares fermentables: 1 - 2%.

Materias celulósicas: 3%.

Enzimas hidrolíticos: amilasas, proteasas, etc.

Vitaminas: B, PP y E.

Agua: Es el segundo componente mayoritario de la masa y es el que hace posible el amasado de la harina. El agua hidrata la harina facilitando la formación del gluten, con ello y con el trabajo mecánico del amasado se le confieren a la masa sus características plásticas: la cohesión, la elasticidad, la plasticidad y la tenacidad o nervio (Calvel, 1983 citado en (Mesas & Alegre, 2002)). La presencia de agua en la masa también es necesaria para el desarrollo de las levaduras que han de llevar a cabo la fermentación del pan.

Sal: Su objetivo principal es dar sabor al pan. Además es importante porque hace la masa más tenaz, actúa como regulador de la fermentación, favorece la coloración de la corteza durante la cocción y aumenta la capacidad de retención de agua en el pan (Calvel, 1983 citado en (Mesas & Alegre, 2002))

Levadura: En panadería se llama levadura al componente microbiano aportado a la masa con el fin de hacerla fermentar de modo que se produzca etanol y CO₂. Este CO₂ queda atrapado en la masa la cual se esponja y aumenta de volumen. A este fenómeno se le denomina levantamiento de la masa.

Los microorganismos presentes en la levadura son principalmente levaduras que son las responsables de la fermentación alcohólica, pero también se pueden encontrar bacterias que actúan durante la fermentación dando productos secundarios que van a conferir al pan determinadas características organolépticas, en concreto una cierta acidez.

Otros componentes del pan: Pueden ser simples aditivos o coadyuvantes tecnológicos que se emplean en baja proporción y cuyo único objetivo es favorecer

el proceso tecnológico de elaboración del pan. En este caso se les denomina mejorantes y su empleo no significa que el pan elaborado sea un pan especial. Entre los más comunes: harina de habas, harina de malta, leche en polvo, ácido ascórbico, enzimas, etc.

10.2.1 Pan funcional

En los últimos años y en línea con el mercado emergente de los alimentos funcionales, el pan no se ha quedado atrás y se ha ido adaptando a este escenario, es decir, al de los alimentos que aportan un efecto beneficioso para la salud más allá de su valor nutricional clásico.

En ocasiones, el pan se reformula para mejorar su perfil nutricional disminuyendo el contenido en azúcares simples o grasas y así ofrecer productos ligeros o lights (más en el ámbito de los panes de molde y/o tostados) o reduciendo el contenido en sal para facilitar las dietas bajas en sodio.

Otra opción para optimizar el valor en salud del pan es su enriquecimiento en fibra para mejorar esta propiedad natural del pan. Así como la inclusión de compuestos antioxidantes. Los panes funcionales suelen contener salvado de trigo, que favorece al tránsito intestinal y la salud del colon, es rico en vitaminas y minerales como el potasio, hierro y magnesio.

10.2.2 Pan vegano

Los panes veganos surgen como una buena alternativa de alimentación cuya fabricación a base de cereales lo convierte aparentemente en un alimento apto para veganos con alto valor nutricional, se caracterizan por no contener ningún ingrediente de origen animal.

10.3 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos, principalmente bacterias, no patógenas, utilizados en forma de suplemento alimenticio, que tras ser ingeridos en cantidades suficientes, mejoran el equilibrio microbiano intestinal y provocan efectos benéficos sobre la salud de quienes los ingieren.

Los microorganismos probióticos son bacterias ácido lácticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y tradicionalmente se han clasificado con base en sus propiedades morfológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad fermentadora de glucosa y otros carbohidratos y la configuración del ácido láctico producido. Los *Lactobacillus* son bacilos gram positivos, no esporulados, aerotolerantes, acidotolerantes, catalasa negativa, carentes de citocromo; aunque se presentan excepciones cuando algunas especies cultivadas en medios ricos en hematina o compuestos relacionados pueden sintetizar catalasa; también son estrictamente fermentadores produciendo una gran diversidad de ácidos, siendo el principal el láctico. Las especies del género *Bifidobacterium* son cocobacilos gram positivos, no esporulados, generalmente anaerobios estrictos

pero pueden crecer bajo condiciones microaerófilas cuando están en presencia de CO₂.

10.3.1 Probióticos en alimentos

Una variedad amplia de cepas probióticas se añaden a una serie de alimentos. Los probióticos se encuentran a menudo en productos lácteos, pero cada vez más se están incorporando en otros alimentos, como jugos, barras de granola, chocolates, cereales, etc. La mayoría de microorganismos probióticos son bacterias productoras de ácido láctico, que usualmente son parte de una flora intestinal saludable. Las cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son adicionadas comúnmente a los alimentos y suplementos.

La viabilidad de probióticos en los alimentos depende de varias condiciones encontradas durante el procesamiento y almacenamiento. La pérdida de probióticos durante procesos térmicos depende de la habilidad de la cepa de resistir el calor.

La mayoría de bacterias probióticas son sensibles al calor, de manera que su supervivencia durante los procesos térmicos es un obstáculo mayor. El calor involucrado en el proceso de horneado puede generar pérdidas significativas en viabilidad durante el proceso productivo y el almacenamiento de pan.

La concentración de probióticos en alimentos se expresa en unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de porción, que es una indicación del número de microorganismos vivos presentes. Al día de hoy, no hay un nivel reconocido de unidades formadoras de colonias de bacterias probióticas en alimentos que garanticen actividad biológica (Ried, Anukam y Koyama, 2008....citado en (Villanueva, 2015)). Sin embargo, el nivel promedio comúnmente reportado requerido para lograr efectos beneficiosos en alimentos que contienen probióticos es > 100 millones (10⁸) de células viables/día (CFIA, 2009; Donnet-Hughes, Rochat, Serra, Aeschlimann y Schiffrin, 1999; Douglas y Sanders, 2008.....citado en (Villanueva, 2015)).

10.3.2. Probióticos microencapsulados

El problema que se presenta a la hora de incorporar probióticos a cualquier formulación, es la escasa resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, el oxígeno o la temperatura.

Por todo esto, es necesario que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, recurrimos a las técnicas de microencapsulación, que consisten en el recubrimiento de pequeñas cantidades de un determinado compuesto mediante un material protector que es generalmente de naturaleza polimérica.

La microencapsulación protege a los materiales encapsulados de factores como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad, también se ha utilizado para mejorar el sabor y la estabilidad de medicamentos y como barrera contra malos olores y sabores. Ayuda, además, a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaquetado mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia. Además la microencapsulación protege a los probióticos de los bacteriófagos y de los ambientes adversos, como la congelación y las soluciones gástricas, y facilita la manufacturación de productos fermentados, ya que, proporciona unas condiciones más constantes. La selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste (Martin, Morales, Gallardo, & Ruiz, 2009).

10.3.2.1.- *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus spp. Ha sido dividido en tres grupos funcionales, dependiendo de sus habilidades de fermentación (Kandler and Weiss, 1896):

- Grupo I, homo-fermentativas obligadas: este grupo convierte hexosas a ácido láctico por medio de la ruta de glucólisis.
- Grupo II, hetero-fermentativas facultativas: este grupo usualmente fermenta hexosas convirtiéndolos en ácido láctico, pero bajo algunas condiciones extrañas, las hexosas pueden ser transformadas en mezclas de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol. Las pentosas son fermentadas en ácido láctico y ácido acético por la ruta de fosfoetolasa.
- Grupo III, hetero-fermentativas obligadas: en este grupo *Lactobacillus* fermenta hexosas en mezclas de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol. Las pentosas son convertidas a ácido láctico y ácido acético.

L. plantarum difiere de las otras bacterias de *Lactobacillus* spp. En los siguientes puntos:

- *L. plantarum* tiene un genoma relativamente largo en comparación con las otras especies de *Lactobacillus* spp. Esto indica una habilidad para adaptarse a diferentes condiciones (Kleerebezem et al. 2003).
- *L. plantarum* puede fermentar diferentes carbohidratos.
- *L. plantarum* tiene un alto requerimiento de manganeso para su crecimiento y puede almacenar altos niveles de manganeso de manera intracelular (Archibald and Fridovich, 1981). El manganeso provee de defensa a *L. plantarum* contra el oxígeno tóxico, por reducción de radicales libres de oxígeno a peróxido de hidrógeno (Archibald and Fridovich, 1981). La producción de peróxido de hidrógeno puede ser convertido a oxígeno y agua por cofactores pseudocatalasas de manganeso (Kono and Fridovich 1893).

- *L. plantarum* tiene una alta tolerancia a pH bajos (deaschel and Nes, 1995). Puede sobrevivir al viaje en tracto digestivo del humanos bajo condiciones acidas (Johansson et al. 1993). También posee actividad de tanasa (Osawa et al, 2000) y también son capaces de metabolizar ácidos fenólicos (Barthelmebs et al, 2000)

10.3.2.1.- *Lactobacillus plantarum* KY131967

Se ha demostrado que *L. plantarum* KY131967 tiene propiedades probióticas, que la han destacado con un potencial biotecnológico muy importante y además cuenta con características que lo hace susceptible de poder ser estabilizado mediante secado por aspersion y tenerlo en forma de polvo con la finalidad de poder utilizarse como un ingrediente en la elaboración de alimentos.

10.4 *Moringa oleífera*

Moringa oleífera es la especie más conocida del género *Moringa*. Es un árbol originario del sur del Himalaya, el nordeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán. Se encuentra diseminado en una gran parte del planeta, y en América Central fue introducida en los años 1920 como planta ornamental y para cercas vivas

Se encuentra diseminado en una gran parte del planeta; se conoce con diversos nombres comunes: palo jeringa, acacia y jazmín francés, entre otros. Es una planta que se destaca por sus múltiples usos y adaptación a diferentes condiciones climáticas, constituyendo una opción para la alimentación, sobre todo en los países tropicales. La arbustiva *Moringa oleífera* tiene una gran plasticidad ecológica, ya que es capaz de adaptarse a las más diversas condiciones de suelo y clima. Su valor nutricional y los elevados rendimientos de biomasa (Perez, Sanches, & et al., 2010).

Taxonomía (Cabrerria Carrion, 2014).

Reino	<i>Plantea</i>
Sub-reino	<i>Tracheobionta</i>
Súper división	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Capparales</i>
Familia	<i>Moringaceae</i>
Género	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Oleífera</i>
Origen	<i>naturalizada</i>

Es un arbusto grande o árbol pequeño y frondoso que rara vez sobrepasa los 10 metros de altura, de corteza blanquecina, el tronco generalmente espeso e irregular en tamaño y forma y la corona pequeña y densa. Las hojas son compuestas, de unos 20 cm de largo, con hojuelas delgadas oblongas u ovaladas de 1-2 cm de largo y de color verde claro. Las flores son de color crema fragante de 1-1,5 cm de largo, el fruto está compuesto por 3 lígulas triangular y lineal dando la apariencia de vaina de 20-45 cm de largo y de 1-2 cm de espesor, las semillas son carnosas cubiertas por una cascara café, la raíz principal mide varios metros y es carnosa en forma de rábano.

Tolera un amplio rango de condiciones climáticas y de suelo, propia de tierras bajas y cálidas con precipitaciones anuales de 250-3000 mm de lluvia, aunque se puede encontrar también en tierras soleadas de hasta 500 msnm. Se adaptan a suelos húmedos, secos y áridos e incluso en suelos pesados de hasta 1200 msnm pero con un desarrollo inferior a la de zonas más bajas. El terreno donde se debe plantar debe tener buen drenaje ya que no soporta el encharcamiento (Cabrerria Carrion, 2014).

En Mexico, esta planta ya es parte de la horticultura tradicional desde hace mucho tiempo, principalmente con fines ornamentales: la encontramos abundantemente en los pueblos de toda la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California (al sur de La Paz y de Todos Santos). Los ejemplares de moringa son especialmente abundantes y frondosos en las llanuras calientes del sur del istmo de Tehuantepec. La planta también se cultiva en los poblados de las depresiones tropicales secas del país, como la del Balsas y la depresión central de Chiapas. La planta se encuentra en los pueblos de la zona del Infiernillo y en las cercanías de Apatzingán, Mezcala, Iguala y Tequesquitengo. Como se puede apreciar gracias a su distribución cultivada, la moringa es una planta de zonas cálidas que nunca sufren heladas. En general, prospera mejor por debajo de los 500 m snm y crece muy poco cuando se cultiva a altitudes mayores a 1 500 metros (Olson & Fahey, 2011).

En cuanto a su uso como alimento humano la Moringa oleífera posee cualidades nutricionales sobresalientes y está considerada como uno de los más completos vegetales perennes. Todas las estructuras de la planta son útiles tanto a nivel nutricional como medicinal. Las semillas pueden ser utilizadas como floculante natural en la purificación de agua, en la medicina y como aceite vegetal. Las vainas son utilizadas como alimento, fertilizante y poseen propiedades medicinales [9] al igual que las flores, hojas, corteza, goma y raíces. Las hojas de Moringa poseen 6,7g de proteínas, equivalentes al contenido proteico de un huevo, y dos veces el de la leche, más de cuatro veces la cantidad de vitamina C de las naranjas, dos veces la cantidad de vitamina A de una zanahoria, cuatro veces la cantidad de calcio

de la leche, cantidades significativas de hierro, potasio, fósforo, magnesio y otros elementos. Estas propiedades pueden ayudar a solventar problemas de inseguridad alimentaria y prevenir múltiples patologías asociadas a deficiencias de vitaminas, proteínas, minerales, carbohidratos y lípidos (Del toro, Carballo, & Rocha, 2011).



FIGURA 1. Hojas de moringa Oleífera.

10.5 Metabolitos secundarios de plantas

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Los metabolitos secundarios no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los metabolitos secundarios también difieren de los Metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, acil lípidos) en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal es decir, un metabolito secundario determinado se encuentran con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal.

Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o

venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

También es importante destacar tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono. (Taiz & Zeiger, 2006)

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica.

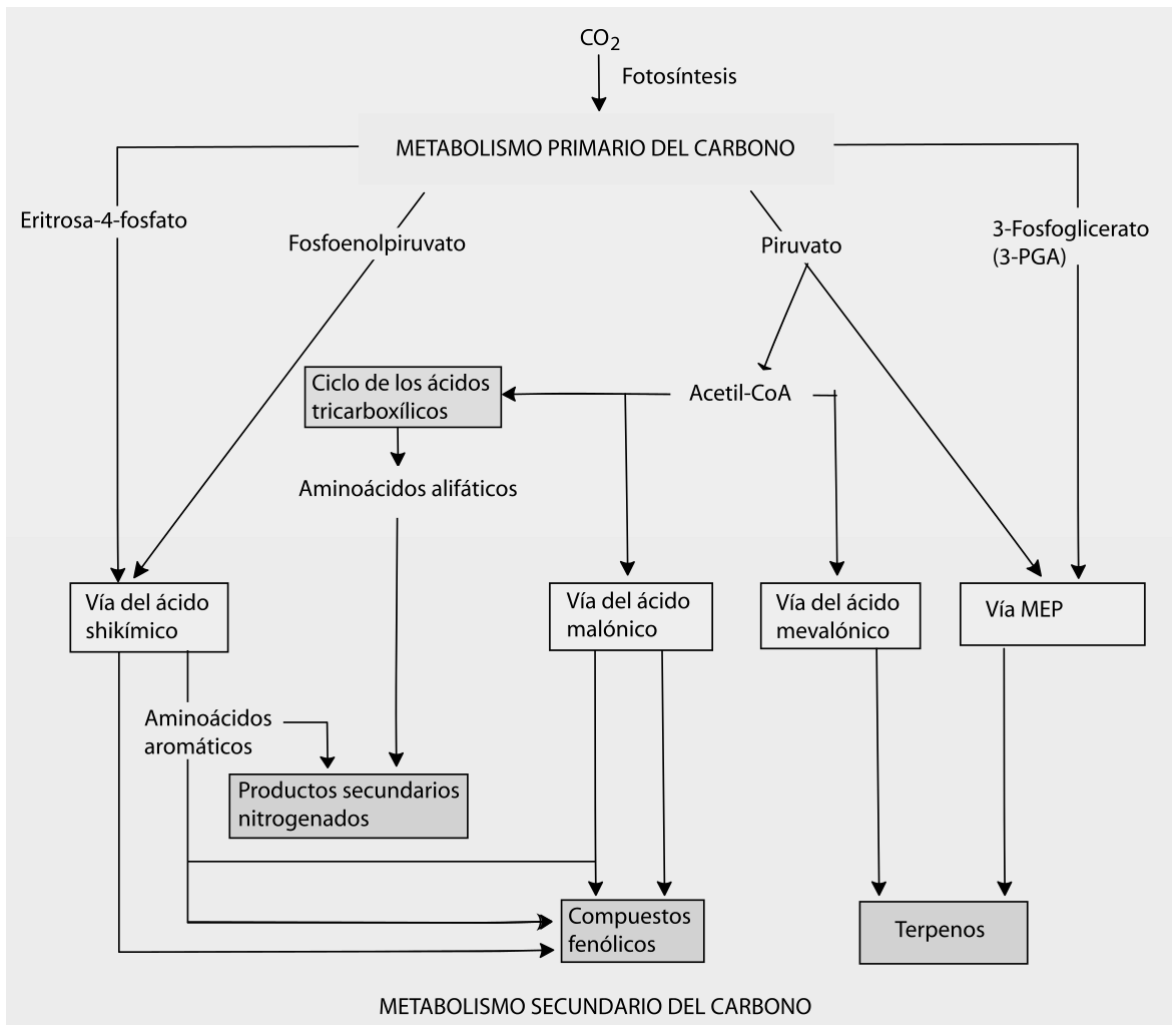


FIGURA 2 Esquema de la principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y sus interrelaciones con el metabolismo primario (Taiz & Zeiger, 2006).

En relación al criterio biosintético, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados de forma general en:

Terpenos o terpenoides, compuestos fenólicos y sus derivados, y los compuestos nitrogenados o alcaloides, todos ellos, sintetizados a partir del CO₂, como fuente de carbono.

10.5.1 Terpenos o terpenoides:

Constituyen el mayor grupo de productos secundarios, los diferentes compuestos de esta clase son generalmente insolubles en agua. Son biosintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glicolíticos. Los terpenos y sus derivados, se encuentran en los aceites esenciales, resinas y ciertas partes de la plantas como

las flores y frutos. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (Beyer & Walter, 1987).

10.5.2 Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que contienen nitrógeno en su estructura, se encuentran habitualmente en las semillas, hojas y corteza de las plantas. En estas sustancias, el átomo de nitrógeno está formando parte de un anillo heterocíclico, un anillo que contiene átomos de nitrógeno y de carbono, tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. Son sintetizados normalmente a partir de unos pocos aminoácidos comunes, como la lisina, tirosina y triptófano. Los alcaloides son muy conocidos por sus impresionantes efectos farmacológicos sobre animales vertebrados (García & Carril, 2009).

10.5.3 Compuestos fenólicos

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático:

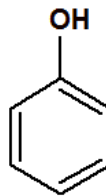


FIGURA 3. Estructura de un fenol

Estas sustancias se clasifican como compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo heterogéneo de 10000 compuestos, son solubles en compuestos orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicosidos solubles en agua, mientras otros son grandes polímeros muy insolubles.

De acuerdo a su diversidad química los fenoles tienen funciones muy diversas en las plantas.

Se puede clasificar los compuestos fenólicos según su complejidad química, entre los más importantes encontramos los siguientes grupos:

Fenoles y Ácidos fenólicos simples

Se caracterizan por la presencia del esqueleto fenólico, que se compone de un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los más abundantes en la naturaleza son los derivados del ácido benzoico y el ácido cinámico. Se encuentran en vegetales y la mayor parte de las veces conjugados con ésteres o glicosidos. Los ácidos fenólicos se dividen en tres grupos.

DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO, que poseen 7 átomos de carbono (C6-C1) y son los más simples que se encuentran en la naturaleza.

DERIVADOS DE LOS ÁCIDOS CINÁMICOS, que poseen 9 átomos de carbono (C6-C3).

CUMARINAS, son compuestos derivados del ácido cinámico por ciclación de la cadena lateral del ácido o-cumarico y todos estos compuestos poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7 libre o combinado con grupos metilo, azúcares, u otros funcionales.

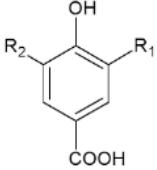
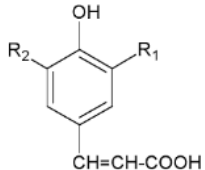
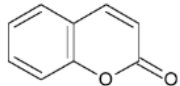
Derivados del ácido benzoico		Derivados del ácido Cinámico		Cumarinas	
					
Compuesto	R ₁	R ₂	Compuesto	R ₁	R ₂
Ácido p-Hidroxibenzoico	H	H	Ácido p-Cumárico	H	H
Ácido Vanílico	H	OCH ₃	Ácido Ferúlico	H	OCH ₃
Ácido Siringico	OCH ₃	OCH ₃	Ácido Sinápico	OCH ₃	OCH ₃
Ácido Dihidroxibenzoico	OH	H	Ácido Cafeico	OH	H
Ácido Gálico	OH	OH			

FIGURA 4. Fenoles simples

10.5.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza, de los cuales se ha detectado aproximadamente 4000 estructuras diferentes. Se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas.

Su esqueleto básico está formado por estructuras del tipo C6-C3-C5. La más básica consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, los cuales normalmente condensan para formar un anillo pirano y menos común un anillo furano.

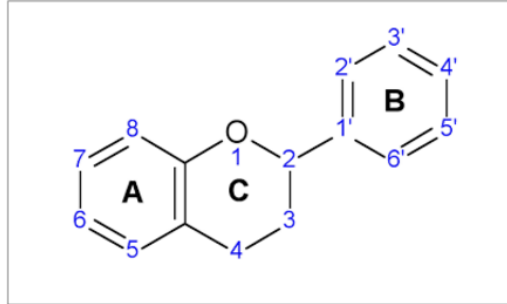
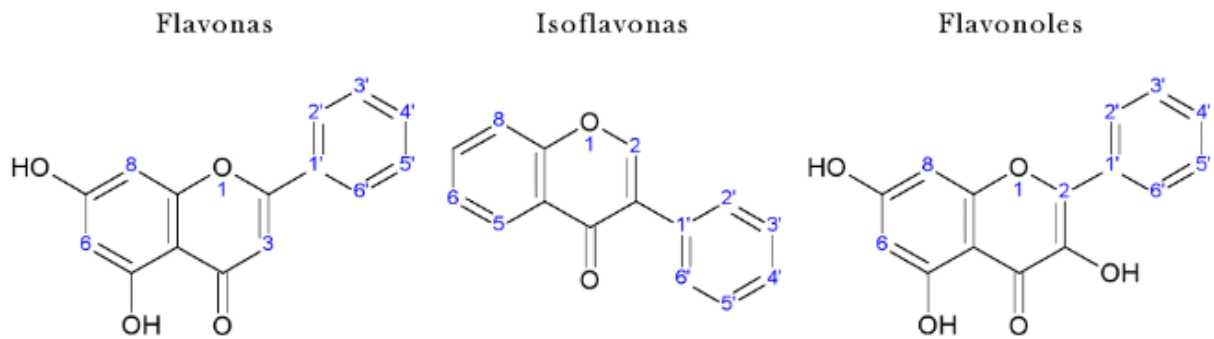


FIGURA 5. Estructura base de un Flavonoide

El anillo aromático que cicla el grupo c3 para formar el anillo pirano se denomina anillo A, el ciclopirano C, y el anillo restante se denomina anillo N. Los distintos grupos hidroxilo son añadidos, metilados, sulfatados o glicosilados en los procesos metabólicos de las plantas.

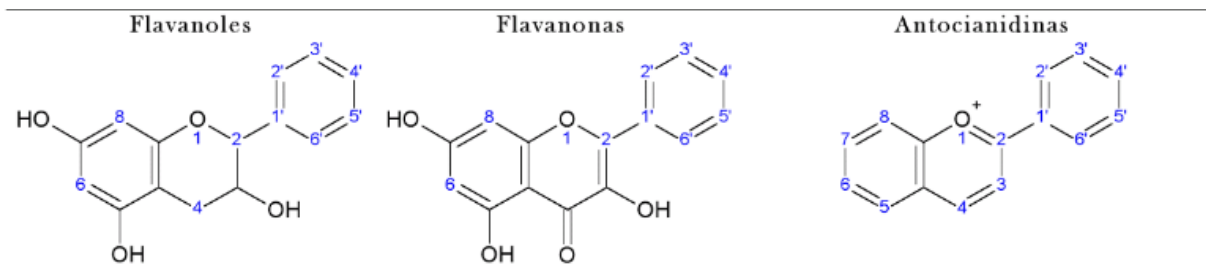
Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales, dentro de estas las más destacables son las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavonas y antocianidinas.



Compuesto	3'	4'	Compuesto	4'	5	7	Compuesto	2'	3'	4'	5'
Apigenina	H	OH	Genisteína	OH	OH	OH	Quercetina	H	OH	OH	H
Luteonina	OH	OH	Genistina	OH	OH	O- Glucosa	Miricetina	H	OH	OH	OH
							Morina	OH	H	OH	H
							Kaemferol	H	H	OH	H
							Rutina*	H	OH	OH	H
							Hesperidina**	H	OH	OCH ₃	H

* Glucósido de O-Rutinosa en C3
 **Glucósido de O-Rutinosa en C7

FIGURA 6. Clasificación de Flavonoides



Compuesto	3'	4'	5'	Compuesto	3	3'	4'	Compuesto	3	3'	4'	5'	5	7
Catequina	OH	OH	H	Naringenina	H	H	OH	Apigeninidina	H	H	OH	H	OH	OH
Catequin-3-galato*	OH	OH	H	Naringina*	O-Ra	H	OH	Cianidina	OH	OH	OH	H	OH	OH
Galocatequina	OH	OH	OH	Taxifolina	OH	OH	OH	Malvidina	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
Galocatequin-3-galato*	OH	OH	OH											

*Ácido Gálico esterificado en OH de C3

*Glucósido de O-Ramnoglucosa en C3

A los flavonoles y flavonas se unen azúcares, preferentemente en la posición c3 y con menor frecuencia al c7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicosidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente.

Los flavonoides también se pueden encontrar en forma polimérica, estando presentes en plantas, las frutas, legumbres y cereales (Neira, 2009).

10.5.3.2 Actividad antioxidante

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia, representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular, al mismo tiempo que puede causar un peligro potencial debido a las especiales características de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos, dotados de una alta reactividad, llamados especies oxigenicas reactivas (ROS por sus siglas en ingles).

Las especies oxigénicas reactivas (ROS), formadas metabólicamente como intermediarios parcialmente reducidos, son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado (Radical libre) en un nivel energético superior y por tanto dotadas de propiedades paramagnéticas que les confieren una alta e indiscriminada reactividad.

Las ROS producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos, que pueden En la actualidad son muchos los procesos relacionados con la producción de radicales libres como son: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia/reperfusión, diabetes, asfixia de neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema

nervioso central, envejecimiento, entre otros. Además, un creciente número de estudios soportan la teoría que el estrés oxidativo está envuelto en la progresión de VIH (Mosquera & Niño, 2005).

En la actualidad los compuestos fotoquímicos presentan un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Así, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas a la actividad antioxidante, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos.

Según los estudios de Rice-Evans y colaboradores (1996), junto con Fukumoto & Mazza (2000), los compuestos de mayor actividad antioxidante son los de estructura flavonoidea. Según los estudio de Martínez-Flórez y colaboradores (2002) los flavonoides son pigmentos naturales, que se encuentran en los vegetales y protegen al organismo de los daños causados por la oxidación y evitan la toxicidad de los metales pesados. Esto se debe principalmente a su estructura química (Citado en (Holguin, 2010)).

La estructura fundamental de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución. Su acción antioxidante va a depender tanto del tipo de flavonoide como el número de monómeros que conforman su estructura, así como la presencia de distintas modificaciones o grupos funcionales y de su posición (Neira, 2009).

Los parámetros estructurales que afectan a la actividad antioxidante son:

- Grupos hidroxilo: la presencia y posición de grupos hidroxilo en distintas partes de la molécula va a influir notablemente en los mecanismos de actividad antioxidante. La capacidad de neutralización de radicales libres va a depender fundamentalmente de la reactividad de los sustituyentes hidroxilo.
- Doble enlace en las posiciones 2-3 y el grupo carbonilo 4: investigaciones mostraron que la capacidad antioxidante sobre un sistema microsomial se vio incrementada cuando el doble enlace se encontraba conjugado con un grupo carbonilo en la posición 4.
- Esterificación con grupos no glicosílicos: Es común la esterificación de los flavonoides con diversos ácidos orgánicos. Entre ellos el ácido gálico es el más frecuente unido a este tipo de sustancias, habitualmente en el grupo hidroxilo de la posición 3. Los flavonoides esterificados se denomina galatos.
- Esterificación con grupos glicosilo: las gliconas son antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicosidos. La capacidad antioxidante de un flavonoide glicosilado depende de la estructura y posición del azúcar.
- Grado de polimerización: Estudios realizados sobre la relación entre el grado de polimerización de las procianidinas y la capacidad antioxidante de las mismas contra el anión superóxido encontraron que los dímeros y trímeros resultaron más efectivos que los flavonoides monoméricos contra el anión superóxido, de la misma manera, tetrámeros, hexámeros y heptámeros

mostraron todavía mayor capacidad de neutralización del anión superóxido que dímeros y trímeros.

10.6 Análisis proximal

Existen un número considerable de técnicas analíticas para determinar una propiedad particular del alimento. De ahí que es necesario seleccionar la más apropiada para la aplicación específica. La técnica seleccionada dependerá de la propiedad que sea medida, del tipo de alimento a analizar y la razón de llevar a cabo el análisis.

Las determinaciones que se realizan más frecuentemente para conocer la composición de los alimentos incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos asimilables, en un protocolo conocido como Análisis Proximal. Así mismo, dependiendo del objetivo del análisis, resultan importantes las determinaciones relacionadas con la caracterización de algún grupo de nutrientes en particular, tal es el caso del análisis de carbohidratos en el que se podría considerar la diferenciación de los que presentan poder reductor, del contenido total. En el mismo sentido se podrían analizar las proteínas solubles o considerar la caracterización de los lípidos extraídos de un alimento.

10.6.1.- Humedad

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización a que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre un 60 y un 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” Y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se halla combinada o absorbida. Se encuentra en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. (Hart, 1991).

Existen varias razones por las cuales, la mayoría de las industrias de alimentos determinan la humedad, las principales son las siguientes:

- El comprador de materias primas no desea adquirir agua en exceso.
- El agua, si está presente por encima de ciertos niveles, facilita el desarrollo de los microorganismos.

- Para la mantequilla, margarina, leche en polvo y queso está señalado el máximo legal.
- Los materiales pulverulentos se aglomeran en presencia de agua, por ejemplo azúcar y sal.
- La humedad de trigo debe ajustarse adecuadamente para facilitar la molienda.
- La cantidad de agua presente puede afectar la textura.
- La determinación del contenido en agua representa una vía sencilla para el control de la concentración en las distintas etapas de la fabricación de alimentos.

10.6.1.1.- Métodos de secado.

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y c) también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua. (Kirk et al, 1996).

10.6.1.1.1.- Método por secado en estufa de vacío.

Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si se abate la presión del sistema, se abate la presión de vapor y necesariamente se reduce su punto de ebullición. Si se sustrae aire de una estufa por medio de vacío se incrementa la velocidad del secado. Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante y que la presión no exceda los 100 mm Hg. y 70°C, de manera que la muestra no se descomponga y que no se evaporen los compuestos volátiles de la muestra, cuya presión de vapor también ha sido modificada (Nollet, 1996).

10.6.1.1.2.- Método de secado en termo balanza.

Este método se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se sitúe a peso constante. El error de pesada en este método se minimiza cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente (Nollet, 1996).

10.6.2.- Cenizas.

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes.

El valor principal de la determinación de cenizas (y también de las cenizas solubles en agua, la alcalinidad de las cenizas y las cenizas insolubles en ácido) es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos, por ejemplo en las especias y en la gelatina es un inconveniente un alto contenido en cenizas. Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación. (Kirk et al, 1996).

En los vegetales predominan los derivados de potasio y en las cenizas animales los del sodio. El carbonato potásico se volatiliza apreciablemente a 700°C y se pierde casi por completo a 900°C. El carbonato sódico permanece inalterado a 700°C, pero sufre pérdidas considerables a 900°C. Los fosfatos y carbonatos reaccionan además entre sí. (Hart, 1991).

10.6.2.1.- Método de cenizas totales

La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra, es eficiente ya que determina tanto cenizas solubles en agua, insolubles y solubles en medio ácido. Antología de Fundamentos 8 En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 550 -600°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza. (Nollet, 1996).

10.6.3.- Lípidos.

Los lípidos, junto con las proteínas y carbohidratos, constituyen los principales componentes estructurales de los alimentos. (Nielsen, 1998). Los lípidos se definen como un grupo heterogéneo de compuestos que son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos tales como éter, cloroformo, benceno o acetona. Todos los lípidos contienen carbón, hidrógeno y oxígeno, y algunos también

contienen fósforo y nitrógeno (Aurand et al, 1987). Los lípidos comprenden un grupo de sustancias que tienen propiedades comunes y similitudes en la composición, sin embargo algunos, tales como los triacilgliceroles son muy hidrofóbicos. Otros, tales como los di y monoacilgliceroles tienen movilidad hidrofóbica e hidrofílica en su molécula por lo que pueden ser solubles en disolventes relativamente polares (Nielsen, 1998)

10.6.3.1.- Métodos de extracción y cuantificación.

El contenido total de lípidos se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos (por ejemplo Soxhlet, Goldfish, Mojonnier), sin embargo también puede cuantificarse por métodos de extracción que no incluyen disolventes (por ejemplo, Babcock, Gerber) y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos (por ejemplo, infrarrojo, densidad y absorción es rayos X) (Nielsen, 2003).

10.6.3.1.1.- Método de Soxhlet.

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra la cual queda sumergida en el disolvente.

Posteriormente éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso (Nielsen, 2003).

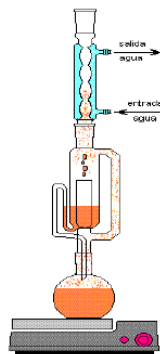


FIGURA 7. Esquema de extracción soxhlet

10.6.4.- Método de Kjeldahl.

En el trabajo de rutina se determina mucho más frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales. En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (Aurand et al, 1987)

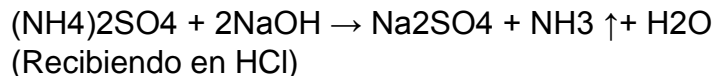
El método se basa en la determinación de la cantidad de Nitrógeno orgánico contenido en productos alimentarios, compromete dos pasos consecutivos:

- La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno orgánico es transformado a amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La recuperación del nitrógeno y velocidad del proceso pueden ser incrementados adicionando sales que abaten la temperatura de descomposición (sulfato de potasio) o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, tetracloruro, persulfatos o ácido crómico) y por la adición de un catalizador. (Nollet, 1996) El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:

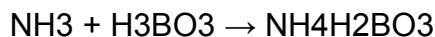
- Digestión



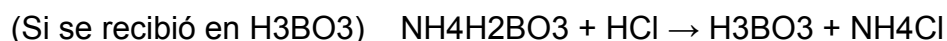
- Destilación



(Recibiendo en H₃BO₃)



- Titulación



En la mezcla de digestión se incluye sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador para acelerar la reacción, tal como sulfato de cobre. El amoníaco en el Antología de Fundamentos 21 destilado se retiene o bien por un ácido normalizado y se valora por retroceso, o en ácido bórico y valora directamente.

El método Kjeldahl no determina, sin embargo, todas las formas de nitrógeno a menos que se modifiquen adecuadamente; esto incluye nitratos y nitritos. (Pearson, 1993).

Para convertir el nitrógeno a proteína se emplea el factor de 6.25 el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno.

$$\text{factor} = \frac{100g \text{ Proteína}}{16g \text{ Nitrógeno}} = 6.25$$

11 METODOLOGÍA

11.1 Obtención de la harina de moringa

La harina se elaboró empleando hojas de moringa (*moringa oleífera*) adquiridas en el mercado de Terán en Tuxtla Gutiérrez Chiapas. Las hojas fueron lavadas con agua clorada (0.2 a 5 ppm) a exposición de 3 a 5 minutos a pH de 6.5 a 7.5.

La moringa (*moringa oleífera*), fue adquirida en el mercado de Terán en Tuxtla Gutiérrez Chiapas, las hojas fueron secadas a la sombra, molidas y tamizadas en malla N° 100 y fueron almacenadas herméticamente en frascos color ámbar bajo condiciones de refrigeración hasta su empleo.

11.2.- Cultivo de *Lactobacillus plantarum* KY131967 (Gutiérrez-Sarmiento, 2016).

11.2.1.- Cultivo en matraz.

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 205 ml de caldo MRS (marca DIFCO), se inoculó el contenido de 2 tubos de ensaye que contienen 10 ml cada uno de *Lactobacillus plantarum* KY131967. El matraz fue incubado durante 8 h a 110 rpm en una agitadora THERMO SCIENTIFIC modelo MAXQ 2000 a temperatura ambiente (25 °C)

11.2.2.- Cultivo en Biorreactor.

El caldo microbiano del cultivo anterior se introdujo en un biorreactor de tanque agitado modelo Z611000310 (Applikon, Schiedam, The Netherlands) con 2.045 L de caldo MRS, el biorreactor está equipado con accesorios para control de agitación, aireación, temperatura y pH. Las condiciones de operación del biorreactor fueron de 300 rpm, 36°C, pH 6 (controlado mediante la adición de NaOH 5 M), con aireación de 0.25 vvm durante 8 Horas.

11.2.3.- Cosecha de la biomasa.

Al término del cultivo la biomasa producida en el fermentador fue cosechada por medio de centrifugación a 4000 rpm por 20 min a 4°C en una centrifuga Eppendorf.

11.3.- Preparación de los agentes encapsulantes (Robles-Flores, 2015).

11.3.1.- Leche de soya.

La leche de soya se obtuvo de una proporción 7 L de agua por 1 kg de frijol de soya marca CEREPAK, el cual previamente se hidrato con agua purificada cubriendo el nivel del frijol durante un tiempo de 12 h, al término de esta se dreno el líquido. Los granos fueron licuados para luego filtrar con ayuda de una tela de algodón (pañalina).

El líquido obtenido del filtrado se hirvió por 30 min, retirando la espuma generada durante la cocción de la leche. La leche de soya obtenida se dosifico en frascos para esterilizar a 13 lb/pulg² durante 10 min.

11.3.2.- Maltodextrina al 35%.

Se preparó la maltodextrina marca INAMALT al 35% en agua, al mezclarlos se evitó formación de grumos, la mezcla se dejó reposar durante 15 h a temperatura ambiente (25°). Posteriormente la goma se depositó a un matraz para esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min

11.3.3.- Goma arábica al 7.5%.

Se preparó la goma arábica marca HYCEL 7.5% en agua, al mezclarlos se propuro evitar formación de grumos, la mezcla se dejó hidratar durante 15 h a temperatura ambiente (25°). Posteriormente la goma se depositó a un matraz para esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min.

11.4.- Preparación de la emulsión.

Se mezcló la leche de soya, inulina PREVENTY, goma arábica al 7.5%, maltodextrina al 35% y el pellet celular previamente cosechado. Para homogenizar se empleó el equipo IKA- Ultraturrax a 5200 rpm, durante 15 min. Se conservo 1 ml de la emulsión para posteriormente sembrar en placa.

11.4.1.- Secado por aspersión.

La emulsión resultante se alimentó a un secador por aspersión escala laboratorio marca BÜCHI Mini Spray Dryer Modelo B-290 a una temperatura de entrada 160°C y un flujo continuo de 9 ml/min.

Las microcápsulas obtenidas se recuperaron del interior del ciclón y de la tolva de recepción, se pesó y se conservaron en bolsas metálicas herméticas selladas al vacío, empleando una selladora TORO REY Modelo y se almacenó a 4°C, hasta su empleo.

11.4.2.- Viabilidad del *Lactobacillus plantarum* KY131967.

La viabilidad de *L. plantarum* KY131967 en la emulsión se determinó mediante la técnica de siembra en placa. Para ello, se realizaron diluciones seriadas hasta el orden de 10⁻⁹ usando como medio agua peptonada estéril (15 g/L). Se realizó la siembra por duplicado de las últimas tres diluciones con un volumen de inóculo de 100 µL en cajas Petri con agar MRS (Dibico). Mismas que se incubaron a 35°C por 48h.

En el caso de la viabilidad en el polvo seco, se rehidrato 1 g de éste en 9 mL de agua peptonada estéril. La muestra se agitó en un vortex hasta obtener una suspensión homogénea y se realizó diluciones seriadas según se requiriera.

Se llevó a cabo la cuenta en placa y la determinación del porcentaje de sobrevivencia de *L. plantarum* KY131967, después del proceso de secado por aspersión se determinará mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Sobrevivencia \%} = \frac{\log N}{\log N_i} * 100$$

Donde N será el número de colonias presentes después del secado y Ni el número de colonias determinados en la emulsión.

11.5.- Productos de panificación.

Los productos de panificación fueron elaboradas con la siguiente formulación: 49.7% de harina, 14.3% agua, 3.3% levadura, 17.43% de leche de almendra, 1.6% sal, 4.8% aceite de oliva, 2.09% harina de malta, 2.09% salvado de trigo y 2.09% de mejorante. Los ingredientes son mezclados en una batidora. La masa obtenida se dejó reposar a temperatura 28 A 30 °C durante 30 minutos en moldes metálicos. Finalmente la masa fue horneada a 180°C durante 20 min. Se evaluaron sustituciones de harina de trigo por 0, 3 y 5 % de las harinas de hojas de Moringa(*Moringa oleifera*), además de la carga microbiana de probiótico libre e inmovilizada a una concentración de alrededor de 4 X10⁶UFC/g de producto final. Las unidades experimentales se almacenaron individualmente en empaques plásticos cerrados, los cuales se almacenaron en lugar fresco y seco, La preparación del pan se llevó a cabo con buenas prácticas de higiene de acuerdo a la norma NOM-120-SSA-1994 (Secretaría de Salud, 1994).

11.5.1.- Diseño experimental.

Los factores a estudiar serán: tipo de harina (moringa), porcentaje de sustitución de la harina en la mezcla (0, 3 y 5%) y la adición del microorganismo libre y micro encapsulado. Todos los resultados serán analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de probabilidad de 0.05 y las medias serán comparadas mediante el análisis de DMS. El monitoreo se realizará terminado el horneado, a los 5 días y 10 días de almacenamiento.

11.6.- Análisis proximal de los productos de panificación.

11.6.1.- Cenizas

Este método se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra por calcinación y determinación gravimétrica del residuo.

Se pesaron en crisoles 4 gr de cada muestra previamente secada y pulverizada en un mortero. Se pre calcinaron un parrilla marca lab conco microdijestor kjeldahl hasta que las muestras obtuvieran un color negro. Enseguida los crisoles se pasaron a un horno a 550 °C y se dejaron durante 2 horas. Pasado ese tiempo se pre enfriaron a 100°C para posteriormente dejarlos en un desecador de 20 a 30 min. Finalmente cuando alcanzaron la temperatura ambiente se pesaron cada uno de los crisoles en una balanza analítica.

El porcentaje de cenizas totales se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%cenizas\ totales = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

11.6.2.- Nitrógeno total

Se pesaron 0.15 gramos de muestra seca en papel arroz libre de nitrógeno, doblando cuidadosamente el papel evitando que se caiga la muestra, y se colocó en el matraz Kjeldahl (seco). Se adicionaron 0.5 gramos de muestra catalizadora (CuSO_4), 3 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.3 gramos de Sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición del ácido sulfúrico. Se colocó el matraz en la parrilla de digestión comenzando a calentar a baja temperatura hasta alcanzar ebullición homogénea, en seguida se aumentó la temperatura; el matraz se giraba ocasionalmente. La digestión finalizaba hasta que la muestra obtuviera un color verde claro.

Terminada la digestión, se colocó la muestra digerida en un matraz de destilación de 500 ml, lavando el matraz Kjeldahl con pequeñas porciones de agua destilada. Se agregaron 200 ml de agua destilada al matraz de destilación y 15 ml de Hidróxido de sodio al 40%. El matraz se colocaba al sistema de destilación, en el cual, a la salida del refrigerante se adaptó una manguera con un tubo que se colocó dentro de un matraz Erlenmeyer y que contenía 10 ml de ácido bórico al 4% y dos gotas de indicador Shiro Tashiro(preparación).

El contenido de la destilación pasaba de un color azul a negro. La destilación se detenía cuando las primeras gotas del destilado hacían virar el color del indicador de violeta a verde. Posteriormente se tituló con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N, hasta que la solución cambiara de verde a violeta.

El cálculo de % proteína y % nitrógeno aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\% Nitrógeno = \frac{ml\ de\ HCl\ x\ N\ x\ 0.014\ x\ 100}{muestra\ en\ gramos}$$

$$\% Proteínas = \% Nitrógeno \times Factor$$

11.7.- Preparación de los extractos vegetales.

Del material pulverizado (harina de moringa) se tomaron 2 gramos y se adicionaron 10 ml de metanol, esta mezcla fue sometida a sonicación durante 2 horas a una temperatura de 10°C. Posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante se almaceno en total oscuridad a una temperatura de -18°C . La cuantificación de metabolitos secundarios se llevó a cabo el mismo día de la extracción.

11.8.- Obtención del extracto de pan (Chlopicka & et.al, 2012).

Se tomaron 2 gramos de muestra previamente seca y pulverizada en tubos Falcon de 50 ml. Las muestras fueron extraídas por dos horas con 20 ml de solvente compuesto de una mezcla de metanol, HCl 0.16 M y agua en una proporción 8:1:1 respectivamente. Posteriormente el extracto fue separado por decantación y los residuos sólidos fueron extraídos de nuevo con 20 ml de acetona al 70% durante dos horas. Se añadió el extracto metanólico inicial para preparar una mezcla, la cual se procedió a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a -4°C en una centrifuga eppendorf, Luego el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su empleo.

11.9 Análisis cuantitativo de metabolitos secundarios por método espectrofotométrico

11.9.1 Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & et al., 1999), empleando ácido gálico como estándar.

Se preparó varias soluciones a concentraciones conocidas y se tomó una alícuota de 100 μL del extracto o estándar correspondiente, añadiéndole 7.9 mL de agua destilada y 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 2 N. La mezcla se agitó vigorosamente con la ayuda de un vortex y después de 5 minutos se agregó 1.5 mL de solución acuosa de carbonato de sodio al 20% agitando nuevamente.

La mezcla se dejó en reposo a oscuridad total durante 2 horas, posteriormente se determinó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro marca COLE PARMER. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material pulverizado (mg equiv. ácido Gálico/g harina de Moringa).

11.9.2 Cuantificación de flavonas y flavonoles

Para la cuantificación de flavonas y flavonoles se usó el método colorimétrico de Cloruro de Aluminio descrito en (CHANG & et al., 2002).

A 0.5 ml de muestra diluida se le adicionaron 1.5 mL de Etanol A.C.S, 0.1 mL de Cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1M y 2.8 mL de agua destilada. Esta muestra se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos y la absorbancia de la mezcla reaccionante se leyó a 415 nm.

La cantidad de Cloruro de aluminio al 10% y de muestra se sustituye por la misma cantidad de agua destilada para el blanco.

La concentración de flavonas y flavonoles se expresó como mg equivalentes de quercetina·mL⁻¹, con base a la curva estándar obtenida a diferentes concentraciones a partir de una solución patrón de 0.1 mg·mL⁻¹ de Quercetina en Metanol A.C.S.

11.9.3 Barrido espectral de DPPH

Se realizó un barrido espectral de DPPH 300µM en metanol, empleando soluciones de ácido ascórbico a una concentración final de 11.36, 28.4, 56.8, 85.2 µmol·L⁻¹. Las lecturas de absorbancia se leyeron cada 5 minutos hasta llegar al tiempo 40 en un espectrofotómetro modelo COLE PALMER, a una longitud de onda de 545 nm.

11.9.4 Evaluación de actividad antioxidante

Esta determinación se llevó a cabo por el método de decoloración del radical 1-1Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH), siguiendo la metodología de (Mensor & et al., 2001) con algunas modificaciones.

Se empleó ácido ascórbico como estándar, preparando una solución madre de 1 mg·mL⁻¹, a partir de esa solución se realizaron soluciones a una concentración final de .1, .2, .5, 1, 2, 5, 10 µg·mL⁻¹ en metanol. La preparación de estas soluciones se realizó en baño de hielo.

De las soluciones preparadas se tomó una alícuota de 2.5 mL a un tubo de ensayo añadiéndole 1 mL de solución DPPH[•] a una concentración de 0.3 mM (previamente preparada) por duplicado. Se dejó reposar por 30 minutos en obscuridad, a temperatura ambiente (22°C). Una vez transcurrido el tiempo se procedió a leer absorbancia a 545 nm en un espectrofotómetro modelo COLE PALMER. Los resultados se convirtieron en porcentaje de actividad antioxidante (% AA) usando la siguiente ecuación:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) * 100}{\text{Abs control}}$$

Se utilizó como blanco 2.5 mL de la solución, según corresponda, más 1 mL de metanol. Como control negativo a 2.5 mL de metanol se le adicionó 1 mL de la solución DPPH y se calibró el equipo con metanol. Los valores de EC50 se calcularon mediante regresión lineal de los valores correspondientes a cada muestra, donde la abscisa representa la concentración del extracto y la ordenada el porcentaje de actividad antioxidante promedio.

11.10.- Supervivencia de *Lactobacillus plantarum* KY131967 en los productos de panificación.

Para evaluación de la supervivencia del *L. plantarum* KY131967 de los productos de panificación, se tomó 1 g de cada pan y se agregó en 9 mL de agua peptonada estéril (15g/L). La muestra se agitó en un vortex hasta obtener una suspensión homogénea y se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa con agar MRS según se requiera.

Se llevó a cabo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) y el porcentaje de supervivencia de *L. plantarum* KY131967 antes y después del proceso de horneado y durante el almacenamiento, la supervivencia se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Supervivencia \%} = \frac{\log N}{\log N_i} * 100$$

Donde N será el número de colonias presentes antes del horneado y Ni el número de colonias determinados después del horneado o durante el monitoreo.

12.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

12.1.- Rendimiento de la harina de *moringa*.

A partir de 5.4 kg de hojas frescas de *moringa oleifera* se obtuvo 1.3 kg de harina de moringa.

Rendimiento= 75 %

12.2.- Rendimiento *L. Plantarum* KY131967 en fermentador

El volumen de caldo cosechado fue de 2.054 Lts. Se recibió caldo en tubos falcon, y se obtuvo un total de 48 tubos con 40 ml cada uno. Se centrifugaron y se obtuvo un volumen de paquete celular de aproximadamente 4-6 ml.

12.3.- Porcentaje de viabilidad en el encapsulado.

Tabla 1 Viabilidad de *L. plantarum* después de la encapsulación.

Lote	UFC/g en la emulsión	UFC/g en el polvo	Sobrevivencia %
1	6.933×10^{10}	8.433×10^{10}	100
2	1.095×10^{11}	5.000×10^{10}	94
3	8.166×10^{10}	5.066×10^{10}	97

Ramírez (2017) Evaluó la viabilidad de las micro cápsulas obtenidas utilizando leche de soya, maltodextrina y obtuvo una sobrevivencia de 85%-95%. Comparando lo obtenido con nuestro encapsulado se puede observar en la tabla 5 que nuestra sobrevivencia fue de un promedio de 97% por lo tanto la técnica de encapsulado utilizada es óptima para obtener una buena sobrevivencia.

12.4.- Productos de panificación.

Tabla 2. Formulación de los panes

Ingredientes del pan	0%	3%	5%
Sal	15 g	15 g	15 g
Aceite	50.33 ml	50.33 ml	50.33 ml
Leche	166.6 ml	166.6 ml	166.6 ml
Mejorante	20 g	20 g	20 g
Levadura	30 g	30 g	30 g
Salvado	20 g	20 g	20 g
Harina de malta	20 g	20 g	20 g
Agua	125 ml	125 ml	125 m
Harina de trigo	450 g	435 g	425 g
BAL	50 g	50 g	50 g
Harina vegetal	0 g	15 g	25 g
masa cruda	919 g	908	920
pan	847.3 g	829.10 g	846.80 g

12.5.- Análisis proximal.

Tabla 3. Resultados de Análisis proximales

ANALISIS PROXIMALES									
PAN	0%			3%			5%		
	t0	t5	t10	t0	t5	t10	t0	t5	t10
Humedad	26.74 ± 1.6	25.1 ± 1.7	25.06± 1.5	28.50± .6	24.79 ± 1.5	24.83 ± 1.3	24.71 ± .2	25.49 ± 1.3	25.31 ± 1.1
Cenizas	6.25 ± 1.3	6.67 ± 1.2	7.08 ± 1.0	6.67 ± 1.2	6.25 ± 1.4	6.25 ± 1.3	6.25 ± 1.4	7.08 ± 1.0	7.08 ± 1.0
Proteína	7.81 ± .5	8.13±. 3	7.94±.6	8.56 ±.32	8.31 ± .1	8.25 ± .7	7.69 ± .5	8.38 ± .4	8.56 ± .4

El porcentaje de proteína obtenida tuvo un comportamiento similar entre los diferentes tratamientos, así mismo no fue afectada por el tiempo de almacenamiento teniendo valores iguales tanto en el tiempo 0 con el tiempo 10, estos resultados son semejantes los valores mencionados en (ortega RM 2010) en el que atribuyen 8.5 % de proteína para el pan blanco, 9.7% para el pan tipo baguete, 7% para el pan integral y 6.8% para el pan blanco tostado.

Estos resultados demuestran que la harina de moringa utilizada para la elaboración de los panes no ejerce un gran potencial en el aumento del contenido de proteínas de los panes, o las cantidades utilizadas de harina de moringa no son suficientes para que tengan un efecto significativo del porcentaje de proteínas frente a los panes tradicionales.

Por otro parte no hay diferencia en el porcentaje de cenizas en los tratamientos teniendo un valor mínimo de 6.25 y máximo de 7.08, sin embargo estos valores son ligeramente mayores a los reportados en panes que van desde 2-6%. Este efecto es positivo ya que la cantidad de cenizas indica el contenido de minerales y entre ellos se encuentran: calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cobre, manganeso, zinc, etc.

12.6.- Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante.

12.6.1 Barrido espectral DPPH

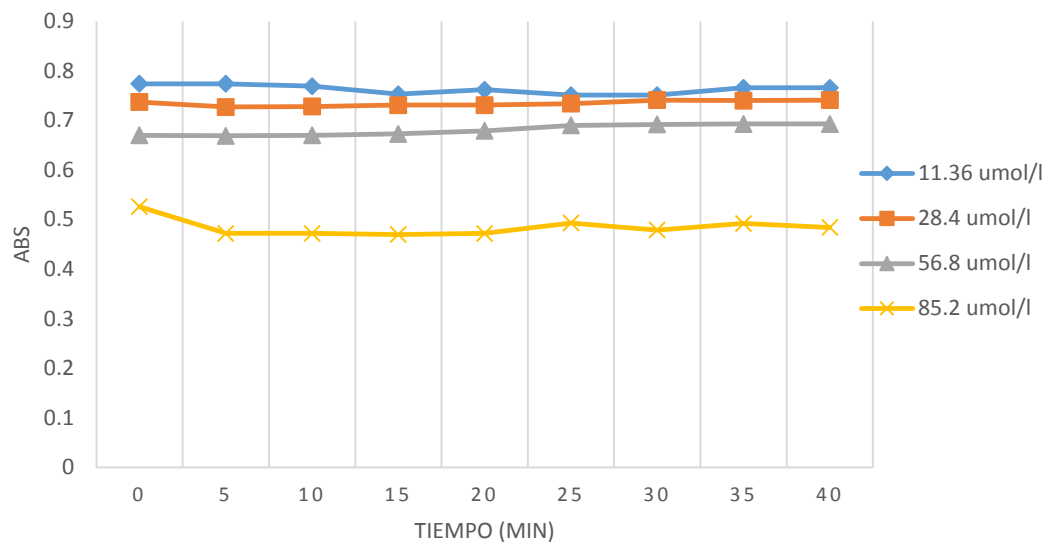


FIGURA 8. Barrido espectral dpph

12.6.2 Curvas de calibración

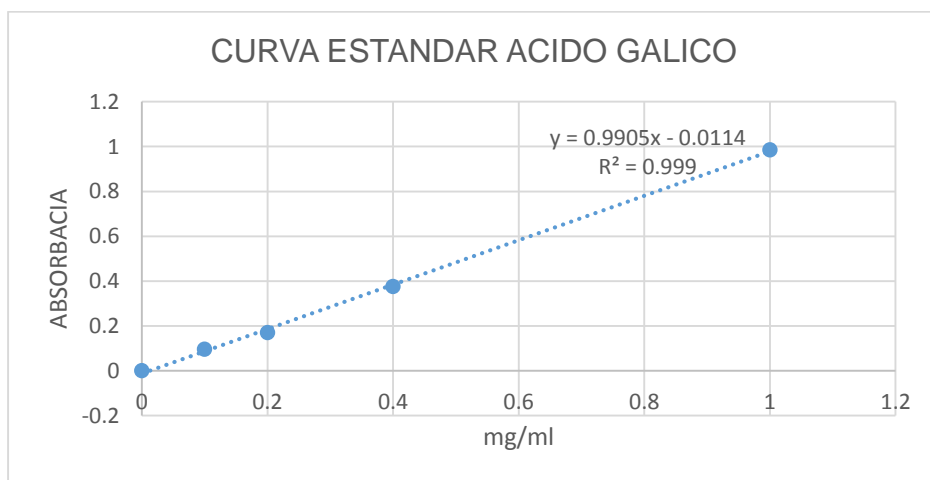


FIGURA 9 Curva estándar de Ácido Gálico

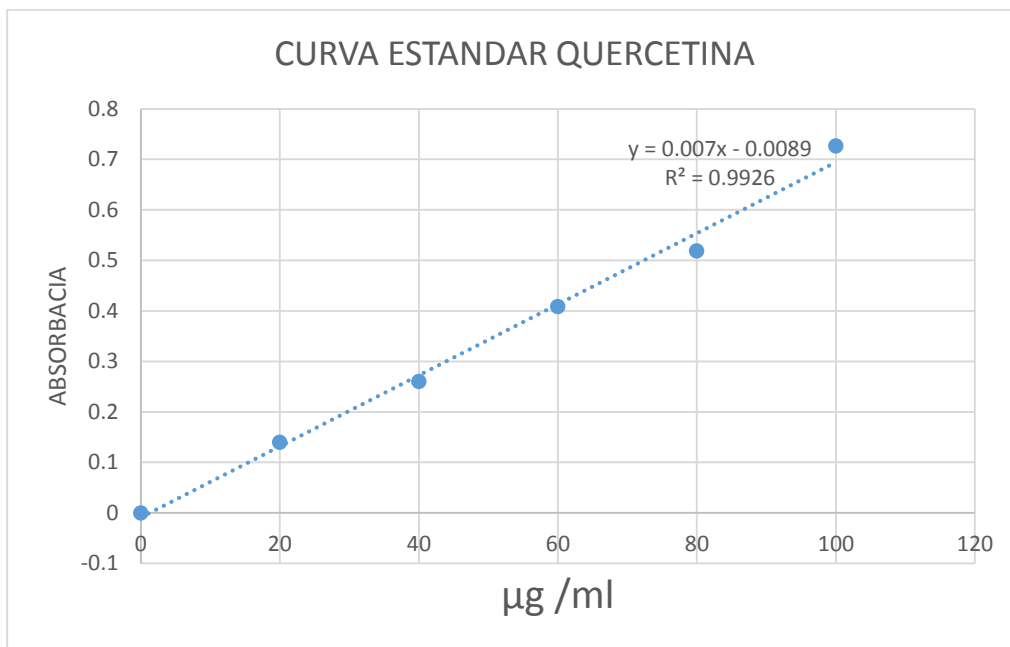


FIGURA 10. Curva estandar de Quercetina

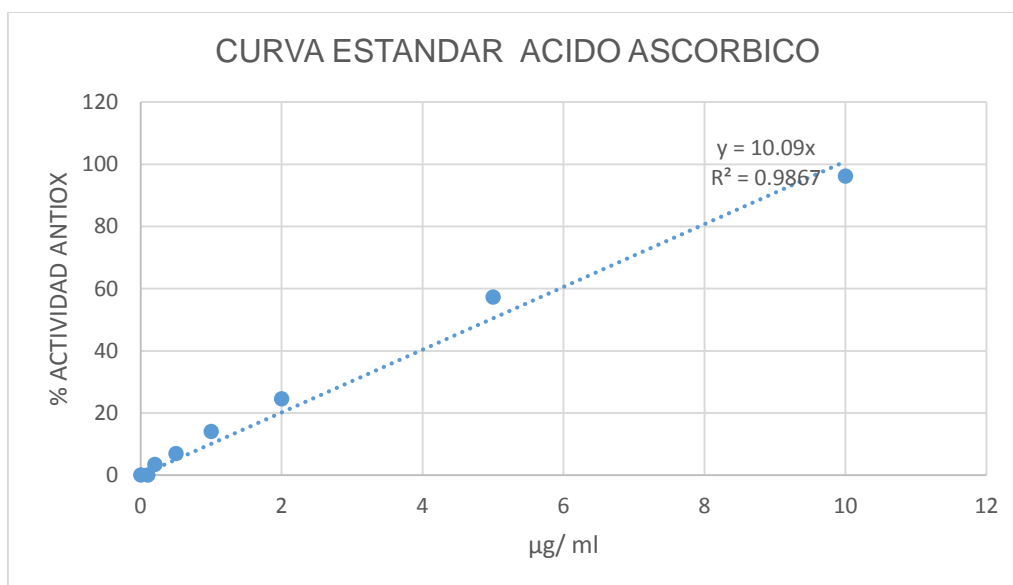


FIGURA 11. Curva estándar de Ácido Ascórbico

Tabla 4. Fenoles y Flavonoides en la Harina de Moringa

	Fenoles (mg Eq AG/g harina seca)	Flavonoides (mg Eq Quer/g harina seca)
Harina moringa oleífera	16.698 ± .34	11.064 ± .08

Tabla 5. Fenoles y Flavonoides en Productos de panificación

Fenoles (mg Eq AG/ g PS)			
	0%	3%	5%
T 0 días	3.227 ± 0.141 a* a	4.465 ± 0.535 b* a	4.728 ± 0.304 b* a
T 5 días	2.655 ± 0.322 a* a	2.978 ± 0.845 a* b	3.516 ± 0.111 a* b
T 10 días	1.743 ± 0.642 a* b	2.621 ± 0.141 b* b	2.856 ± 0.257 b* c
Flavonoides (mg Eq Quer / g PS)			
	0%	3%	5%
T 0 días	0.227 ± 0.055 a* a	0.533 ± 0.070 b* a	0.838 ± 0.026 c* a
T 5 días	0.213 ± 0.014 a* a	0.398 ± 0.027 b* b	0.752 ± 0.027 c* b
T 10 días	0.174 ± 0.053 a* a	0.386 ± 0.045 b* b	0.516 ± 0.012 c* c

* Comparación en Fila

El contenido de fenoles encontrado en las harina de moringa son menores a los reportados por (Guzman, Zamarripa, & Hernandez, 2014) en el que obtienen valores de 29,39 y 47 mg Eq de Ácido Gálico por cada gramo de harina en base seca, sin embargo son similares a los reportados por (Cabrerria Carrion, 2014) que alcanzan valores 13.40,16.38 , 9.22 mg Eq de acido galico/ gramo de materia seca, en cuanto a los flavonoides es similar a lo reportado por (Cabrerria Carrion, 2014) obteniendo 11.83 mg Equivalentes a Rutina por cada gramo de harina seca, en hojas de moringa a la edad de 18 meses y una altura de 6-8 metros de la planta, esto evidencia la variabilidad del contenido de metabolitos secundarios dependiendo de la edad y la altura de *M. oleífera* y condiciones con las que ha sido tratadas las hojas pero asegurando que son una fuente segura de metabolitos secundarios que pueden ser usados como ingredientes farmacéuticos, nutraceuticos y funcionales.

Por otro lado la cantidad de fenoles en los panes varian de acuerdo a la cantidad harina de moringa agregada, sin embargo para el tiempo cero solo se obtiene que hay diferencia significativa entre los panes de 0% con respecto a los de 3% y 5%, que no tienen diferencia significativa. Para el tiempo cinco no existe diferencia estadística entre los tratamientos de 0, 3 y 5%. Asi mismo en el tiempo diez se obtuvo que solo el pan de 0% tiene diferencia estadística significativa con respecto a los de 3 y 5%.

No obstante hay una disminución significativa de la cantidad de fenoles conforme el tiempo de almacenamiento encontrándose menor cantidad de fenoles en el tiempo 10 que la cantidad que contenía en el tiempo 0.

En cuanto a los flavonoides hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos encontrándose mayor cantidad de flavonoides en los panes de 5%, seguido de los panes de 3% y al último los panes de 0% en los tres tiempos evaluados.

Sin embargo el tiempo de almacenamiento no afecto significativamente a los panes de 0% pero si a los panes de 3% y 5%.

Tabla 6 Actividad antioxidante para los panes 0%, 3%, y 5% en el tiempo 0,5 y 10 (días).

Tiempo de almacenamiento	panes	mg eq Ac. Asc/g pan seco
0	0%	7.12 ± .28
	3%	9.42 ± .93
	5%	12.65 ± .78
5	0%	7.60 ± .58
	3%	8.66 ± .05
	5%	11.40 ± .15
10	0%	6.977± .34
	3%	9.80 ± .20
	5%	12.74± .80

Ver anexo D4

Tabla 7. Actividad antioxidante en harina de *moringa oleifera*.

	IC 50 µg Eq Ac. Asc / ml	mg eq Ac. Asc/g harina de moringa
Harina de moringa	4.76	17.14

Ver anexo D3

Los resultados obtenidos en la actividad antioxidante indican que la harina de moringa es un potente antioxidante, los mg equivalentes de ácido ascórbico encontrados en nuestra harina de moringa es superior a los reportados por (Guzman, Zamarripa, & Hernandez, 2014) que obtienen .645mg de vitamina c por cada gramo de harina en base seca. Esta superioridad se le atribuye a la cantidad de ácido ascórbico y la suma de los metabolitos secundarios y otros componentes antioxidantes que tienen las hojas de moringa.

En cuanto a los panes veganos se encontró que son potentes antioxidantes debido a los ingredientes de origen vegetal y no se encontró diferencia significativa entre los días de almacenamiento lo que nos indica que es una buena alternativa para alimento funcional.

12.7.- Sobrevivencia.

Tabla 8.- Sobrevivencia de L. plantarum después del horneado.

Pan con harina de moringa	UFC /g en el polvo	UFC/g en la masa	Sobrevivencia	UFC / g PAN
0%	8.433×10^9	-----	-----	-----
3%	5.000×10^9	2.73×10^9	86%	-----
5%	5.066×10^9	8×10^8	81%	-----

El porcentaje de sobrevivencia en la masa del pan fue de 86 y 81% respectivamente del polvo original, sin embargo los resultados de la sobrevivencia de L. plantarum Microencapsulado después del horneado fueron desfavorables ya que no hubo sobrevivencia después del proceso de cocción.

Las temperaturas por encima de 45 ° C son Conocidos por ser críticos para la supervivencia de probióticos, se Tiene demostrado que una temperatura superior a 65 ° C es fatal para Todas las bacterias probióticas libres. Ding y Shah (11) mostraron Que el tiempo juega un papel importante en la sobrevivencia de estos microorganismos. Observaron que la exposición de probióticos encapsulados a la temperatura antes mencionada durante una hora da lugar a Muerte bacteriana completa. Sin embargo hay estudios que prueban una buena sobrevivencia de probioticos a 180 ° c pero con encapsulantes que resisten al tratamiento térmico.

13.- CONCLUSIONES

Los productos de panificación son completamente veganos, la adición de harina de moringa oleífera no influye directamente en la cantidad de proteínas ya que no hay diferencia estadística significativa entre los panes de 0% con los panes de 3 y 5 %.

Los panes veganos con harina de moringa oleífera tuvieron mayor cantidad de cenizas o minerales que otros panes tradicionales no veganos.

Entre mayor porcentaje de sustitución de la harina de trigo por la harina de moringa mayor será la cantidad tanto para fenoles como flavonoides en el producto de panificación.

El tiempo de almacenamiento del pan influye notablemente en la reducción de los metabolitos secundarios.

Los productos de panificación definitivamente no son un alimentos probiótico ya que *Lactobacillus plantarum* no sobrevive al proceso de horneado.

Los productos de panificación veganos pueden ser considerados funcionales ya que aunque tienen las mismas propiedades nutrimentales que otros panes tradicionales, tiene una muy buena actividad antioxidante tanto en los panes de 0 como en los de 3 y 5%.

14.- COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

Análisis de problemas: Eficacia para identificar un problema y los datos pertinentes al respecto, reconocer la información relevante y las posibles causas del mismo.

Capacidad crítica: Habilidad para la evaluación de datos y líneas de acción para conseguir tomar decisiones lógicas de forma imparcial y razonada.

Energía: Capacidad para crear y mantener un nivel de actividad adecuado. Muestra el control, la resistencia y la capacidad de trabajo

Liderazgo: Utilización de los rasgos y métodos interpersonales para guiar a individuos o grupos hacia la consecución de un objetivo.

Planificación y Organización: Capacidad para realizar de forma eficaz un plan apropiado de actuación personal o para terceros con el fin de alcanzar un objetivo.

Trabajo en equipo: Disposición para participar como miembro integrado en un grupo (dos o más personas) para obtener un beneficio como resultado de la tarea a realizar, independientemente de los intereses personales

Tenacidad: Capacidad para perseverar en un asunto o problema hasta que quede resuelto o hasta comprobar que el objetivo no es alcanzable de forma razonable.

Tolerancia al estrés: Mantenimiento firme del carácter ante acumulación de tareas o responsabilidades, lo cual se traduce en respuestas controladas frente a un exceso de cargas.

ANEXOS.

A. Preparación del indicador Shiro Tashiro:

Pesar 0.2 gr de rojo de metilo y disolver en 60 ml de etanol y aforar 100 ml con agua.

Pesar 0.2 gr de azul de metileno y disolver en 60 ml de etanol y aforar 100 ml con agua.

Hacer una solución con relación 2:1 rojo de metilo y azul de metileno.

B. El rendimiento de las harinas se calculó con la siguiente ecuación. Siendo 5.4 la masa inicial y como masa final 1.3 (kg).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \times 100$$

C. Para la obtención del porcentaje de proteínas el factor que se afectó al contenido de nitrógeno fue de 6.25.

D1. Fenoles. Los mg eq AG/ g de harina

Se calculó de la siguiente manera:

Promedio de las absorbancias: 0.154

Ecuación de la recta de la curva patrón: $y = 0.9905x - 0.0114$

Mg eq AG/ ml = $(0.154 + 0.0114) / 0.9905 = 0.16698 \times 10$ (dilución)

Mg eq AG/ ml = 1.6698×10 (mililitros de metanol usados para la elaboración del extracto)

Mg eq Ag/ gr = 16.698

D2. Flavonoides. Mg eq Quer/ g de harina.

Promedio de abs: 0.146

Ecuación de la recta de la curva patrón: $y = 0.007x - 0.0089$

μg eq Quer/ ml = $(0.146 + 0.0089) / 0.007 = 22.128 \times 50$ (dilución)

μg eq Quer/ ml = 1106.428×10 (mililitros de metanol usados para la elaboración del extracto)

mg eq Quer/ g = 11.064

D3. Actividad Antioxidante. Mg eq AA/ gr de harina.

Se realizó la dilución de 1:360 para el extracto de harina de moringa oleífera obteniendo un %AA= 48.059

Ecuación de la recta de la curva patrón: $y = 10.09 X$

$\mu\text{g eq AA/ ml} = (48.059)/10.09 = 4.76 * 360$ (Fac. De Dilución)

$\mu\text{g eq AA/ ml} = 1713.6 * 10$ (mililitros de metanol usados para la elaboración del extracto)

$\text{mg eq AA/ g} = 17.136$

D4. Actividad Antioxidante productos de panificación

Se realizó diluciones del extracto de panes hasta encontrar un porcentaje cercano al 50% de actividad antioxidante.

Al valor más cercano al 50% de Actividad Antioxidante se interpolo en la curva de Ácido ascórbico y se obtuvo los $\mu\text{g eq Ac. Asc./ ml}$. Posteriormente se calculó los:

$$\text{mg Eq. Ac. Asc/ g pan} = \frac{\mu\text{g eq Ac. Asc./ ml} \times \text{Factor de Dilución} \times 40 \text{ (ml de solvente/g pan)}}{1000}$$

Factor de Dilución = volumen final / volumen agregado

TIEMPO (DIAS)	panes	dilución	% ACT. ANTIOX.	ic 50 $\mu\text{g eq Ac. Asc./ ml}$
t0	0%	1:40	45	4.45
	3%	1:50	48	4.71
	5%	1:60	53	5.27
t5	0%	1:40	48	4.75
	3%	1:40	55	5.41
	5%	1:72	40	3.96
t10	0%	1:40	44	4.36
	3%	1:50	49	4.9
	5%	1:65	49	4.9

C. Para el cálculo del contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, se realizó de la manera anterior, respetando sus absorbancias promedio y %AA respectivas.

BIBLIOGRAFIA

1. Archibald, F. and Fridovich, I. (1981b). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146: 928-936.
2. AURAND, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. *Food Composition and Analysis. An AVI Book, New York.* 1987
3. Barthelmebs, L., Divies, C., and Cavin, J-F. (2000). Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3368-3375.
4. Beyer, H., & Walter, G. (1987). *Manual de química orgánica.* Barcelona: Reverté.
5. Cabrera Carrion, J. L. (2014). *EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES, FLAVONOIDES, TANINOS Y ACEITES ESENCIALES EN TRES ESTADOS DE MADURACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LA MORINGA (MORINGA OLEÍFERA).* Machala: Universidad Técnica de Machala.
6. Carmona, D. A. (2009). *Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (Brassica rapa L.).* Santiago de Compostela: Univ Santiago de Compostela.
7. CHANG, C.-C., & et al. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
8. Chlopicka Joanna, Pawel Pasko a, Shela Gorinstein, Aneta Jedryas, Pawel Zagrodzki. (2011). Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads.
9. Del toro, J., Carballo, A., & Rocha, L. (2011). Valoración de las propiedades nutricionales de Moringa Oleifera en el departamento de Bolívar. *Revista de Ciencias*, 23-30.
10. García, A. Á., & Carril, E. P.-U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
11. Gutiérrez S., W., Tovilla C., M. L. y Ventura C., L. M. C. (2015). Evaluación de factores extrínsecos sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y su producción de ácido láctico en un reactor de tanque agitado. *Congreso internacional de investigación de AcademiaJournals.* ISSN 1946-5351.
12. Hart MJ, et al. (1991) Identification of the human platelet GTPase activating protein for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem* 266(31):20840-8
13. Holguin, C. U. (2010). *ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE Pentacalia corymbosa y P.nitida (ASTERALES: ASTERÁCEAE) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.* Bogota: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.

14. Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, vol. 2, pp. 1208-1234.
15. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., 56 de Vos, W.M. and Siezen, R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1990-1995.
16. Kirk R.S., Sawyer, R y Egan H. "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". Segunda edición. Editorial CECSA. México 1996
17. Kono, Y. and Fridovich, I. (1983b). Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 155: 742-746.
18. López, M. S.-P. (2008). Biosensores Amperometricos de tirosinasa para la determinacion de compuestos fenolicos en medios acuosos y no acuosos. Madrid: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
19. Mensor, L. L., & et al. (2001). Screening of Brazilian Plant Extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 127-130.
20. Molina, M. E. (2008). Prácticas dietéticas vegetarianas. Implicaciones nutricionales. *Offarm*, 80-86.
21. Mosquera, O. M., & Niño, J. (2005). Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica*, 231-234.
22. Neira, J. I. (2009). Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
23. NIELSEN S. (ed); *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1998.
24. Nielsen S. (Ed); (2003) *Food Analysis Laboratory Manual*; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
25. Nolle, Leo M. L.; *Handbook of food analysis*; M. Dekker, New York 1996.
26. Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1071-1082.
27. ORTEGA RM (2010). Composición y valor nutricional del pan. En Gil A, Serra LI, editores. *El libro blanco del pan*. Madrid: Editorial Médica Panamericana, p. 79-94.
28. Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S., and Shimzu, A. (2000). Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3093- 3097

29. PEARSON. D; Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos; Acribia, S.A. Zaragoza (España) 1993
30. Perez, A., Sanches, T., & et al. (2010). Características y potencialidades de Moringa oleifera, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. Pastos y Forrajes, 33(4), 1-10.
31. Robles- Flores G.(2015) Secado por aspersion de leche de soya adicionada con Lactobacillus plantarum e inulina, informe técnico 36:6-12
32. Singleton, V. L., & et al. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178.
33. Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal (Tercera ed., Vol. I). Castellón de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I.
34. Villanueva, R. (2015). Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. Ingenieria Industrial, Universidad de Lima, 265-275.