



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOCIENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

TESIS DOCTORAL

**DISEÑO DE ALIMENTOS POTENCIALMENTE FUNCIONALES SOBRE LA
BASE DE PRODUCTOS TRADICIONALES**

AUTORA: YASMINA BARBOZA

MARACAIBO (Venezuela) – CÓRDOBA (España), 2012

TITULO: *DISEÑO DE ALIMENTOS POTENCIALMENTE FUNCIONALES
SOBRE LA BASE DE PRODUCTOS TRADICIONALES.*

AUTOR: *YASMINA MARÍA BARBOZA DE MARTINEZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**DISEÑO DE ALIMENTOS POTENCIALMENTE FUNCIONALES SOBRE LA
BASE DE PRODUCTOS TRADICIONALES**

Tesis que presenta la Mgsc
Yasmina Barboza de Martínez
para optar al Grado de Doctor

VºBº Director de la Tesis
Dr. Luis M. Medina Canalejo

La presente Tesis se comenzó a desarrollar bajo el Programa de Doctorado en conjunto entre la Universidad de Córdoba (España) y el Vicerrectorado Académico de Luz, Universidad del Zulia (República Bolivariana de Venezuela)



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



UNIVERSIDAD DEL ZULIA

MARACAIBO (Venezuela) – CÓRDOBA (España), 2012



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Prof. Dr. Luis M. Medina Canalejo
Dpto. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Universidad de Córdoba
Edificio Darwin-Anexo. Campus de Rabanales
14071 - Córdoba (España)

**LUIS MANUEL MEDINA CANALEJO, PROFESOR TITULAR DE
UNIVERSIDAD ADSCRITO AL ÁREA DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE
CÓRDOBA**

I N F O R M A:

Que la Tesis titulada “**DISEÑO DE ALIMENTOS POTENCIALMENTE FUNCIONALES SOBRE LA BASE DE PRODUCTOS TRADICIONALES**” de la que es autora Dña. Yasmina María Barboza de Martínez bajo mi dirección, cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Córdoba a 24 de septiembre de dos mil doce.

A la memoria de mis padres.

Quien desde el cielo bendicen este logro.

Yasminita, Mayerling, Andrea Virginia, Paula y Cristian.

Mis hijos adorables a los cuales amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Yadira, Gislana y Jesús Alberto.

Siempre orgullosos de mi espíritu de superación
Los quiero mucho siempre estarán en mi corazón

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Medina, por brindarme la oportunidad de compartir sus conocimientos, por su estímulo, dedicación y asesoría, pilar fundamental para la realización de esta investigación. Abnegado y solidario, siempre dispuesto a orientar y dejar crecer.

A los miembros del Comité Académico del Doctorado en Ciencias y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Córdoba, por su atención y valiosas orientaciones.

A los profesores de la Escuela de Nutrición Y Dietética de la Universidad del Zulia por la receptividad demostrada durante el desarrollo de la presente investigación.

A todos, sinceramente, muchas gracias

ÍNDICE

1. Introducción.....	10
2. Objetivos de la investigación.....	17
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
2.2.1. Estudio 1.....	18
2.2.2. Estudio 2.....	19
3. Justificación.....	20
4. Marco teórico y antecedentes.....	24
4.1. Alimento funcional.....	25
4.2. Desarrollo de alimentos funcionales: Importancia y tendencias.	28
4.3. Formulación y mezcla.....	30
4.4. Cultivos probióticos.....	31
4.5. Importancia de la matriz alimentaria en la eficacia de los cultivos probióticos.....	35
4.6. Aspectos que deben ser considerados en el desarrollo de productos probióticos.....	37
4.7. Selección de la cepa probiótica.....	38
4.7.1. Viabilidad de los microorganismos probióticos.....	39
4.7.2. Tolerancia al ácido y a la bilis.....	41
4.7.3. Antagonismo entre bacterias.....	42
4.7.4. Propiedad de adherencia.....	43
4.7.5. Actividad proteolítica.....	43
4.7.6. Aspectos tecnológicos.....	44
4.7.7. Identificación de la cepa.....	45
4.8. <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730.....	45
4.9. Cereales y alimentos funcionales.....	51
4.9.1. Valor nutritivo.....	52
4.9.2. Avena.....	53
4.10. Leguminosas.....	54
4.10.1. El quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>).....	56
4.11. Plasma de bovino.....	58

5. Material y métodos.....	61
5.1. Material y métodos empleados en el desarrollo de un alimento funcional potencial preparado con quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>), avena y <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730 (Estudio 1).....	62
5.1.1. Diseño experimental y formulaciones.....	62
5.1.2. Obtención de la materia prima.....	63
5.1.3. Elaboración de las distintas formulaciones.....	64
5.1.4. Condiciones del cultivo.....	64
5.1.5. Determinación de <i>L. reuteri</i>	65
5.1.6. Análisis físico-químicos.....	65
5.1.6.1. Proteínas.....	66
5.1.6.2. Grasas.....	67
5.1.6.3. Determinación de fibra cruda.....	68
5.1.6.4. Humedad.....	69
5.1.6.5. Cenizas.....	70
5.1.6.6. Carbohidratos.....	70
5.1.6.7. Energía metabólica.....	71
5.1.6.8. Determinación del pH.....	71
5.1.7. Evaluación sensorial.....	71
5.1.8. Análisis estadístico.....	72
5.2. Material y métodos empleados en la formulación y evaluación de panquecas de maíz preparadas con proteína plasmática de bovino (Estudio 2).....	73
5.2.1. Diseño experimental y formulaciones.....	73
5.2.2. Obtención de la materia prima.....	74
5.2.3. Proceso de elaboración.....	74
5.2.4. Rendimiento.....	75
5.2.5. Análisis físico-químicos.....	75
5.2.5.1. Proteínas.....	76
5.2.5.2. Grasas.....	77
5.2.5.3. Determinación de fibra cruda.....	78
5.2.5.4. Humedad.....	79
5.2.5.5. Cenizas.....	80
5.2.5.6. Carbohidratos.....	81
5.2.5.7. Energía metabólica.....	81
5.2.5.8. Determinación de aminoácidos.....	81
5.2.6. Determinaciones microbiológicas.....	82
5.2.7. Pruebas biológicas.....	83
5.2.8. Evaluación sensorial.....	84

5.2.9. Análisis estadístico.....	85
6. Resultados y discusión.....	86
6.1. Resultados y discusión relativos al desarrollo de un alimento funcional potencial prearado con quinchoncho (<i>Cajanus cajan</i>), avena y <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730 (Estudio 1).....	87
6.1.1. Composición química.....	87
6.1.2. Viabilidad de <i>Lactobacillus reuteri</i> durante el almacenamiento refrigerado de las cremas.....	90
6.1.3. Evolución de los valores de pH durante el almacenamiento refrigerado de las cremas.....	95
6.1.4. Evolución sensorial.....	97
6.2. Resultados y discusión relativos a la formulación y evaluación de panquecas de maíz preparadas con proteína plasmática de bovino (Estudio 2).....	98
6.2.1. Rendimiento del producto.....	99
6.2.2. Contenido de humedad, proteínas, grasa, fibra, carbohidratos y energía metabolizable.....	100
6.2.3. Aminoácidos.....	101
6.2.4. Evaluación biológica.....	103
6.2.5. Evaluación sensorial.....	104
6.2.6. Determinaciones microbiológicas.....	106
7. Conclusiones.....	107
8. Resumen.....	111
9. Summary.....	115
10. Referencias bibliográficas.....	119
ANEXO I Artículo publicado en el International Journal of Food Sciences and Nutrition.....	145
ANEXO II Artículo publicado en el Advance Journal of Food Science and Technology.....	154

1. Introducción

El desarrollo de alimentos que promueven la salud y el bienestar es una de las prioridades clave en la investigación para la industria alimentaria y ha propiciado el consumo de alimentos enriquecidos con componentes fisiológicamente activos como los probióticos (Klaenhammer y Kullen, 1999; Betoret y col., 2003; Betoret y col., 2011). En los últimos años, los alimentos que afectan a funciones específicas o sistemas del cuerpo humano y proporcionan beneficios para la salud más allá de energía y nutrientes, han experimentado un crecimiento rápido en el mercado. Este crecimiento es impulsado por las innovaciones tecnológicas, desarrollo de nuevos productos y el número creciente de consumidores conscientes de la salud e interesados en productos que mejoren la calidad de vida (Granado y col., 2010; Nehir y Simsek, 2012).

Al respecto, los expertos en Ciencia y Tecnología de Alimentos están creando un nuevo marco para estas recomendaciones dietéticas basadas en alimentos, principalmente en las áreas de métodos de almacenamiento, preservación, restauración de nutrientes y fortificación, así como también el desarrollo de alimentos diseñados centrados en la salud y alimentos funcionales (FAO/WHO, 1996; USDA, 2010).

Adicionalmente, la desnutrición, principalmente proteica, es uno de los más graves problemas que afectan actualmente a la humanidad, haciéndose más notable en países en vías de desarrollo. El principal

inconveniente a nivel mundial es la escasez de proteínas de origen animal y el bajo poder adquisitivo de gran parte de la población, lo que ocasiona una situación de desnutrición. Esta situación ha afectado negativamente el consumo de alimentos de los estratos socioeconómicos con menores ingresos, generando la sustitución de alimentos de origen animal por los de origen vegetal, notándose un incremento en el consumo de cereales y de leguminosas.

En los últimos años, la divulgación dada a los potenciales efectos beneficiosos de dietas bajas en grasas y con alto contenido en fibra, ha supuesto un fuerte empuje en el uso de leguminosas en la alimentación humana. Las leguminosas son especies ampliamente cultivadas en todo el mundo, de gran importancia para la alimentación del ser humano y animal, todo ello debido a su elevado contenido de proteínas, ciertos minerales y vitaminas (Singh y col., 2004).

El quinchoncho (*Cajanus cajan*), también llamado *pigeon pea*, se encuentra entre las legumbres más importantes. Se cultiva de manera extensiva en América, África e importantes áreas de Asia, como India. Tiene un importante contenido proteico, almidón, bajo contenido en grasas, moderada cantidad de fibra y un balance equilibrado de minerales esenciales (Torres y col., 2007). Más aún, no sólo aporta proteínas, sino que puede suponer una fuente económica de la misma, así como su contenido en compuestos no digeribles puede tener un valor prebiótico (Eneche, 1999). Por otro lado, el maíz ha adquirido importancia en la nutrición de millones de personas en todo el mundo, siendo un alimento básico en la dieta cotidiana de muchas poblaciones, especialmente México, América Central, Venezuela y Colombia (Milán-Carrillo y col., 2006).

Paralelamente, un buen número de estudios sugieren que el consumo de avena tiene efectos que promueven la salud, ya que es uno de los pocos cereales que contiene tanto fibra soluble como insoluble (Brown, 1992). Aunque la proporción de aminoácidos de la avena no es óptima debido a su deficiencia en lisina y treonina, ésta puede complementarse con leguminosas, las cuales son ricas en dichos aminoácidos. Por su lado, estas leguminosas son pobres en metionina, lo que no sucede con la avena, de manera que se puede lograr una combinación provechosa dado que sus contenidos en aminoácidos se complementan.

Atendiendo a estas consideraciones, la ciencia de la Nutrición ha cambiado los conceptos clásicos de evitar deficiencias de nutrientes y una adecuada nutrición básica al concepto de una alimentación “positiva” u “óptima”. En este sentido el enfoque de las investigaciones se dirige hacia la identificación de componentes biológicamente activos en alimentos que tengan el potencial de optimizar el bienestar físico y mental y que también puedan reducir el riesgo de enfermedad.

En muchos productos alimenticios tradicionales, incluyendo frutas, vegetales, cereales, soja y leche, se ha determinado la presencia de componentes con potenciales beneficios para la salud (Kedia y col., 2007). En adición a estos alimentos, se están desarrollando nuevos alimentos para aumentar o incorporar estos componentes benéficos por sus deseables efectos fisiológicos.

Es por ello que las industrias alimentarias han recurrido al uso de alimentos funcionales que contengan compuestos fisiológicamente activos que puedan mejorar la salud. En este contexto se encuentran los

probióticos. Se entiende por probióticos los microorganismos viables que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del hospedador (FAO/WHO, 2002; Ramos, y col., 2012). Dichos microorganismos han sido incorporados con éxito en diversos alimentos, tanto en leches fermentadas como de manera creciente en otros productos no fermentados más allá del sector lácteo (Crittenden, 2009).

En efecto, la industria láctea estableció la incorporación de bacterias lácticas potencialmente probióticas de origen humano en alimentos fermentados tradicionales, liderando la producción de diferentes tipos de leches fermentadas en general, y yogures en particular (Gomes y Malcata, 1999). El mercado ha introducido nuevas aplicaciones de microorganismos probióticos en alimentos, como yogur congelado, yogur de soja, postres lácteos, quesos, helados, pan y chocolate (Aragón-Alegro y col., 2007; Cruz y col., 2010; Di Criscio y col., 2010; Gómez y col., 2011).

Los más conocidos por su amplia aplicación son los microorganismos del género *Lactobacillus*; el uso de cepas seleccionadas como suplemento en alimentos ha ganado popularidad, y los consumidores han reconocido su contribución en la fermentación de alimentos y beneficios para la salud (Sanders, 1999). Los lactobacilos son microorganismos que tienen ciertos requerimientos especiales para crecer, como carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas del complejo B y minerales, además de otras necesidades específicas de la cepa (Gómez y Malcata, 1999). Así, la composición del sustrato y los requerimientos nutricionales de la cepa afectan considerablemente la fermentación del producto. El crecimiento microbiano también depende de factores ambientales, tales como pH, temperatura y acumulación de metabolitos (Ganzle y col., 1998).

Uno de los principales probióticos a nivel industrial es *Lactobacillus reuteri*, el cual además de controlar infecciones gastrointestinales, posee otros efectos beneficiosos como son sus propiedades hipocolesterolémicas, antimutagénicas, de mejora de la inmunidad y de digestibilidad de la lactosa, entre otras (Connelly, 2004). El potencial de los cultivos probióticos depende de varios factores, pero el más importante es su supervivencia durante la elaboración del producto, su almacenamiento, su tránsito a través del tracto gastrointestinal, y la capacidad de proliferar en el intestino grueso (Tannock, 1998).

De hecho, se han usado diversos criterios para la selección de cepas probióticas, siendo el más empleado la supervivencia en el tránsito por el intestino grueso, y su capacidad de colonizarlo de manera transitoria, lo que se relaciona con su adherencia a la mucosa o epitelio intestinal, y su actividad antimicrobiana mediante la producción de moléculas antimicrobianas que inhiben o impiden la adherencia de patógenos (Margolles y col., 2009). Estos factores deben tomarse en cuenta para la selección de la cepa (Saarela y col., 2000). Los principales desafíos que se le presentan a un probiótico mientras pasa a través del aparato digestivo son las secreciones gástricas del estómago y la liberación de las sales biliares en el duodeno (Bezkorovainy, 2001).

En relación a estos aspectos, varios investigadores han estudiado la supervivencia de microorganismos en presencia de sales biliares y pH reducido y ha quedado demostrado que las propiedades físico-químicas del alimento utilizado como vehículo influyen de manera muy importante sobre la supervivencia del probiótico *in vivo* o *in vitro* (Gilliland y col., 1984; Clark y Martin, 1994; Lankaputhra y Shah, 1995; Charteris y col., 1998; Erkkila y Petaja, 2000; Dunne y col., 2001; Charalampopoulos y col., 2002). Otro

criterio importante se refiere a que estos microorganismos deben ser viables y estar disponibles a concentraciones mayores de 10^6 ufc/g de producto, ya que sería cuestionable presumir algún efecto beneficioso en productos donde su concentración sea baja (Shah, 2000).

Así, la utilización de *Lactobacillus reuteri* en productos elaborados con quinchoncho (*Cajanus cajan*) y avena puede producir productos con características definidas y consistentes y posibles propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo, deben considerarse varios aspectos en el diseño de este nuevo preparado alimenticio, como la composición y procesamiento de la materia prima, composición química, evaluación sensorial, perfil de aminoácidos, digestibilidad, del producto, así como también la capacidad de crecimiento y productividad del cultivo iniciador y la estabilidad del producto final durante el almacenamiento.

En virtud de las ideas expuestas, el propósito de esta investigación será elaborar productos para untar a base de leguminosa, avena y *Lactobacillus reuteri* y evaluar el uso potencial de estos sustratos en el desarrollo de un producto probiótico, con la finalidad de ofrecer un producto innovador, de alto valor nutricional y que a su vez pueda contribuir a la prevención y recuperación de ciertas enfermedades. Además, este producto debería resultar accesible a los estratos de bajos recursos económicos.

2. Objetivos de la investigación

2.1 Objetivo General

Diseñar alimentos potencialmente funcionales sobre la base de productos tradicionales venezolanos. Fundamentalmente, el trabajo pretende:

- Formular productos tipo crema para untar a base de quinchoncho, avena y *Lactobacillus reuteri* (en adelante denominado Estudio 1)
- Fortificar y evaluar un producto tipo panqueca preparada con maíz tierno y proteína plasmática (en adelante denominado Estudio 2)

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Objetivos específicos del Estudio 1:

- Evaluar las características físico-químicas de los productos a base de quinchoncho, avena y *L. reuteri*
- Examinar sus características organolépticas
- Determinar la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* en el producto

2.2.2. Objetivos específicos del Estudio 2:

- Evaluar las características físico-químicas de los productos tipo panqueca
- Examinar sus características organolépticas
- Valorar su calidad microbiológica
- Establecer el perfil de aminoácidos
- Evaluar su eficiencia proteica y digestibilidad

3. Justificación

El énfasis en buscar alimentos que contribuyan a propiciar una salud adecuada ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Además, es un hecho que los alimentos de origen vegetal constituyen una parte importante de la dieta y en muchos países en vías de desarrollo son la base de la alimentación. Entre los alimentos de origen vegetal más utilizados se encuentran las leguminosas, las cuales debido a su bajo costo y alto valor nutritivo son una alternativa económica para sustituir alimentos de difícil acceso para la población de bajos recursos. Una proporción adecuada de leguminosa podría sustituir alimentos de origen animal (Singh y col., 2004).

Por otra parte, las tendencias recientes no sólo se han enfocado en la obtención de nuevos productos de alta calidad nutricional y bajo costo, sino que además de ello posean ingredientes con efectos beneficiosos para la salud. Todo ello ha sido el resultado de numerosos informes, que establecen que un porcentaje considerable de consumidores (45-50%) prefiere alimentos que los puedan ayudar a disminuir su dependencia respecto a medicamentos y terapia médica (Niva, 2007).

Un gran número de investigaciones realizadas sobre el uso de ciertos microorganismos indican su valor en el desarrollo de alimentos funcionales dirigidos al tratamiento de una variedad de enfermedades. La prevención o disminución de enfermedades es preferible a su tratamiento (Huggett y

Schlitter, 1996). Se han diseñado diferentes tipos de productos funcionales y se han introducido en el mercado con éxito para disminuir la presión arterial, niveles de colesterol, azúcar en sangre y osteoporosis (Sanders, 1998). A este respecto, las investigaciones relacionadas con alimentos funcionales se han enfocado progresivamente hacia el desarrollo de la suplementación, introduciendo probióticos, los cuales afectan la composición y actividad de la microbiota intestinal (Ziemer y Gibson, 1998).

No podemos pensar que el interés por los alimentos funcionales surgió de la nada. Todo ha coincidido con los cambios propios experimentados en la manera de abordar la Nutrición. Atrás parece haber quedado el concepto de “nutrición adecuada”, es decir, aquella que aporta específicamente nutrientes como carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y minerales, siendo sustituida por el de “nutrición óptima”, es decir, aquella que incorpora al concepto anterior el aspecto de la potencialidad o capacidad de los alimentos para promocionar la salud y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades (Kedia y col., 2007).

Desde este contexto, la investigación se justifica teóricamente por cuanto toda técnica dirigida a mejorar y aumentar el valor nutritivo de alimentos destinados al consumo humano constituye un reto. Por otra parte, el producto formulado puede constituir una alternativa alimentaria suministrando los nutrientes necesarios y ofreciendo efectos beneficiosos para la salud. Hasta la fecha no hay estudios que muestren la utilización del quinchoncho en la elaboración de un producto funcional con cultivo probiótico. Además, desarrollar estos productos innovadores sobre la base de otros tradicionales, haría mucho más fácil su aceptación y vinculación con los aspectos culturales de la alimentación.

Metodológicamente, este estudio utiliza determinaciones o análisis específicos que permitieron conocer la composición físico-química del producto, su contenido en aminoácidos, el comportamiento del cultivo probiótico (*Lactobacillus reuteri*) en sustratos como el quinchoncho, avena y en el producto terminado, lo cual servirá de base para profundizar en futuras investigaciones, logrando de esta manera avanzar en los conocimientos relacionados con este campo.

Desde el punto de vista práctico los resultados obtenidos buscan sentar las bases y proporcionar conocimiento de manera que se puedan definir procesos para desarrollar otros productos alternativos y novedosos, así como económicamente asequibles a distintos estratos sociales, que permitan contribuir a corregir algunos problemas relacionados con salud y desnutrición, así como contribuir a la mejora de la calidad de vida a través de la alimentación.

4. Marco teórico y antecedentes

A continuación se presentan los elementos teóricos y conceptuales que permitieron sustentar el estudio, exponiendo los antecedentes y las bases teóricas en el contexto de la investigación.

4.1. Alimento funcional

El concepto de alimento funcional surge en Japón en el año 1980 como parte de la política del gobierno de mejorar la salud (Arai, 2002). Aunque el concepto fue introducido hace mucho tiempo con Hipócrates y su lema "Deja que la comida sea tu medicina", existe gran cantidad de evidencias que apoyan esta hipótesis de que la dieta puede desempeñar un papel importante en la modulación de las funciones fisiológicas en el cuerpo (Vasiljevic y Shah, 2008).

Los alimentos funcionales incluyen alimentos o ingredientes alimentarios que ejercen un efecto beneficioso sobre la salud humana y/o reducen el riesgo de la enfermedad crónica más allá de las funciones nutricionales básicas (Huggett y Schliter, 1996). Diversas instituciones de referencia, como la *Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences*, describen un alimento funcional como cualquier alimento modificado o ingrediente alimentario que puede proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene (Food and Nutrition Board, 1994).

Por su parte, la Asociación Dietética Estadounidense (ADA, 1999) sostiene un punto de vista más inclusivo para definir los alimentos funcionales. Los describen como “cualquier alimento o ingrediente alimentario que puede proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene” y toma en cuenta los siguientes puntos muy importantes:

- Los alimentos funcionales pueden ser fortificados, enriquecidos o alimentos mejorados
- Es probable que todos los alimentos sean funcionales en algún nivel fisiológico
- Para tener un efecto beneficioso sobre la salud, un alimento funcional debe consumirse como parte de una dieta variada sobre una base regular, a niveles eficaces.

Expresado de manera sencilla, los alimentos funcionales son alimentos que forman parte normal de la dieta, que han sido fortificados o enriquecidos para proporcionar un efecto beneficioso adicional a la salud en conjunto con sus propiedades nutritivas normales (Diplock y col., 1999; Hasler, 2002). En definitiva, y de acuerdo con una definición generalmente aceptada, un alimento funcional es cualquier alimento modificado que puede proveer un beneficio para la salud más allá de los nutrientes que contiene (FDA, 2004). El concepto de alimento funcional incluye dos efectos primarios sobre la salud: el aumento de la función fisiológica y la disminución del riesgo de enfermedades (Verschuren, 2002).

También hay autores que incluyen aquellos alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra dietética, o

alimentos con añadido de sustancias biológicamente activas como fotoquímicos o antioxidantes y probióticos que tienen efectos beneficiosos sobre la vida. De acuerdo con esta definición, todo alimento sin modificar como frutas y verduras puede considerarse como la forma más simple de un alimento funcional. Por ejemplo, el brócoli, la zanahorias o los tomates podrían considerarse alimentos funcionales porque son ricos en componentes fisiológicamente activos como sulforafano, β -carotenos y licopenos, respectivamente.

Por otro lado, también se incluyen alimentos modificados, como los que han sido fortificados con nutrientes o mejorados. Dentro de estos alimentos saludables se mencionan los productos reducidos en grasa, azúcar o sal, fortificados con vitaminas, minerales, fitoquímicos, péptidos bioactivos o ácidos grasos poliinsaturados omega3. Asimismo, las leches funcionales fermentadas con bacterias probióticas y/o con adición de probióticos y prebióticos (Manzini y col., 2007).

Desde el punto de vista del consumidor, una encuesta realizada en los Estados Unidos por la *International Food Information Council* sobre las actitudes hacia los alimentos funcionales indica que hay un alto interés en alimentos con beneficios que promuevan la salud: un total del 93% de los consumidores encuestados creen que algunos alimentos, además de su innato valor nutritivo confieren efectos adicionales a la salud (International Food Information Council, 2002). El creciente interés de los consumidores hacia los alimentos funcionales constituye, por consiguiente, una base para el desarrollo de investigaciones en este sentido (Bech-Larsen y Grunert, 2003; Urala y Lähteenmaki, 2003; Huotilainen y col., 2006).

En general, parece que los alimentos funcionales proporcionan al consumidor alternativas de selección para abordar sus intereses en salud, haciéndose cada vez más discernidores sobre tales elecciones (Devcich y col., 2007). En la última década, el mercado de los alimentos funcionales ha ido aumentando en Europa e incluye una variedad de alimentos, tales como los que disminuyen el colesterol en sangre o la presión sanguínea, así como alimentos para el bienestar del estómago (Verbeke, 2005).

Habitualmente, un alimento que es comercializado como funcional contiene ingredientes adicionales y es desarrollado tecnológicamente con un beneficio específico para la salud. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos para describirlos, estos pueden ser considerados como una categoría mal definida. En la mayoría de los países no hay ninguna definición legislativa del término; la separación entre alimento convencional y funcional constituye un desafío aún para los expertos en alimentos. En los Estados Unidos, en lugar de regular este grupo de producto *per se*, los esfuerzos legislativos están siendo desarrollados y dirigidos hacia la restricción del uso de proclamas a la salud en las etiquetas de los envases (Niva, 2007). En la Unión Europea, los esfuerzos legislativos han ido también en este sentido (Anónimo, 2006; 2008).

4.2. Desarrollo de alimentos funcionales: Importancia y tendencias

Los expertos proclaman que la única esperanza de supervivencia de una empresa es su capacidad para seguir innovando. En este contexto, el desarrollo de nuevos alimentos funcionales resulta cada vez más difícil, ya que estos deben cumplir con las expectativas de los consumidores de

productos que sean simultáneamente apetecibles y saludables (Shah, 2007; Granato y col., 2010).

Según Jousse (2008), el desarrollo de nuevos productos es un constante desafío para la investigación científica y aplicada y se ha observado que el diseño de alimentos es esencialmente una forma de optimizar los ingredientes claves para generar la mejor formulación. Los productos alimenticios que alegan una capacidad funcional hacia la promoción de la salud y se extienden más allá de la disposición general de proporcionar nutrientes esenciales, son generalmente aceptados por los consumidores. Esto puede traducirse en una disminución de la mortalidad y un aumento en la calidad de vida dentro de la población (Judío y Jones, 2007).

Sin embargo, la aceptación de un ingrediente o alimento funcional específico está vinculada al conocimiento que el consumidor tiene de los efectos sobre la salud de estos ingredientes específicos. Por lo tanto, los ingredientes funcionales que están en la mente de los consumidores como las vitaminas, fibra y minerales, logran considerablemente mayores tasas de aceptación que ingredientes que han tenido visibilidad solo por un periodo de tiempo corto, tales como flavonoides, carotenoides y ácidos grasos omega3.

De acuerdo con Siro y col. (2008), uno de los primeros pasos en el desarrollo de un producto alimenticio funcional es identificar las expectativas del consumidor hacia dicho producto. Según Roberfroid (2000) un producto alimenticio puede hacerse funcional mediante la eliminación de algún componente identificado como causante de efectos perjudiciales cuando se consume (proteínas alergénicas, lactosa,

fenilalanina), mediante el aumento de la concentración de un componente naturalmente presente (fortificación con micronutrientes), aumentando la concentración de un componente no nutritivo a un nivel conocido para producir un efecto beneficioso, o agregando un componente que no está normalmente presente en la mayoría de los alimentos y no es necesariamente un macro o micronutriente, pero que se ha demostrado que posee efectos beneficiosos (antioxidantes, prebióticos, probióticos).

Desde el punto de vista de la investigación, el desarrollo de alimentos funcionales representa un territorio donde la experiencia de los tecnólogos de alimentos, nutricionistas, veterinarios, médicos y químicos de alimentos deben combinarse para obtener productos innovadores, manteniendo la calidad de los alimentos tradicionales. Por otro lado, estos alimentos deben ser capaces de modular parámetros fisiológicos relacionados con la prevención de la enfermedad o estado de salud (Fogliano y Vitaglione, 2005).

4.3. Formulación y Mezcla

Formular y mezclar constituye una tecnología simple y económica utilizada ampliamente en la elaboración de alimentos. Su uso en el desarrollo de alimentos funcionales tiene una larga historia para el control exitoso de las deficiencias de vitaminas A y D, diversas vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina y niacina), yodo y hierro. Desde la década de los cuarenta, la fortificación de cereales con tiamina, riboflavina y niacina (Kyritsiy y col., 2011) se ha convertido en una práctica común. La margarina fue fortificada con vitamina A en Dinamarca y la leche con

vitamina D (FAO/WHO, 2006). En los Estados Unidos se ha enriquecido con fitoesteroles y es utilizada por los pacientes con alto riesgo cardiovascular (Laforest y col., 2007).

La lista de compuestos activos es interminable (vitaminas, probióticos, péptidos bioactivos, antioxidantes...) y el tipo de productos finales obtenidos por formulación está creciendo constantemente (Wildman, 2006). Desde la clásica leche enriquecida (Alzate y col., 2010; Kim y col., 2010) y yogures (Karaaslan y col., 2011; Zare y col., 2011) pasando por las fórmulas infantiles enriquecidas con prebióticos (Alliet y col., 2007), probióticos (Puccio y col., 2007), vitaminas (Chávez-Servín y col., 2008), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Chávez-Servín y col., 2009) para proporcionar a los recién nacidos los nutrientes necesarios para un óptimo crecimiento y desarrollo, hasta jugos principalmente enriquecidos con flavonoides (González-Molina y col., 2009), vitaminas (Rivas y col., 2007) y resveratrol (González-Barrio y col., 2009). También se mencionan pastas elaboradas con leguminosas (Petitot y col., 2010) y carnes enriquecidas con compuestos bioactivos (Jiménez-Colmenero y col., 2010; Zhang y col., 2010).

4.4. Cultivos probióticos

A comienzos del siglo XX la creencia general era que los microorganismos eran perjudiciales y no fue sino hasta 1908 cuando el famoso investigador ruso ganador del premio Nobel Élie Metchnikoff postula la existencia de microorganismos beneficiosos que ayudarían a combatir ciertas enfermedades. Inicialmente, observó que los campesinos búlgaros tenían una longevidad media de 87 años, algo excepcional para comienzos de siglo y que 4 de cada 1000 pasaban de los 100 años. Una de

las principales diferencias en su estilo de vida en comparación con dietas contemporáneas era el consumo de grandes cantidades de leches fermentadas (Metchnikoff, 2004).

Las bacterias ácido lácticas son los microorganismos probióticos más importantes asociados típicamente con el tracto gastrointestinal humano. Estas bacterias son Gram-positivas, no formadoras de esporos, catalasa negativas, aerotolerantes, de crecimiento complicado, tolerantes al ácido y estrictamente fermentativos; el ácido láctico es su principal producto final de la fermentación del azúcar (Axelsson, 1993). Con respecto a las bacterias probióticas utilizadas (Tabla 1), destacan las bifidobacterias y los lactobacilos, los cuales a menudo son etiquetados y comercializados con nombres comerciales imaginativos (*Bifidobacterium digestivum*, *Lactobacillus anti-caries*, etc.) (Makinen y Bigret, 1993; Sendra, 2010).

Lee y Salminen (2009) recopilan 15 cepas probióticas comerciales, y Reid y Bruce (2009) especifican de entre las mismas un lactobacilo, *L. reuteri*, en concreto *L. reuteri* RC-14, uno de las más documentadas mundialmente en relación con la salud de las mujeres. Rivero y col. (2012) recogen un listado de 59 cepas probióticas comerciales empleadas en el mundo. Dos de ellas corresponden a *Lactobacillus reuteri*, en concreto *L. reuteri* MM53 y *L. reuteri* SD2112 (MM2), siendo los nombres identificadores de la propia empresa comercializadora, BioGaia.

Tabla 1. Cultivos probióticos potenciales utilizados en alimentos

Genero	Especies
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus/johnsonii/gasseri</i>
	<i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
	<i>casei</i>
	<i>crispatus</i>
	<i>lactis</i>
	<i>paracasei</i>
	<i>fermentum</i>
	<i>plantarum</i>
	<i>rhamnosus</i>
	<i>reuteri</i>
	<i>salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>
	<i>animalis/lactis</i>
	<i>bifidum</i>
	<i>breve</i>
	<i>essensis</i>
	<i>infantis</i>
	<i>longum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>
	<i>clausii</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>
	<i>faecium</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> cepa Nissle
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilacti</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>boulardii</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>

Fuente: Sendra y col. (2010)

Debido a sus notables beneficios para la salud, las bacterias probióticas han sido incluidas cada vez con más frecuencia en productos lácteos fermentados, como yogures, quesos suaves semi-duros y duros,

helados y postres lácteos congelados (Desmond y col., 2005; Stanton y col., 2003). Por otra parte, los cereales generalmente son sustratos adecuados para el crecimiento de cepas probióticas. No obstante, la gran diferencia relativa al desempeño entre especies y la complejidad del sustrato en este sentido hacen necesario identificar los factores intrínsecos y de proceso que pudieran mejorar el crecimiento, y lo más importante, la supervivencia de la cepa probiótica *in vivo* e *in vitro* (Charalampopoulos, 2002). Si los microorganismos probióticos viables no están presentes en el producto en concentración suficiente en el momento de consumo, no podrán beneficiar al consumidor. Además de los beneficios para la salud, el cultivo probiótico deberá reunir diversas características que lo hagan susceptible de comercializar en productos, entre las que se encuentran su capacidad para sobrevivir, actividad en el producto y estabilidad durante el almacenamiento, además de no perjudicar aspectos sensoriales (Heller, 2001).

En este sentido, es importante señalar que los lactobacilos son microorganismos de crecimiento laborioso, que requieren carbohidratos fermentables, péptidos, aminoácidos, vitaminas del complejo B y minerales para crecer, además de requerimientos específicos de la cepa ya que la adaptabilidad del probiótico al sustrato es un criterio muy importante que se debe tomar en cuenta para seleccionar la cepa adecuada (Oberman y Libudzisz, 1998; Severson, 1998).

Hoy en día varios tipos de productos lácteos contienen probióticos. Tradicionalmente, el yogur es elaborado utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Según Shah (2001), se cree erróneamente que estas bacterias en el yogur proporcionan algunos beneficios, pero no son habitantes naturales del

intestino y no sobreviven bajo las condiciones ácidas y concentración de bilis que usualmente se encuentra en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, para que el yogur sea considerado como producto probiótico, otro tipo de lactobacilos o bifidobacterias deberían ser incorporados.

4.5. Importancia de la matriz alimentaria en la eficacia de los cultivos probióticos

Anteriormente los probióticos utilizados en los alimentos se agregaban principalmente como parte del proceso de fermentación. Sin embargo, cada vez se agregan más como suplementos. Además, también hay una tendencia creciente en el uso de probióticos como “nutracéuticos”, los cuales están disponibles de varias formas, por ejemplo en cápsulas. Esta tendencia puede llevar a una disminución de la eficacia funcional debido a la exclusión del potencial efecto sinérgico de los alimentos (Ranadheera y col., 2010).

Se considera que uno de los principales factores que regulan la colonización de microorganismos en el tracto gastrointestinal son los alimentos. Los alimentos ayudan a las bacterias a través del estómago por su capacidad tampón. Además, pueden contener otros ingredientes que interactúan con los probióticos para alterar su funcionalidad. Los alimentos que fomentan el crecimiento de bacterias favorables se conocen como prebióticos. Oligosacáridos como la lactulosa, galactooligosacáridos, inulina, fructooligosacáridos y otros carbohidratos son algunos de los ejemplos conocidos de prebióticos. Es evidente el potencial efecto sinérgico que existe cuando se combinan adecuadamente probióticos y

prebióticos, porque los prebióticos promocionan el crecimiento y la actividad de los probióticos (Ranadheera y col., 2010).

Los ingredientes de ciertos productos alimenticios pueden contener prebióticos de manera natural que ayudan a mejorar la eficacia funcional de los probióticos. Muchos otros alimentos, como los productos lácteos, carne, cereales, bebidas y fórmulas infantiles pueden ser fortificados con prebióticos durante el proceso de fabricación para aumentar la eficacia del probiótico (Gibson y col., 2004). Además, un número de otros componentes de alimentos incluyendo sustratos inespecíficos, plantas y sus extractos, metabolitos de microorganismos y ácidos grasos poliinsaturados, también pueden ser importantes en la eficacia de los probióticos (Bomba y col., 2006).

Las propiedades fisicoquímicas de los alimentos utilizados para vehicular los probióticos, como capacidad tampón y pH, son factores importantes que influyen en la supervivencia de los mismos y por ello potencian el efecto probiótico durante el tránsito gástrico. La formulación de alimentos con un adecuado pH y de alta capacidad tampón aumentará el pH del tracto gástrico y así mejorará la estabilidad de los probióticos (Kailasapathy y Chin, 2000).

Dado que una de las mejores formas de optimizar la eficacia de los probióticos es combinarlos con los componentes que actúan sinérgicamente y la existencia de un pH adecuado, la selección cuidadosa de la matriz de alimentos es un factor importante que debe ser considerado en el desarrollo de estos productos. El contenido de grasa, la concentración y tipo de proteína, los azúcares y el pH del producto son alguno de los factores que pueden afectar el crecimiento y la viabilidad

en el alimento. Por lo tanto, la formulación del producto puede ser manipulada y de esta manera incidir en una mayor eficacia.

En nuestro estudio la selección de la avena y el quinchoncho como matriz para el crecimiento de *L. reuteri* se realizó considerando estos factores, y tomando en cuenta además que ambos alimentos se complementan en relación a su perfil de aminoácidos. Por otra parte, la fermentación es un proceso importante que disminuye significativamente el contenido de antinutrientes y con ello mejora el valor nutritivo de los cereales y las leguminosas. Asimismo, estimula la multiplicación de organismos seleccionados y sus actividades metabólicas en los alimentos. Si la fermentación se lleva a cabo con organismos probióticos, podría tener un beneficio específico agregado, aparte de mejorar el valor nutritivo. Por lo tanto, si una mezcla de alimentos basados en avena y quinchoncho es fermentada con un organismo probiótico no sólo puede mejorar la calidad nutritiva, sino que también puede ejercer beneficios a la salud.

4.6. Aspectos que deben ser considerados en el desarrollo de productos probióticos

Varios autores (Prasad, 2005; Collado, 2006; Shah, 2007) sugieren que una cepa bacteriana probiótica debe valorarse de acuerdo a las siguientes características:

- Debe ser de origen humano
- Debe sobrevivir durante el tránsito gástrico
- Debe tolerar las sales biliares
- Debe adherirse al tejido epitelial intestinal.

Por otro lado, Sendra y col. (2010) señalan que las principales propiedades tecnológicas que deben cumplir los probióticos para obtener el efecto biológico deseado y sin causar ninguna toxicidad son

- Tolerancia al oxígeno
- Tolerancia al ácido
- Habilidad para crecer en leche
- Habilidad para metabolizar prebióticos
- No afectar adversamente la calidad y características sensoriales del producto
- Ser estable en condiciones comerciales

El primer criterio supone que las cepas pertenecientes a especies bacterianas que están presentes en la biota intestinal pueden tener una oportunidad de supervivencia mejor en el medio que les es propio. Los restantes criterios proporcionan una evaluación del potencial de la cepa probiótica para superar el entorno gástrico, la presencia de sales biliares y resistir, por medio de la adhesión, el flujo del contenido intestinal.

Es importante señalar, sin embargo, que un último criterio para seleccionar con éxito la cepa probiótica es la capacidad de conferir a los consumidores un beneficio para la salud y que los criterios anteriores representan los primeros pasos en el esquema de selección (Morelli, 2007). Algunos autores (McCartney, 2002; Perdigón, 2006) han sugerido dos enfoques adicionales en la selección de bacterias probióticas, como la evaluación in vitro de la funcionalidad y el análisis genómico.

4.7. Selección de la cepa probiótica

La importancia del origen ha sido debatida en los últimos años, y los estudios actuales más recientes indican que el éxito radica en que las cepas sean de origen humano. El argumento es que una cepa probiótica puede funcionar mejor en un entorno similar (por ejemplo el tracto gastrointestinal humano) de donde fue originalmente aislado.

Los aspectos de seguridad incluyen las siguientes especificaciones:

- 1- La cepa utilizada debe ser preferiblemente de origen humano
- 2- Deben ser aisladas del tracto gastrointestinal de humanos sanos
- 3- Debe tener un historial no patógeno (ser GRAS). Así, no debe tener ningún historial asociado con enfermedades tales como endocarditis infecciosa o trastornos del tracto gastrointestinal
- 4- No debe llevar genes transmisibles de resistencia a los antibióticos.

4.7.1. Viabilidad de los microorganismos probióticos

La viabilidad de los microorganismos probióticos es un parámetro clave para el desarrollo de los alimentos funcionales en que se implican. Aunque la cantidad de células requeridas para producir beneficios terapéuticos no se conoce y puede variar en función de la cepa y el efecto saludable deseado, en general un nivel mínimo superior a 10^6 bacterias probióticas viables por gramo de alimento es aceptado (Shah, 2000), ya que sería cuestionable presumir algún efecto beneficioso en productos donde su concentración sea baja.

Históricamente, para microorganismos como las bifidobacterias, Schuler-Malyoth y col. (1968) establecieron el llamado “mínimo terapéutico” en 10^5 /g de producto. Kurmann y Rasic (1991), también para bifidobacterias, en 10^6 /ml. Por su parte, Hernández (2012) considera que la dosis mínima de probiótico necesaria para conseguir un efecto terapéutico es de 10^6 - 10^9 ufc (no específica, aunque se sobreentiende, que se trata de ufc/g). Crittenden (2009) recuerda que según las entidades asesoras y reguladoras generalmente se estipula que los alimentos que contienen organismos probióticos necesitan contener $>10^6$ - 10^7 ufc/g en el momento de su consumo. Varias encuestas desarrolladas para validar la viabilidad de estos microorganismos señalan que se ha demostrado una población baja de bacterias probióticas en alimentos (Masco, 2005).

Se han citado varios factores como responsables de la pérdida de la viabilidad de los organismos probióticos: acidez del producto, ácido producido durante el periodo de almacenamiento en refrigeración, nivel de oxígeno en el producto, permeabilidad del oxígeno a través del envasado, sensibilidad a sustancias antimicrobianas producidas por bacterias del yogur, y carencia de nutrientes en la leche (Dave y Shah, 1997).

La habilidad de los microorganismos para crecer y sobrevivir depende principalmente de su capacidad para adaptarse a los cambios ambientales. La adaptación al medio ambiente adverso está usualmente asociada con la inducción de un gran número de genes, la síntesis de proteínas en respuesta al estrés, y el desarrollo de resistencia a factores estresantes (Girgis y col., 2003). Sobre la base de estos conocimientos, recientemente se ha investigado sobre los métodos que permitan aumentar la supervivencia a largo plazo de los lactobacilos y

bifidobacterias de forma que se disminuyan los efectos letales del entorno estresante y las condiciones del proceso, con el fin de potenciar su resistencia a estos efectos durante la producción, almacenamiento o digestión (Doleyres, 2005).

4.7.2. Tolerancia al ácido y a la bilis

Para que una bacteria probiótica pueda desarrollar su acción, debe sobrevivir al paso a través del tracto intestinal, donde se encontrará con una cantidad significativa de los ácidos biliares, que son producto del metabolismo del colesterol en el hígado y desempeñan un papel importante en el proceso digestivo. Los ácidos biliares son detergentes biológicos que interrumpen la estructura de la bicapa lipídica de las membranas celulares, y causan daño oxidativo al ADN (Lee y col., 2004; Han y col., 2005).

Por ello, otro de los criterios importantes para la selección es su habilidad para sobrevivir en el medio ambiente ácido del producto y del estómago, donde el pH puede alcanzar valores tan bajos como 1'5. Similarmente, el microorganismo debe ser capaz de sobrevivir a las concentraciones de bilis usualmente encontradas en el intestino. Conway y col. (1987) utilizaron jugo gástrico obtenido de humanos voluntarios para demostrar que cepas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* son extremadamente sensibles, mientras que otras especies entéricas de lactobacilos son más resistentes, con variaciones significativas de cepa a cepa.

Lankaputhra y Shah (1995) muestran que, entre varias cepas estudiadas de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* spp., solamente algunas

sobreviven bajo las condiciones ácidas y concentraciones de bilis encontradas normalmente en productos fermentados y en el tracto gastrointestinal. De manera que no puede generalizarse que todas las cepas probióticas son tolerantes al ácido y a la bilis. Debe considerarse de manera especial, por tanto, la selección de la cepa sobre la base de estos atributos.

4.7.3. Antagonismo entre bacterias

L. acidophilus y *L. casei* producen ácido láctico como principal producto final de fermentación. Las bifidobacterias producen ácido acético y láctico en razón 3:1. En adición al ácido láctico y acético, diversos organismos probióticos producen otros ácidos como el cítrico. Por otro lado, las bacterias acidolácticas también producen peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas como sustancias antimicrobianas. Estas sustancias inhibidoras crean un ambiente hostil para los microorganismos patógenos y de descomposición (Dave y Shah, 1997).

Asimismo, se ha determinado que las bacterias del yogur producen bacteriocinas contra bacterias probióticas y viceversa. *L. acidophilus* produce bacteriocinas contra varias cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. jugurti*, y *L. casei*. El yogur puede contener uno o más grupos de estos organismos, y la producción de bacteriocina por *L. acidophilus* puede por lo tanto afectar la viabilidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. casei*. Por ello antes de hacer cualquier combinación de bacterias probióticas y bacterias del yogur que vayan a utilizarse en un producto debe contrastarse su antagonismo (Dave y Shah, 1997).

4.7.4. Propiedad de adherencia

La adherencia es uno de los criterios más importantes en la selección de bacterias probióticas. El efecto beneficioso deseado solamente se produce si dichas bacterias son capaces de adherirse, colonizar y multiplicarse en el intestino. La habilidad de estas bacterias para adherirse al intestino aumentará su oportunidad de superar la competencia con bacterias no propias del intestino. De esta forma, la adherencia a la pared celular del intestino es un pre-requisito importante en la colonización del tracto gastrointestinal. Solo pocas especies de lactobacilos y bifidobacterias se adhieren adecuadamente (Bernet y col., 1993).

La adherencia proporciona una interacción con la superficie mucosa y facilita el contacto con los intestinos asociándose al tejido linfoide, el cual media los efectos inmunes locales y sistémicos. Por lo tanto, se cree que sólo los probióticos adherentes son efectivos para inducir efectos inmunológicos y estabilizar la barrera de la mucosa intestinal (Salminen y col., 1996). La adherencia también puede proporcionar medios de exclusión competitiva contra bacterias patógenas en el epitelio intestinal (Bernet y col., 1994).

4.7.5. Actividad proteolítica

Tradicionalmente el yogur se ha preparado utilizando *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como cultivos iniciadores. La relación simbiótica de ambos microorganismos está bien establecida debido a que el primero produce aminoácidos para el

segundo. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produce aminoácidos esenciales debido a su naturaleza proteolítica, y las dos bacterias crecen rápidamente (Dave y Shah, 1997).

Por otra parte, las bacterias del yogur crecen rápidamente a diferencia de otras como *L. acidophilus* y bifidobacterias las cuales lo hacen lentamente en leche debido a que carecen de actividad proteolítica de manera que es una práctica habitual agregar bacterias del yogur a productos probióticos para disminuir el tiempo de fermentación. El tiempo de fermentación de las bacterias del yogur es de aproximadamente 4 horas en comparación con las 24 necesarias con las bacterias probióticas. Como resultado, las bacterias del yogur son utilizadas como iniciador principal y la bacteria probiótica como complemento (Champagne, 2005).

Así, tenemos que es importante seleccionar la cepa basándonos en su actividad proteolítica. Las enzimas proteolíticas son necesarias para degradar la caseína de la leche a oligopéptidos, los cuales son degradados a aminoácidos. La leche no contiene suficiente aminoácidos libres y péptidos que permitan el crecimiento de bacterias lácticas, particularmente microorganismos exigentes tales como lactobacilos y bifidobacterias (Champagne, 2005).

4.7.6. Aspectos tecnológicos

Todos los alimentos probióticos deben ser seguros y tener buenas propiedades sensoriales. Asimismo, debe incluir una cepa probiótica específica en un nivel adecuado durante el periodo de almacenamiento. Antes que una cepa probiótica sea suministrada a los consumidores, debe

ser primero capaz de ser manipulada bajo condiciones industriales, sobrevivir y mantener su funcionalidad durante el almacenamiento en congelación o liofilización, y también en la matriz alimentaria en la cual se formula. Adicionalmente, debe poder ser incorporada en el alimento sin producir sabores o texturas desagradables. Los materiales de envasado y las condiciones bajo las cuales el producto va a ser almacenado, son aspectos importantes de la calidad del producto que contiene la bacteria probiótica (Saarela, 2000).

4.7.7. Identificación de la cepa

Un producto que contiene bacterias probióticas requiere, para ser fiable, la correcta identificación de la especie bacteriana utilizada y el anuncio sobre la etiqueta de la especie presente. Esto es considerado un aspecto importante debido a que hay autores que han demostrado que la identidad del microorganismo recuperado no siempre se corresponde con la información que señala la etiqueta del producto (Temmerman y col., 2003).

4.8. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730

Lactobacillus reuteri es una especie distintiva, que fue descrita por primera vez por Gerhard Reuter en 1980. Es una especie heterofermentativa que reside en el tracto gastrointestinal (GI) de humanos y animales y es considerada una de las pocas especies autóctonas en el hombre (Reuter, 2001). Los miembros de la especie tienen la habilidad de inhibir exitosamente el crecimiento de microorganismos patógenos de la superficie de la mucosa intestinal por una combinación de diferentes

mecanismos que incluyen excreción de ácido láctico y acético, así como otros ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, sustancias antimicrobianas y bacteriocinas, y al igual que otras bacterias acidolácticas es capaz de convertir la lactosa en ácido láctico (Casas y Dobrogosz, 2000; Spinler y col., 2008).

Se ha demostrado que los cultivos de *Lactobacillus reuteri*, durante su crecimiento aeróbico en presencia de glicerol, acumulan una gran cantidad de una bacteriocina de amplio espectro que ha sido llamado “reuterina”, la cual es un compuesto de bajo peso molecular soluble en agua (3-hidroxi-propionaldehído) capaz de inhibir el crecimiento de especies representantes de varios géneros bacterianos incluyendo *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Staphylococcus*, así como levaduras, hongos, protozoos y virus (Axelsson y col., 1989).

Spinler y col. (2008) compararon cuatro cepas de *L. reuteri* en relación a su habilidad para producir reuterina e inhibir el crecimiento de diferentes patógenos entéricos in vitro. La reuterina fue producida por cada una de las cuatro cepas, pero la magnitud de la producción de reuterina no se correlaciona directamente con la relativa habilidad de *L. reuteri* de suprimir la proliferación de patógenos entéricos. Señalan que factores antimicrobianos adicionales pueden ser producidos por el microorganismo, y estos múltiples factores pueden actuar sinérgicamente con la reuterina para inhibir los patógenos entéricos.

En líneas generales, la reuterina es excretada por *L. reuteri* durante su crecimiento aeróbico en presencia de glicerol (Talarico y col., 1988) y ambas condiciones están satisfechas en el intestino humano. Chung y col.

(1989) mostraron que la reuterina fue sintetizada bajo condiciones ambientales similares a aquellas que existen en el tracto gastrointestinal y que la síntesis de reuterina fue estimulada por contacto con otras bacterias que se encuentran en el intestino humano, tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium sporogenes* y *Pediococcus pentosaceus*.

Posteriormente, también se ha elucidado la estructura de otro compuesto producido por *L. reuteri* con propiedades antimicrobianas. Este compuesto ha sido llamado reuteriniclina, el cual ejerce un efecto inhibitorio sobre varias bacterias patógenas para el hombre (Ganzle y col., 2000). Por otra parte otros estudios han demostrado que *L. reuteri* ejerce una acción inhibitoria en el tracto gastrointestinal de patógenos, que incluyen a *Helicobacter pylori*, el cual está asociado con gastritis crónica, úlcera péptica y riesgo de cáncer gástrico; pero no afecta negativamente la biota normal benéfica (Johnson y col., 2003).

La cepa *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 es utilizada como probiótico en alimentos lácteos, siendo introducida por primera vez en dichos productos en el año 1991, en Suiza. Estos productos se han vendido en Estados Unidos, Finlandia, Japón, Corea, España, Portugal y Reino Unido. En el año 2000 se introdujeron en Estados Unidos tabletas masticables con *L. reuteri*. Posteriormente estas tabletas han sido introducidas en Europa, Suráfrica y Asia. Hasta la fecha, el equivalente de más de 200 millones de dosis de 10^8 UFC de *L. reuteri* ATCC 55730 han sido vendidas a través de varios productos (BioGaia internal market information), sin que se haya publicado ningún efecto clínico secundario. Se ha demostrado que

Lactobacillus reuteri ATCC 55730 es un verdadero probiótico, avalado por varios estudios clínicos (Connelly, 2004).

Lactobacillus reuteri ATCC 55730 no solamente tolera el pH reducido del estómago, sino que sobrevive mejor que otros lactobacilos directamente aislados del estómago humano (Johnson y col., 2003). Su adherencia a la mucosa intestinal (Casas y Dobrogosz, 2000) y el crecimiento en el sitio de acción son propiedades que han sido demostradas, por lo que la administración oral del microorganismo a través de alimentos garantiza que un probiótico vivo y activo entra al tracto gastrointestinal (Connelly, 2004).

Muchos ensayos clínicos documentan la seguridad y eficacia de *L. reuteri* ATCC 55730 en sujetos desde niños hasta a adultos. Los datos clínicos muestran que la administración del microorganismo reduce significativamente la incidencia y severidad de diarreas de diferente origen y reduce las infecciones gastrointestinales (Wolf y col., 1995; Ruiz y col., 1996; Guerrero y col., 1996; Shornikova y col., 1997; Karvonen y col., 2001). Las evidencias que están desvelándose sugieren que el efecto probiótico puede estar relacionado con su habilidad para modular el sistema inmune del tracto gastrointestinal (Connelly, 2004).

Casas y Dobrogosz (2000) describen numerosos estudios controlados sobre la seguridad de la colonización del intestino que se realizaron utilizando una variedad de animales de laboratorio, a los cuales se les administraron cepas de *L. reuteri* específicas de cada huésped. Tras sus exitosos resultados, se iniciaron ensayos clínicos en humanos empleando la cepa de *L. reuteri* ATCC 55730 SD2112 (conocido comercialmente como *Lactobacillus reuteri* Protectis).

L. reuteri se aisló de leche materna (Sinkiewicz y Ljunggren, 2008) y su seguridad ha sido probada, estando disponible comercialmente en diversas formulaciones (Dobrogosz y col., 2010). Células viables de *L. reuteri* han sido aisladas de cada tramo del tubo digestivo: cavidad oral, estómago, intestino delgado y colon, así como de heces y de la vagina (Reuter, 2001). Wolf y col. (1998), Connolly (2004) y Weizman y Alsheik (2006) informan sobre la seguridad clínica de la administración de células viables de *L. reuteri* ATCC 55730 en más de 600 individuos incluyendo bebés prematuros y recién nacidos a término, niños en edad preescolar y adultos, incluyendo adultos VIH positivos.

Connolly y col. (2005) informaron sobre la seguridad en la administración de células viables de cepas productoras de ácido DL-láctico en bebés (*L. reuteri* es una especie heterofermentativa productora de ácido DL-láctico) y describe un nuevo tipo de probiótico: una suspensión en aceite de células viables de *L. reuteri* ATCC 55730 capaz de suministrar en 5 gotas una dosis diaria de 10^8 ufc/ml a niños y bebés prematuros (Connolly, 2005). Por otro lado, Romeo y col. (2009) suministraron formulaciones en aceite de *L. reuteri* ATCC 55730 durante 28 días a niños prematuros en una investigación clínica prospectiva controlada con placebo. A estos bebés también se les suministraron suspensiones líquidas de *L. rhamnosus* GG con fines comparativos. Los resultados mostraron que ambas administraciones redujeron significativamente el número de bacterias y las infecciones por *Candida* en comparación con el placebo controlado de recién nacidos. Ambas cepas de probiótico mejoraron los síntomas gastrointestinales, aunque *L. reuteri* exhibió una mayor eficacia en este sentido.

Entre los principales ensayos clínicos ejecutados con *L. reuteri*, señalaremos los estudios controlados doble ciego placebo en adultos masculinos escogidos al azar realizado sobre la seguridad y tolerancia de la ingestión del microorganismo. La administración de *L. reuteri* (10^{11} ufc/g y día) durante 21 días aumentó significativamente los niveles en heces, comparado con el placebo, sin ningún efecto clínico adverso (Wolf y col., 1998). También se han realizaron estudios en pacientes con HIV en los cuales se encontró un aumento en los niveles de *L. reuteri* sin apuntar problemas en este grupo de individuos (Wolf y col., 1998).

Igualmente, se han realizado estudios de seguridad y de prevención de diarrea en niños. Se han realizado estudios al azar doble ciego placebo controlado en los cuales se han examinado los efectos de *L. reuteri* sobre niños con diarrea infecciosa. En estos estudios se observó que, efectivamente, el microorganismo reduce la duración del episodio de diarrea (Shornikova y col., 1997). Otras investigaciones confirman la seguridad de suplementar las fórmulas infantiles con *L. reuteri* (Weizman y Alsheikh, 2003). Otro aspecto importante donde se ha evaluado la eficacia del microorganismo es sobre la incidencia de dermatitis atópica, debido a que la administración de corticoesteroides tópicos puede controlar los síntomas, pero su uso prolongado implica efectos secundarios como atrofia de la piel, por lo que se ha evaluado su efecto en este tipo de patología y se ha concluido que hay una mejoría moderada de la severidad clínica del eczema (Rosenfeldt y col., 2003).

De igual forma, estudios clínicos han investigado el efecto de *L. reuteri* sobre los disturbios producidos después de la triple terapia anti-*Helicobacter* en la microbiota intestinal (Plummer y col., 2005). Al respecto, Myllyluoma y col. (2007) señalan que la terapia de erradicación de *H. pylori*

tiene efectos perjudiciales sobre la microbiota intestinal. Los datos sugieren que la suplementación oral con *L. reuteri* durante 3 semanas después de la triple terapia (claritromicina, amoxicilina y lansoprazole) puede disminuir ligeramente los disturbios microbianos.

Imase y col. (2007) investigaron si la prueba de aliento de urea (UBT) podría utilizarse como un marcador de carga de la infección por *H. pylori* y determinar si la administración de comprimidos masticables de *L. reuteri* podría suprimir la infección. En los resultados de este estudio se concluyó que la administración de *L. reuteri* disminuyó significativamente los valores UBT en sujetos positivos de *H. pylori*, demostrando que *L. reuteri* inhibe la densidad de *H. pylori*.

Francavilla y col. (2008) realizaron un estudio prospectivo doble ciego y controlado con placebo en 40 adultos dispépticos infectados con *H. pylori*. Se concluyó que *L. reuteri* suprime eficazmente la infección por *H. pylori* y reduce la aparición de síntomas de dispepsia, particularmente la distensión abdominal, defecación anormal y gas. *L. reuteri* no afecta o interfiere con el tratamiento antibiótico de la infección.

4.9. Cereales y alimentos funcionales

Los cereales ofrecen una alternativa para la producción de alimentos funcionales. Los múltiples efectos beneficiosos de los cereales pueden ser explotados en diferentes formas para el diseño de nuevos alimentos o ingredientes a base de cereales que se dirigen a poblaciones específicas, pudiendo ser utilizados como sustratos fermentables para el crecimiento de microorganismos probióticos.

Los principales parámetros que deben considerarse son la composición y procesamiento de los cereales, la formulación del producto, la capacidad de crecimiento y productividad del cultivo, la estabilidad de la cepa probiótica durante el almacenamiento, las propiedades organolépticas, y el valor nutricional del producto final (Charalampopoulos y col., 2002). Además, los cereales pueden servir como fuente de carbohidratos no digestibles que, además de promover varios beneficios fisiológicos, también pueden selectivamente estimular el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias que estén presentes en el colon y actuar como prebióticos (Charalampopoulos, 2009).

Durante la fermentación de los cereales se forman varios compuestos volátiles que contribuyen a una compleja mezcla de sabores (Chavan y Kadam, 1989). Por último, el almidón de los cereales puede ser utilizado como material para la encapsulación de microorganismos probióticos a fin de mejorar su estabilidad durante el almacenamiento y su viabilidad durante su paso por las condiciones adversas del tracto gastrointestinal. Podría concluirse que los alimentos funcionales a base de cereales constituyen una perspectiva desafiante. Sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías de procesamiento de cereales que mejoren su potencial en salud y la aceptabilidad de los productos alimentarios son de importancia primordial.

4.9.1. Valor nutritivo

La fermentación láctica mejora normalmente el valor nutricional y la digestibilidad de los cereales. Los cereales son deficientes en algunos aminoácidos esenciales como treonina, lisina y triptófano, por lo que la

calidad de su proteína es pobre en comparación con los alimentos de origen animal (Chavan y col., 1988). También la digestibilidad de sus proteínas es inferior a los alimentos de origen animal, debido parcialmente a la presencia de ácido fítico, taninos y polifenoles que se unen a proteínas haciéndolos indigestos (Oyewole, 1997). La fermentación láctica de diferentes cereales tales como maíz, sorgo o mijo, se ha encontrado eficaz para reducir la cantidad de ácido fítico, taninos y mejorar la disponibilidad de proteínas (Chavan y col., 1989; Lorri y Svanberg, 1993).

4.9.2. Avena

Entre los cereales, el interés de la avena ha aumentado en los últimos años como un ingrediente alimentario debido a los diferentes tipos de fibra dietética, tales como β -glucano, arabinosilanos y celulosa, además de su contenido de proteínas, lípidos (ácidos grasos insaturados), vitaminas, antioxidantes y compuestos fenólicos (Peterson, 2001; Lambo y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que los β -glucanos son eficaces para disminuir el colesterol en plasma y el nivel de glucosa postprandial en suero. Los niveles de concentración de colesterol séricos elevados están fuertemente asociados con un mayor riesgo de cardiopatía isquémica (Rosengren y col., 1997). Además, el β -glucano es fermentado por la microbiota intestinal que provoca la formación de ácidos grasos de cadena corta que son protectores de la mucosa del colon (Lazaridou y col., 2003).

Marklinder y Lönnér (1992) propusieron el uso potencial de una sopa de avena fermentada con bacterias ácido lácticas viables como base de una solución enteral nutritiva. Después de probar varios lactobacilos probióticos heterofermentativos y homofermentativos, se concluyó que la

avena es en general un sustrato adecuado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas, independientemente de las diferencias entre especies y variedades. Martensson y col. (2000) evaluaron la supervivencia de dos cepas de lactobacilos y una bifidobacteria en tres productos con diferente composición de carbohidratos y mostraron que este producto puede soportar el crecimiento de estas bacterias y mantener una elevada viabilidad celular.

4.10. Leguminosas

El valor nutritivo de las legumbres está ganando considerable interés en los países desarrollados debido a la demanda de alimentos saludables. Los granos de leguminosas son una buena fuente de proteínas, minerales y carbohidratos disponibles. Además son ricas en fibra y bajas en grasa (Tharanathan y Mahadevamma, 2003). Contienen una cantidad adecuada de lisina (de la que los cereales suelen ser deficientes), aunque su contenido en aminoácidos con azufre (cistina, cisteína, etc.) es menor (Farzana y Khalil, 1999). Las semillas más comunes tales como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), las lentejas (*Lens culinaris*), las arvejas (*Pisum sativum*), el garbanzos (*Cicer arietinum*) y las habas o frijoles faba (*Vicia faba*) son las leguminosas que más se consumen en toda España.

En Europa, el consumo de leguminosas ha aumentado en la última década (un promedio de 3.9 kg/cápita por año), con diferencias entre los países: España, Grecia y Portugal (6 kg/cápita por año) (Aguilera y col., 2009). A pesar de ser fuente de proteínas y otros nutrientes el consumo de leguminosas está algo limitado debido a algunos problemas de digestión que provoca, los cuales están asociados a componentes tales como

taninos, fitatos, inhibidores de proteasa y amilasa, lecitinas, y a la presencia de oligosacáridos, como rafinosa, estaquiosa, y verbascosa (Yamaguishi y col., 2009).

Se ha informado que los taninos inhiben las enzimas digestivas y así disminuyen la digestibilidad de otros nutrientes, especialmente proteínas y carbohidratos (Reddy y col., 1985). El ácido fítico se une a micronutrientes esenciales, como el Fe y Zn en las semillas y también forma complejos con micronutrientes de otros alimentos durante la digestión intestinal. Estos complejos de sales de fitato no son absorbidos a través de la mucosa intestinal ocasionando una baja biodisponibilidad de minerales (Phillippy, 2003; Thavarajah y col., 2010). Sin embargo, también parece que el ácido fítico proporciona efectos positivos para la salud con la ingesta óptima de micronutrientes (Konietzny y Greiner, 2003).

Los inhibidores de tripsina reducen la digestión y absorción de proteínas (Norton, 1991). Además, los oligosacáridos presentes en las leguminosas producen flatulencias (H_2 , CO_2 y CH_4), dolor abdominal y diarrea. La problemática digestibilidad de estos azúcares en el intestino es atribuida a una falta de α -galactosidasa, que es esencial para la hidrólisis de las uniones 1,6. Yamaguishi y col. (2009) señalan en su estudio que mediante la fermentación ácido láctica utilizando cepas seleccionadas de lactobacilos productores de α -galactosidasa se logró el agotamiento de estaquiosa y otros azúcares después de 18 horas de fermentación y la población bacteriana aumentó de $2.4 \cdot 10^7$ a $7.0 \cdot 10^8$ UFC/ml.

Por todas estas razones, es necesario aplicar ciertos procesos para eliminar o reducir estos componentes no deseados. Dentro de los tratamientos aplicados con el propósito de aumentar la utilización de las

leguminosas se incluye una amplia variedad de técnicas de procesamiento tales como: remojo, hervido, esterilización, radiación, cocción, microondas, germinación, fermentación, suplementos con diversas sustancias químicas, enzimas y extrusión. Todas estas técnicas permiten disminuir estos factores antinutricionales y mejorar su calidad nutricional (Fernández y col., 1997; Alonso y col., 1998; Alonso y col., 2000; Khattab y Arntfield, 2009).

4.10.1. El quinchoncho (*Cajanus cajan*)

Las leguminosas son especies ampliamente cultivadas en todo el mundo cuya importancia dietética y económica es globalmente apreciada y reconocida. *Cajanus cajan* (L.) Mills es una de las leguminosas más importantes cultivadas en Asia y África. Además, es comercialmente importante en países tropicales del este de África, el Caribe y Latinoamérica.

Las semillas de quinchoncho contienen un 18-20% de proteína en base seca, constituida en un 60-70% por globulinas. El perfil de aminoácidos del quinchoncho es similar al de la soja, presentando niveles altos de lisina (escaso en cereales) y bajos de metionina y triptófano. Esta especie es también rica en carbohidratos, vitaminas del grupo B, y ciertos minerales, calcio y hierro. La cubierta de la semilla contiene ciertos factores antinutricionales, como proteasas y polifenoles. Por otra parte, es de fácil producción en muchas zonas marginales y su cultivo se efectúa normalmente en pequeñas parcelas con fines de autoconsumo. (Amarteifio y col., 2002).

Además, el quinchoncho (*Cajanus cajan*) es una leguminosa considerada de alta calidad nutricional por sus constituyentes químicos, aminoácidos y digestibilidad. Constituye una de las cosechas más importantes ocupando el quinto lugar dentro de las legumbres comestibles del mundo. Solamente India contribuye con más del 90% de la producción de quinchoncho del mundo (Duhan, 2002).

Los contenidos de proteína cruda, grasa y ceniza en algunos cultivos de alto rendimiento varían entre 22,8-25,5, 1,3-2,1 y 2,8-3,5g/100g, respectivamente. En relación a su contenido de azúcares solubles totales, azúcares reductores, azúcares no reductores, almidón y carbohidratos totales en diferentes cultivos de quinchoncho, varían entre 6,71-6,92 g, 1,21-1,28 mg, 5,43-5,71 g, 51,23-51,60 g y 57,4-58,1g/100g sobre materia seca, respectivamente (Duhan, 2002).

En líneas generales, el quinchoncho está recibiendo atención especial a nivel mundial por su alto rendimiento en grano, adaptación a diversas condiciones climáticas, gran capacidad como fijador de nitrógeno atmosférico, excelente calidad culinaria como grano verde y por ser también industrializable. En Venezuela, el quinchoncho se encuentra distribuido en todo el territorio nacional, incluyendo la costa, los llanos y los Andes, y se cultiva desde el nivel del mar hasta 3000m de altura. En la actualidad, este cultivo juega un papel importante en el autoabastecimiento de las familias campesinas del país y se puede considerar como una excelente alternativa para enfrentar el hambre que avanza con el rápido crecimiento de la población en los países en vías de desarrollo.

El suministro de una cantidad adecuada de proteína de origen animal es difícil y costoso. En este sentido una alternativa para mejorar el estatus nutricional de las personas con bajo poder adquisitivo es suplementar la dieta con proteínas vegetales tales como leguminosas y cereales (Amjad y col., 2006). Las legumbres son una fuente de proteína de bajo costo con características deseables tales como abundancia de hidratos de carbono, capacidad de disminuir los niveles de colesterol en sangre, elevada cantidad de fibra, baja en grasa (excepto las semillas oleaginosas) y concentración de ácidos grasos poliinsaturados.

Además de aportar vitaminas del complejo B, minerales y fibra, las legumbres son también importantes fuentes de proteínas y calorías (Rockland y Nishi, 1979). Las semillas de leguminosas ofrecen ventajas de costo sobre las proteínas de origen animal en la nutrición humana, particularmente en países donde la proteína animal es costosa y la oferta es insuficiente (Nestec, 1987). El quinchoncho más que cualquier otra leguminosa que se adapte a la región es único ya que combina un perfil nutricional óptimo, alta tolerancia a las presiones ambientales, alta productividad y nutrientes para el suelo (Achieng, 2007).

4.11. Plasma de bovino

El sacrificio de los animales produce una cantidad considerable de subproductos de alto valor biológico. Entre ellos, uno de los más importantes es la sangre (Silva, 2003). La sangre animal que se produce durante el sacrificio es una no suficientemente evaluada fuente de proteína que tiene muchas posibilidades para ser utilizada en la industria de alimentos. Las proteínas de la sangre son agregadas como

emulsificadores, estabilizadores, para clarificar, o como componente nutricional para aumentar las propiedades de los alimentos, así como suplemento de lisina.

Cuando es utilizada en productos que no son para consumo humano, la sangre es simplemente secada y mezclada con comida. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de la sangre obtenida del sacrificio de animales es utilizada de esta forma, y la mayoría de ella es liberada al medio ambiente, lo que ocasiona graves problemas de contaminación ambiental (Hyun y Shin, 1998). Uno de los desafíos que enfrentan los científicos de alimentos en este área es encontrar una manera de utilizar la sangre transformándola en un ingrediente alimentario, que podría contribuir a mejorar las propiedades funcionales y nutritivas de los productos industrializados, especialmente los productos cárnicos, además de reducir la contaminación ambiental (Silva, 2003; Rodríguez y col., 2011).

Las proteínas del plasma contienen una mezcla compleja de proteínas, de las cuales la albúmina, globulinas y el fibrinógeno son las más importantes. La albúmina y las globulinas son proteínas globulares que representan alrededor del 60 y 40%, respectivamente, de la proteína plasmática total. El fibrinógeno es una proteína fibrosa que representa alrededor del 3-4% de las proteínas del plasma de la sangre (Putnam, 1987). El plasma sanguíneo se obtiene por una simple centrifugación de la sangre completa y no presenta ningún problema relacionado con su color o sabor (Ockerman y Hansen, 2000).

De manera general, las proteínas del plasma sanguíneo se han usado de manera generalizada debido a sus propiedades nutricionales y

funcionales (Tybor y Dill, 1975; Márquez y col., 1997; Viviane y col., 2003; Del Hoyo y col., 2008; Herrero y col., 2009; Rodríguez y col., 2010). Por otro lado, la literatura aporta varias aplicaciones del plasma en alimentos. El plasma se ha incorporado a varios productos tales como galletas, pasta, productos cárnicos, *films* a base de proteínas, medios de cultivo para lactobacilos (Barboza y col., 1997; Yousif y col., 2003; Viana y col., 2005; Benítez y col., 2008; Rodríguez y col., 2011; Salgado y col., 2011). Otros autores han investigado el uso del plasma como sustituto de la clara de huevo en la preparación de tortas, sopas y como fortificante de panes (Viviane y col., 2003; Dávila y col., 2007; Del Hoyo y col., 2008).

La evaluación de la capacidad de las proteínas del plasma de formar o estabilizar emulsiones es altamente importante desde el punto de vista industrial dado que la elaboración de diversos productos como mayonesa, patés o salchichas involucra un proceso de emulsificación (Silva y Silvestre, 2003). Una de sus principales capacidades funcionales es producir y estabilizar espumas, así como la formación geles por efecto del calor (Pares y col., 1998; Cofrades y col., 2000; Pietrasik y col., 2007). Esta propiedad es muy interesante debido a que muchos productos alimenticios, como los productos cárnicos cocidos, pasan por un tratamiento térmico antes de ser comercializados. Bajo condiciones apropiadas se forma una red tridimensional que contribuye al desarrollo de la estructura interna en los alimentos, y suponiendo una textura deseable y una mejora de la capacidad de retención de agua (Hermansson, 1982).

5. Material y métodos

5.1. Material y métodos empleados en el desarrollo de un alimento funcional potencial preparado con quinchoncho (*Cajanus cajan*), avena y *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730

5.1.1. Diseño experimental y formulaciones

Se desarrollaron una serie de formulaciones para determinar la factibilidad de utilizar un cultivo de *L. reuteri* como ingrediente funcional en la preparación de productos tipo crema para untar a base de quinchoncho y avena. Se prepararon un total de 432 muestras (72 de cada fórmula preparadas cada 15 días durante 3 meses). En este estudio se formularon 4 unidades de análisis o formulaciones (A, B, C, D); la formulación A fue elaborado con 40% de quinchoncho, 20% de hojuela de avena y *Lactobacillus reuteri*; la fórmula B se elaboró con un 60% de quinchoncho y *L. reuteri*; la C fue elaborada con 60% de avena y *L. reuteri* y la D (control) se elaboró utilizando los mismos porcentajes de la fórmula A pero sin la incorporación de *L. reuteri*. El resto de los ingredientes, crema de ajonjolí (8%), azúcar (1%), sal (1%) y agua (30%) fueron agregados en igual proporción a todas las fórmulas (Tabla 2).

Tabla 2. Ingredientes utilizados para formular las cremas (g/100 g)

Ingredientes	Formulaciones			
	A	B	C	D
Quinchoncho	40	60	-	40
Avena	20	-	60	20
Crema de ajonjolí	8	8	8	8
Azúcar	1	1	1	1
Sal	1	1	1	1
Agua	30	30	30	30
<i>Lactabacillus reuteri</i>	1	1	1	-

5.1.2. Obtención de la materia prima

El quinchoncho (*Cajanus cajan* L. Millsp) variedad *Táchira* fue suministrado por el Laboratorio de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, Venezuela, el cual es cultivado en la granja Ana María Campos perteneciente a dicha Facultad. Las semillas fueron transportadas al laboratorio en bolsas herméticas de polietileno y colocadas en un lugar seco a temperatura ambiente antes de utilizarlas. La avena en hojuelas fue comprada en un supermercado de la localidad y la cepa de *L. reuteri* fue suministrada por el Laboratorio Biogacia Biologics, INC USA.

5.1.3. Elaboración de las distintas formulaciones

Los productos fueron elaborados utilizando los siguientes procedimientos:

El quinchoncho se selecciona, pesa, lava y mantiene en remojo en un periodo de 12 h antes de ser procesado y cocinado. La cantidad de agua para el remojo fue tres veces el peso de las semillas. Las semillas se cocinaron hasta que estuvieron suaves. Para obtener los productos finales, los ingredientes de cada fórmula fueron mezclados durante 5 minutos en un procesador de alimentos (OSTER™).

Las mezclas fueron separadas en porciones de 130g y depositadas en recipientes de vidrio cerrados identificados con el tratamiento correspondiente. Éstos fueron posteriormente colocados en autoclave a 121°C durante 15 min. Las fórmulas A, B y C fueron inoculadas con la suspensión bacteriana (ver condiciones de cultivo) y dejadas a temperatura ambiente durante 6 horas para favorecer su crecimiento antes de ser refrigeradas a 4°C durante 1, 7, 14, 21 y 28 días.

5.1.4. Condiciones del cultivo

Como hemos mencionado, el microorganismo utilizado en este estudio ha sido la cepa de *Lactobacillus reuteri* SD2112 ATCC 55730 suministrada por Biogaia Biologics INC USA. La cepa se mantuvo refrigerada a 4°C. Para propagarla se inoculó en caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) y se incubó durante 18-24 horas a 37°C en condiciones microaerófilas en jarra de anaerobiosis (Gas Pak, Oxoid) con 10% CO₂, para luego sembrarla en agar MRS y contrastar su pureza. Las

colonias aisladas fueron precultivadas dos veces en caldo durante aproximadamente 12 h a 37°C. Posteriormente se centrifugaron (5000 x g, 10 min. a 4°C) y se lavaron 2 veces con solución fisiológica estéril. La suspensión bacteriana fue entonces utilizada para inocular las cremas en un 1% (v/v). La concentración microbiana inicial fue aproximadamente de 7 log ufc/ml.

5.1.5. Determinación de *L. reuteri*

La viabilidad de *L. reuteri* fue determinada durante el periodo de almacenamiento (1, 7, 14, 21 y 28 días). Para ello, once gramos de cada muestra fueron pesados asépticamente en jarra estéril. Las muestras fueron homogeneizadas 2 minutos después de la adición de 99ml de agua peptonada al 0,1% (Oxoid). Del homogeneizado se prepararon las siguientes diluciones seriadas con el mismo diluyente. Alícuotas de cada dilución se sembraron por duplicado en agar MRS e incubadas a 37°C durante 48 h en las condiciones mencionadas anteriormente. Se realizó el recuento colonias (ufc/g) y los resultados fueron expresados como log ufc/g.

5.1.6. Análisis físico-químicos

Se determinó por triplicado el contenido de proteínas, grasa, fibra, humedad y cenizas del producto final de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC (2000).

5.1.6.1. Proteínas

Fundamento: La determinación de proteínas se realizó por el Método Macro de Kjeldahl de la Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2000). Este método se fundamenta en la oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, el cual digiere la materia convirtiéndola en dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O).

Método analítico: Se pesó 1g de muestra de cada formulación y se colocó en un balón de digestión de Kjeldahl; se adicionaron 10 g de mezcla catalizadora, 25 ml de H_2SO_4 concentrado y perlas de vidrio (para evitar la excesiva formación de espuma). Posteriormente se colocó el balón en posición inclinada en el digestor eléctrico, ubicado en la campana de gases del laboratorio; se aumentó la temperatura al máximo ($450^\circ C$) y se mantuvo en ebullición; el balón se rotaba cada media hora hasta que la solución se aclaraba presentando un color azul transparente.

La digestión de la muestra tuvo una duración de, aproximadamente, 5 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se trasvasó a un balón de 100 ml aforado con agua destilada. A continuación se tomaron 10 ml de la solución digerida, la cual fue destilada con 9'5 ml de tiosulfato de sodio, hasta recoger aproximadamente 50ml en un matraz Erlenmeyer previamente preparado con 5 ml de ácido bórico y 5 gotas de indicador mixto. Por último se procedió a titular la muestra con HCl 0'02N hasta obtener una coloración violeta; de esta forma se contabilizaba la cantidad de HCl utilizado. Finalmente se calcularon los porcentajes de nitrógeno y proteínas totales con un factor de 6'25 aplicando la fórmula correspondiente:

Cálculos:

$$\% N = \frac{\text{ml de HCl} \times N' \times E \times FC}{\text{Peso muestra (g)}} \times 100$$

donde:

% N: Porcentaje de nitrógeno

ml: ml de HCl 0.02 N empleados en titular la muestra.

N: Normalidad del ácido clorhídrico (0.02 N)

E: Peso equivalente del nitrógeno (14)

Fc: Factor de corrección del HCl

Conversión a proteína cruda (PC): % PC = N x 6'25.

5.1.6.2. Grasas

Fundamento: Las grasas se determinaron mediante el método de extracto etéreo descrito por la AOAC (2000), cuyo fundamento se basa en extraer la grasa con éter y proceder a evaporarlo continuamente. El éter, al pasar a través de la muestra, extrae los materiales solubles. El extracto se deposita en un recipiente y al completarse el proceso se recupera en un rotavapor y se recolecta en un nuevo recipiente. La grasa cruda que queda, se seca y se pesa.

Método analítico: Se pesaron 30g de la muestra en una cápsula previamente secada y pesada, la cual fue llevada a la estufa (Lab-line instruments INC Modelo No 3516M) a una temperatura de 95-105°C; seguidamente se pesaron 4g de la muestra desecada y se colocaron en un dedal de extracción. Posteriormente se llevó a la cámara de extracción del aparato de Soxhlet. Independientemente, se introdujeron 120 ml de éter de petróleo en un balón de destilación, calentándose a una temperatura de 60-70°C durante varias horas hasta lograr que la muestra se agotara. Se retiró el balón y se conectó a un destilador corriente hasta

evaporar la mayor parte del solvente; seguidamente se llevó a la estufa a 100°C evaporando hasta sequedad. Finalmente se dejó enfriar el balón en un desecador, se pesó y se calculó el porcentaje de grasa cruda en la muestra por diferencia.

$$\% \text{ Grasa total} = \frac{\text{EE} \times 100}{a \times \% \text{MS}}$$

donde:

EE= Peso del extracto etéreo

a= Gramos de la muestra

%MS= Porcentaje de materia seca

5.1.6.3. Determinación de fibra cruda

Fundamento: La determinación de fibra cruda se realizó utilizando la Digestión Ácida y Alcalina (AOAC, 2000), cuyo fundamento consiste en obtener una muestra libre de humedad y grasa que se digiere primero con una solución de ácido débil y luego con una solución de base débil. Los residuos orgánicos restantes se recogen en un crisol de filtro. La pérdida de peso después de quemar la muestra es la que se denomina muestra cruda. Para esta técnica se utilizaron los siguientes reactivos: Solución de ácido sulfúrico 0'255 N, Solución de hidróxido de sodio 0'313 N, Alcohol etílico, 2-octanol.

Método analítico: Se tomaron 3-4g de la muestra y se llevaron a un embudo de filtración. Posteriormente, se lavaron con éter de petróleo con el fin de desengrasarla por completo. A continuación se dejó desecar la muestra en la estufa. La muestra fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 600 ml y se le adicionaron 150 ml de solución de H₂SO₄ 0,255N. La muestra se dejó digerir 30 minutos. Seguidamente se retiró el Erlenmeyer para luego filtrar al vacío la solución, a través de un crisol de Gooch. Posteriormente se

transfirió el material proveniente de la filtración ácida sobre el crisol de filtración. Seguidamente, el Erlenmeyer con el residuo se lavó con 150 ml de NaOH 0,313N para continuar la digestión alcalina; a continuación se llevó al sistema de calentamiento durante 30 minutos y se filtró al vacío a través del crisol de Gooch. Posteriormente se lavó el Erlenmeyer y el residuo con agua caliente y 15 ml de alcohol etílico al 95% de concentración. El crisol fue llevado a la estufa a 110°C durante 4h y luego a la mufla (Lindberg, SIB.59344) durante una hora a 600°C. Finalmente se dejó enfriar en un desecador, se pesó y por último se calculó por diferencia el peso de fibra cruda contenida en la muestra.

$$\%FC = \frac{\text{Peso de la muestra incinerada}}{\text{Peso de la muestra húmeda}}$$

donde %FC= Porcentaje de fibra cruda

5.1.6.4. Humedad

Fundamento: La humedad fue determinada por medio del Método Gravimétrico Directo (AOAC, 2000). Este método se fundamenta en la evaporación del agua de una muestra de peso conocido, para luego pesar el residuo. Se realizó por desecación en estufa (LAB-line instruments INC modelo No 3516M) a presión normal y una temperatura de aproximadamente 100°C, para luego pesar el residuo seco remanente.

Método analítico: Se pesaron 5g de muestra en un crisol y se llevó a la estufa a 100±10°C, durante 4 horas. Posteriormente se procedió a colocar la muestra en un desecador, y se pesó en una balanza analítica (Modelo Mettler H80) hasta obtener peso constante. Finalmente se calculó el porcentaje total de la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MS} = \frac{\text{Peso de la muestra (g)}}{\text{Peso de la muestra seca (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ MS}$$

donde %MS = el porcentaje de materia seca o sólidos totales.

5.1.6.5. Cenizas

Fundamento: La determinación de las cenizas se realizó por medio del método gravimétrico en mufla (AOAC, 2000), cuyo fundamento se basa en la acción directa del calor, carbonizando primero o incinerando después los componentes orgánicos que integran los alimentos, quedando sin destruir las sustancias minerales o cenizas. Para ello se necesitó el perclorato de potasio u otro tipo de agente desecante.

Método analítico: Se pesaron 3g de la muestra en un crisol con tapa previamente tarado y colocada sobre una plancha de calentamiento entre 20 y 40°C, hasta que se carbonizara la muestra. Posteriormente el crisol de la muestra carbonizada se llevó de nuevo a la mufla a una temperatura de 500°C durante 5 horas hasta obtener cenizas libres de carbón. Finalmente el crisol se dejó enfriar y fue pesado nuevamente (en una balanza digital). Por diferencia de peso, se obtuvo la proporción de ceniza de la muestra.

5.1.6.6. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos disponible se determinó por diferencia, de la siguiente manera:

$100 - (\% \text{ de grasa} + \% \text{ proteína} + \% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas})$

5.1.6.7. Energía metabólica

Para la energía metabólica se utilizó el método empírico propuesto por Livesey (1995). Se multiplicó el porcentaje de carbohidratos y proteínas por 4'0 Kcal, y el porcentaje de grasa por 9 Kcal. La suma se multiplicó por el factor 0'9 para considerar la energía perdida en las heces.

5.1.6.8. Determinación del pH

Los valores de pH fueron determinados a los 0, 7, 14, 21 y 28 días utilizando un potenciómetro (Orion modelo 410A), calibrado con soluciones *buffer* suministradas por el mismo proveedor comercial.

5.1.7. Evaluación sensorial

En la evaluación sensorial participó un grupo de 115 panelistas no entrenados voluntarios pertenecientes a la Escuela de Nutrición y Dietética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, constituido por personal docente, administrativo y estudiantes. Para dicha evaluación se utilizó la escala hedónica no estructurada de nueve puntos (1= me gusta mucho y 9= me disgusta mucho), donde se midió el "Nivel de Agrado" de los productos. Las características organolépticas incluidas en esta evaluación fueron: color, sabor y textura.

Los productos fueron ofrecidos a los panelistas ubicados en puestos divididos en una bandeja de anime, con cuatro envases idénticos codificados con tres dígitos al azar los cuales contenían aproximadamente

20g de cada crema y los respectivos instrumentos necesarios para la degustación (servilletas, cuchillos, galletas de soda sin sal, vaso con agua). Los productos fueron ofrecidos los miércoles de cada semana en un horario comprendido de 3:00pm – 4:00pm. Antes de llevar a cabo la evaluación sensorial se les indicaban las instrucciones generales a los panelistas con la finalidad de facilitarles el trabajo. Se suministró agua con el fin de enjuagar el paladar entre cada muestra. Los datos fueron recogidos en el instrumento diseñado para tal fin.

5.1.8. Análisis estadístico

Para las variables físico-químicas y microbiológicas el diseño experimental aplicado fue Bloques al Azar, en el cual se espera que las comparaciones entre las formulaciones sean las mismas en los bloques elegidos aleatoriamente con los usados en el experimento o estudio. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) con el procedimiento PROC-GLM del SAS (1997).

Cuando los efectos resultaron ser significativos ($P < 0,05$) se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias entre tratamientos. Para el análisis estadístico de los resultados de la evaluación sensorial se utilizó la Prueba no Paramétrica de Kruskal – Wallis, prueba utilizada para medir las diferencias de variabilidad entre las cuatro formulaciones realizadas en cada uno de los aspectos a evaluar (color, sabor y textura).

5.2. Material y métodos empleados en la formulación y evaluación de panquecas de maíz preparadas con proteína plasmática de bovino y maíz tierno (Estudio 2)

5.2.1. Diseño experimental y formulaciones

La investigación se realizó en dos fases. Durante la primera fase, se desarrollaron una serie de formulaciones para determinar la factibilidad de utilizar proteína plasmática de bovino como ingrediente fortificante en la formulación de un producto con maíz tierno tipo panqueca y seleccionar aquella que permitiese agregar la mayor cantidad de plasma sin afectar el manejo tecnológico de la mezcla para obtener el producto.

La panqueca de maíz es un producto tradicional muy popular de Venezuela, elaborado a base de maíz tierno molido, agua, azúcar y sal. Se trata por calor a la plancha y se sirve con queso. Partiendo de este tipo de producto, en este estudio se formularon 6 unidades de análisis o formulaciones (A, B, C, D, E y F). La formulación A (control) fue elaborada con un 53,5% de maíz tierno sin agregado plasmático; la formulación B se realizó con un 65,5% de maíz tierno y un 30% de plasma; la formulación C tuvo un 58,5% de maíz tierno y un 35% de plasma; la formulación D, con un 53,5% de maíz tierno y un 40% de plasma; la formulación E contenía un 48,5% de maíz tierno y un 45% de plasma. Por último, la formulación F se realizó con un 43,5% de maíz tierno y un 50% de plasma. El resto de los ingredientes (azúcar, sal) fueron iguales para todas las formulaciones.

Durante la segunda fase, la formulación seleccionada fue la D ya que fue la que permitió la mayor adición de plasma (40%) sin afectar el manejo tecnológico de la mezcla para obtener el producto.

5.2.2. Obtención de la materia prima

La sangre de bovino fue obtenida de un matadero de la localidad (MASINCA Co) y fue recolectada en envases plásticos limpios que contenían 100 ml de una solución de citrato de sodio al 2% p/v por cada litro de sangre. Posteriormente fue transportada al Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Nutrición (LIDN), bajo condiciones de refrigeración (5°C), donde fue inmediatamente separada en sus fracciones plasma y paquete globular mediante centrifugación a 2500 x g durante 30 minutos en una centrifuga (International™ K N° 69984M23).

El maíz tierno (jojoto) fue adquirido en un supermercado de la localidad. Posteriormente fue deshojado y desgranado utilizando un cuchillo de acero inoxidable y colocado en conservadores plásticos tapados.

5.2.3. Proceso de elaboración

Los ingredientes utilizados en la preparación de las formulaciones A y D se muestran en la Tabla 3. El maíz tierno fue desgranado y mezclado en una licuadora industrial (Electromaster™) durante 1 min. A continuación se agregaron los demás ingredientes y se continuó mezclando durante 1 min. La mezcla fue separada en porciones de 100g y sometida a cocción durante 1 min, por cada lado, utilizando una sartén. El producto fue pesado antes y después de la cocción para medir su rendimiento y colocado en bolsas plásticas individuales.

Tabla 3. Formulación del tratamiento control y del producto a base de maíz tierno y proteína plasmática

Ingredientes	Formulación	
	A (%)*	D (%)*
Maíz Tierno (jojoto)	53,5	53,5
Agua	40	-
Plasma	-	40
Azúcar	6	6
Sal	0,5	0,5

* A: Control; D: Producto formulado con proteína plasmática

5.2.4. Rendimiento

El rendimiento de las panquecas de maíz fue determinado pesando seis unidades de cada lote y calculando el peso por diferencia de las panquecas antes y después de cocidas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso cocido}}{\text{Peso crudo}} \times 100$$

5.2.5. Análisis físico-químicos

Se determinó por triplicado el contenido de proteínas, grasa, fibra, humedad y cenizas del producto final de acuerdo a los métodos establecidos por la AOAC (2000).

5.2.5.1. Proteínas

Fundamento: La determinación de proteínas se realizó por el Método Macro de Kjeldahl (AOAC, 2000). Este método se fundamenta en la oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, el cual digiere la materia convirtiéndola en dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O).

Método analítico: Se pesó 1g de muestra de cada formulación y se colocó en un balón de digestión de Kjeldahl; se adicionaron 10 g de mezcla catalizadora, 25 ml de H_2SO_4 concentrado y perlas de vidrio (para evitar la excesiva formación de espuma). Posteriormente se colocó el balón en posición inclinada en el digestor eléctrico, ubicado en la campana de gases del laboratorio; se aumentó la temperatura al máximo ($450^\circ C$) y se mantuvo en ebullición; el balón se rotaba cada media hora hasta que la solución se aclaraba presentando un color azul transparente.

La digestión de la muestra tuvo una duración de, aproximadamente, 5 horas y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se trasvasó a un balón de 100 ml aforado con agua destilada. A continuación se tomaron 10 ml de la solución digerida, la cual fue destilada con 9'5 ml de tiosulfato de sodio, hasta recoger aproximadamente 50ml en un matraz Erlenmeyer previamente preparado con 5 ml de ácido bórico y 5 gotas de indicador mixto. Por último se procedió a titular la muestra con HCl 0'02N hasta obtener una coloración violeta; de esta forma se contabilizaba la cantidad de HCl utilizado. Finalmente se calcularon los porcentajes de nitrógeno y proteínas totales con un factor de 6'25 aplicando la fórmula correspondiente:

Cálculos:

$$\% N = \frac{\text{ml de HCl} \times N' \times E \times FC}{\text{Peso muestra (g)}} \times 100$$

donde:

% N: Porcentaje de nitrógeno

ml: ml de HCl 0,02 N empleados en titular la muestra.

N: Normalidad del ácido clorhídrico (0,02 N)

E: Peso equivalente del nitrógeno (14)

Fc: Factor de corrección del HCl

Conversión a proteína cruda (PC): % PC = N x 6'25.

5.2.5.2. Grasas

Fundamento: Las grasas se determinaron mediante el método de extracto etéreo descrito por la AOAC (2000), cuyo fundamento se basa en extraer la grasa con éter y proceder a evaporarlo continuamente. El éter, al pasar a través de la muestra, extrae los materiales solubles. El extracto se deposita en un recipiente y al completarse el proceso se recupera en un rotavapor y se recolecta en un nuevo recipiente. La grasa cruda que queda, se seca y se pesa.

Método analítico: Se pesaron 30g de la muestra en una cápsula previamente secada y pesada, la cual fue llevada a la estufa (Lab-line instruments INC Modelo No 3516M) a una temperatura de 95-105°C; seguidamente se pesaron 4g de la muestra desecada y se colocaron en un dedal de extracción. Posteriormente se llevó a la cámara de extracción del aparato de Soxhlet. Independientemente, se introdujeron 120 ml de éter de petróleo en un balón de destilación, calentándose a una temperatura de 60-70°C durante varias horas hasta lograr que la muestra

se agotara. Se retiró el balón y se conectó a un destilador corriente hasta evaporar la mayor parte del solvente; seguidamente se llevó a la estufa a 100°C evaporando hasta sequedad. Finalmente se dejó enfriar el balón en un desecador, se pesó y se calculó el porcentaje de grasa cruda en la muestra por diferencia.

$$\% \text{ Grasa total} = \frac{\text{EE} \times 100}{a \times \% \text{MS}} \quad \text{donde}$$

EE= Peso del extracto etéreo

a= Gramos de la muestra

%MS= Porcentaje de materia seca

5.2.5.3. Determinación de fibra cruda

Fundamento: La determinación de fibra cruda se realizó utilizando la Digestión Ácida y Alcalina (AOAC, 2000), cuyo fundamento es obtener una muestra libre de humedad y grasa que se digiere primero con una solución de ácido débil y luego con una solución de base débil. Los residuos orgánicos restantes se recogen en un crisol de filtro. La pérdida de peso después de quemar la muestra es la que se denomina muestra cruda. Para esta técnica se utilizaron los siguientes reactivos: Solución de ácido sulfúrico 0'255 N, Solución de hidróxido de sodio 0'313 N, Alcohol etílico, 2-octanol.

Método analítico: Se tomaron 3-4g de la muestra y se llevaron a un embudo de filtración. Posteriormente, se lavaron con éter de petróleo con el fin de desengrasarla por completo. A continuación se dejó desecar la muestra en la estufa. La muestra fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 600 ml y se le adicionaron 150 ml de solución de H₂SO₄ 0'255N. la muestra se dejó digerir 30 minutos. Seguidamente se retiró el Erlenmeyer para luego filtrar al vacío la solución, a través de un crisol de Gooch.

A continuación, se transfirió el material proveniente de la filtración ácida sobre el crisol de filtración. Seguidamente, el Erlenmeyer con el residuo se lavó con 150 ml de NaOH 0'313N para continuar la digestión alcalina; a continuación se llevó al sistema de calentamiento durante 30 minutos y se filtró al vacío a través del crisol de Gooch. Posteriormente se lavó el Erlenmeyer y el residuo con agua caliente y 15 ml de alcohol etílico al 95% de concentración. El crisol fue llevado a la estufa a 110°C durante 4h y posteriormente a la mufla durante una hora a 600°C. Finalmente se dejó enfriar en un desecador, se pesó y por último se calculó por diferencia el peso de fibra cruda contenida en la muestra.

$$\%FC = \frac{\text{Peso de la muestra incinerada}}{\text{Peso de la muestra húmeda}}$$

donde %FC= Porcentaje de fibra cruda

5.2.5.4. Humedad

Fundamento: La humedad fue determinada por medio del Método Gravimétrico Directo (AOAC, 2000); este método se fundamenta en la evaporación del agua de una muestra de peso conocido, para luego pesar el residuo. Se realizó por desecación en estufa a presión normal y una temperatura de aproximadamente 100°C, para luego pesar el residuo seco remanente.

Método analítico: Se pesaron 5g de muestra en un crisol y se llevó a la estufa a 100±10°C, durante 4 horas. Posteriormente se procedió a colocar la muestra en un desecador. Después se pesó en una balanza

analítica hasta obtener peso constante; y finalmente se calculó el porcentaje total de la muestra, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MS} = \frac{\text{Peso de la muestra (g)}}{\text{Peso de la muestra seca (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ MS}$$

donde $\% \text{MS}$ = el porcentaje de materia seca o sólidos totales.

5.2.5.5. Cenizas

Fundamento: La determinación de las cenizas se realizó por medio del método gravimétrico en mufla (AOAC, 2000), cuyo fundamento se basa en la acción directa del calor, carbonizando primero o incinerando después los componentes orgánicos que integran los alimentos, quedando sin destruir las sustancias minerales o cenizas. Para ello se necesitó el perclorato de potasio u otro tipo de agente desecante.

Método analítico: Se pesaron 3g de la muestra en un crisol con tapa previamente tarado y colocada sobre una plancha de calentamiento entre 20 y 40°C, hasta que se carbonizara la muestra. Posteriormente el crisol de la muestra carbonizada se llevó de nuevo a la mufla a una temperatura de 500°C durante 5 horas hasta obtener cenizas libres de carbón. Finalmente el crisol se dejó enfriar y fue pesado nuevamente (en una balanza digital). Por diferencia de peso, se obtuvo la proporción de ceniza de la muestra.

5.2.5.6. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos disponible se determinó por diferencia, de la siguiente manera:

$$100 - (\% \text{ de grasa} + \% \text{ proteína} + \% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas})$$

5.2.5.7. Energía metabólica

Para la energía metabólica se utilizó el método empírico propuesto por Livesey (1995). Se multiplicó el porcentaje de carbohidratos y proteínas por 4,0 Kcal, y el porcentaje de grasa por 9 Kcal. La suma se multiplicó por el factor 0'9 para considerar la energía perdida en las heces.

5.2.5.8. Determinación de aminoácidos

Para la determinación de aminoácidos la muestra fue hidrolizada a 120°C durante 4 horas con HCl 6N. Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para lo cual se utilizó un cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-6A.

Previo al análisis cromatográfico las muestras fueron sometidas a un proceso de hidrólisis ácida mediante el siguiente procedimiento: En tubos de hidrólisis químicamente limpios, se pesaron 0'25g de cada una de las arepas (proteica y control) para el análisis de aminos primarios y 0'75 g para la determinación de prolina e hidroxiprolina. Se le agregaron 20 ml y 30 ml de HCl 6N, respectivamente, y se mezclaron. El oxígeno de cada tubo fue desplazado mediante la utilización de nitrógeno gaseoso por espacio de dos minutos; se cerraron herméticamente y finalmente fueron

llevados a una estufa con temperatura de 12°C durante 22 horas, para que se produjera la hidrólisis total de las proteínas.

Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, cada muestra fue trasvasada a un recipiente de 100 ml de capacidad, y se le agregaron 20 ml (aminas primarias) y 30 ml (prolina e hidroxiprolina) de NaOH 6'0 N. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les ajustó el pH hasta 2'2. Posteriormente, cada muestra fue filtrada mediante la utilización de papel de filtro Whatman nº1. El filtrado fue recogido en un balón volumétrico de 100 ml de capacidad y aforado con una solución tampón de citrato 0'050M, pH 2'2. Cada muestra se filtró nuevamente mediante un filtro Millipore de 0'22 µm de diámetro del poro y el filtrado se recogió en recipientes de polietileno con tapa, químicamente limpios.

Como patrón de referencia para la determinación de aminas primarias se utilizó una mezcla de estándares preparados a partir de una solución madre comercial (Sigma Lab). La concentración final de cada aminoácido en el estándar fue de 50 nmol/l. para la determinación de prolina e hidroxiprolina se utilizó un estándar conteniendo estos dos aminoácidos a una concentración de 40 nmol/l. Tanto los hidrolizados como los estándares fueron congelados a -18°C, hasta su posterior análisis por HPLC.

5.2.6. Determinaciones microbiológicas

Para determinar el período de vida útil microbiológica del producto, se homogeneizaron 11g de cada una de las muestras durante 2 min después de la adición de 99ml de agua peptonada al 0'1%. A partir de estos homogeneizados se hicieron diluciones seriadas. A partir de dichas

diluciones, se realizaron las siembras por duplicado. Se usó la técnica Petrifilm 3M (St. Paul, Minn.) para el recuento de aerobios mesófilos, coliformes, *E. coli*, y hongos y levaduras. El procedimiento es el descrito por Medina y Jordano (2012).

5.2.7. Pruebas biológicas

La calidad proteica del producto a base de maíz tierno y proteína plasmática de bovino, se determinó utilizando el índice de Eficiencia Proteica (PER) y la Digestibilidad Aparente (DA), siguiendo la metodología propuesta por la AOAC (2000). Para ello se utilizaron 20 ratas machos de la raza Sprague Dawley recién destetadas, las cuales fueron divididas en 2 grupos de 10 animales y colocadas en jaulas individuales galvanizadas con piso de malla, bajo las mismas condiciones ambientales de temperatura, aire e iluminación (12 horas luz / 12 horas oscuridad). Antes de iniciar la investigación las ratas fueron sometidas a un período de aclimatación de 3 días. Un grupo fue alimentado con una dieta control, a base de caseína, y el otro grupo fue alimentado con la dieta experimental a base de maíz tierno y proteína plasmática, con 10% de proteína.

La dieta y el agua fueron proporcionadas *ad libitum*, controlando a diario la cantidad del alimento consumido, así como el peso de las ratas, peso de las heces y la cantidad en gramos de heces excretadas. Al alimento consumido y a las heces se les determinó el contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000). Los valores de nitrógeno obtenidos fueron convertidos en su equivalente a proteína ($N \times 6.25$).

La digestibilidad aparente se realizó durante los primeros diez días de la investigación, mientras que el PER se midió a los 28 días del ensayo.

5.2.8. Evaluación sensorial

Para evaluar el nivel de agrado de las formulaciones A y D se empleó como panel de degustación no entrenado una población infantil seleccionada al azar constituida por 215 niños de ambos sexos con edades comprendidas entre 10 y 14 años, provenientes del quinto y sexto grado de los turnos de la mañana y de la tarde de una escuela de la localidad. Los atributos sensoriales evaluados fueron "color" y "sabor".

Para ello, los productos fueron ofrecidos a los niños a una temperatura cálida, en envases plásticos blancos idénticos, en porción de 50g por niño. El producto fue suministrado una vez por día durante los cinco días de la semana a las 9:00 AM y 3:00 PM a cada sección del quinto y del sexto grado de ambos turnos. Para la degustación del producto, a cada niño se le orientó para que expresara su opinión en relación al color y sabor del mismo, recolectándose los datos en un instrumento diseñado adecuadamente para tal fin. La escala para la evaluación del producto fue:

- Me gusta mucho
- Me gusta
- Me es indiferente
- Me gusta poco
- No me gusta.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de aceptabilidad.

5.2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó utilizando un Modelo Mixto que incluyó el efecto fijo de tratamiento y el efecto aleatorio de la muestra no controlada en el experimento sobre las observaciones. Las diferencias entre medias fueron realizadas con prueba *t* de student. Para los análisis se utilizó el Procedimiento Mixeal del programa SAS PROC GLM.

6. Resultados y Discusión

6.1. Resultados y discusión relativos al desarrollo de un alimento funcional potencial preparado con quinchoncho (*Cajanus cajan*), avena y *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 (Estudio 1)

6.1.1. Composición química

Tabla 4. Composición química (g/100 g) de las diferentes cremas a base de quinchoncho y avena

Variables	Formulaciones*			
	A	B	C	D
Humedad	61,63 ± 1,02	61,18 ± 0,85	61,00 ± 0,98	61,53 ± 1,84
Proteínas	7,60 ± 0,28 ^b	8,19 ± 0,21 ^a	4,26 ± 0,25 ^c	7,58 ± 0,22 ^b
Grasa	8,06 ± 0,70 ^a	7,55 ± 0,55 ^b	9,38 ± 0,65 ^c	8,07 ± 0,59 ^a
Carbohidratos	21,24 ± 0,60 ^a	21,64 ± 0,83 ^a	23,94 ± 0,70 ^b	21,39 ± 0,69 ^a
Fibra	2,12 ± 0,35 ^b	2,86 ± 0,31 ^a	2,26 ± 0,32 ^b	2,14 ± 0,30 ^b
Cenizas	1,44 ± 0,31	1,44 ± 0,24	1,42 ± 0,19	1,43 ± 0,32
Calorías totales	185,62 ± 4,74 ^a	181,55 ± 5,53 ^a	197,04 ± 28 ^b	188,51 ± 4,36 ^a

^a, ^b, ^c Medias con diferentes superíndice dentro de una misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$)

* A: Avena y quinchoncho; B: Quinchoncho; C: Avena; D (Control) Avena y quinchoncho *S/L. reuteri*

La Tabla 4 muestra los valores promedios de humedad, proteína, grasa, carbohidratos disponibles, fibra, cenizas y calorías de las diferentes formulaciones. Como era previsible, los resultados de este estudio muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido proteico de las formulaciones. El producto formulado con quinchoncho resultó con mayor contenido de proteína $8,19 \pm 0,21$ (B) que el producto formulado con avena con un valor de $4,26 \pm 0,25$ (C) ($P < 0,05$), mientras que los tratamientos preparados con quinchoncho y avena presentaron valores intermedios ($7,60 \pm 0,28$ para la A y $7,58 \pm 0,20$ para la D). Estos resultados pueden deberse a que el tratamiento B fue preparado con mayor proporción de quinchoncho y en la formulación A el 20 % del quinchoncho fue sustituido por avena, mientras que en C sólo hay avena cuyo contenido proteico (9,6%) es menor.

La calidad de la proteína depende de la relación entre la cantidad y la calidad de los aminoácidos que la componen; de esta manera la combinación de cereales como la avena y leguminosa es muy provechosa, pues los aminoácidos de ambos tipos de alimentos se complementan para formar una proteína completa. Las leguminosas son ricas en lisina, leucina y arginina y pueden cubrir los requerimientos de los aminoácidos esenciales de la dieta excepto en el contenido de aminoácidos azufrados y triptófano.

Para mejorar esta deficiencia, éstos deben ser suplementados (Amjad y col., 2006). La avena tiene una baja proporción de proteínas y la calidad se halla limitada por la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales, sobre todo lisina (Amjad y col., 2003) y treonina, aunque tiene cantidades considerables de aminoácidos azufrados como metionina

(Pettersson, y col., 1996). Por ello, se puede mejorar la calidad proteica del quinchoncho, que es rico en lisina y deficiente en metionina, complementándolo con la avena. Se ha publicado un efecto sinérgico en la calidad de la proteína del quinchoncho y varios cereales. La incorporación de 15% de quinchoncho en dietas preparadas con varios cereales como maíz, trigo, arroz y cebada, que habían sido suministradas a ratas jóvenes, mejoraron el PER (Radio de Eficiencia Proteica) (Bressani, y col., 1986).

En relación a las grasas hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). El tratamiento C presentó mayor porcentaje de grasas que el A, B y D. Esto podría explicarse por la presencia de avena (7% de grasa), en comparación con los valores de grasa del quinchoncho, el cual aporta apenas entre 1,2 a 1,3%. El contenido de grasa, la concentración y tipo de proteína, azúcares y pH del producto son factores que podrían afectar el crecimiento y supervivencia del probiótico en el alimento. Por lo tanto, la formulación del producto puede ser manipulada para ayudar a su eficacia. Algunas cepas probióticas podrían variar en sus propiedades funcionales y tecnológicas en presencia de diferentes ingredientes (Ranadheera y col., 2010).

La utilización de mezclas de cereales y leguminosas proporciona un perfil nutricional superior, que incluye un óptimo patrón de aminoácidos. Sin embargo, la principal limitación en la utilización biológica de cereales y legumbres o sus mezclas es la presencia de elevadas cantidades de antinutrientes tales como ácido fítico, polifenoles, inhibidores de tripsina (Vidal-Valverde y col., 1993) y oligosacáridos productores de flatulencia (Singh, 1998). La fermentación con organismos probióticos es un proceso importante, que disminuye significativamente el contenido de

antinutrientes mejorando la digestibilidad (Sangeeta y Neelam, 2001; Khattab y Arntfield, 2009). También proporciona condiciones de pH óptimo para la degradación enzimática de los fitatos, que están presentes en los cereales en la forma de complejos con cationes polivalentes tales como hierro, zinc, calcio, magnesio y proteínas.

La disminución de estos fitatos puede aumentar la cantidad de hierro, zinc y calcio varias veces y por lo tanto mejorar el valor nutritivo de los granos (Chavan y Kadam, 1989). Así, si una mezcla alimenticia de cereales y leguminosas es fermentada con microorganismos probióticos puede no solamente mejorar el perfil de nutrientes sino ejercer efectos benéficos saludables.

Para las variables "humedad" y "cenizas" no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las formulaciones. Los valores promedios encontrados para humedad oscilaron entre $61,00\% \pm 0,98$ y $61,63\% \pm 1,02$, lo cual resulta evidente, ya que la cantidad de agua fue igual para los 4 tratamientos. En cuanto al contenido de carbohidratos y calorías hubo diferencias significativas para la formulación C. El tratamiento B presentó una mayor proporción de fibra ($P < 0,05$). Cabe destacar que la adición de *L. reuteri* en los productos no alteró el contenido de nutrientes.

6.1.2. Viabilidad de *Lactobacillus reuteri* durante el almacenamiento refrigerado.

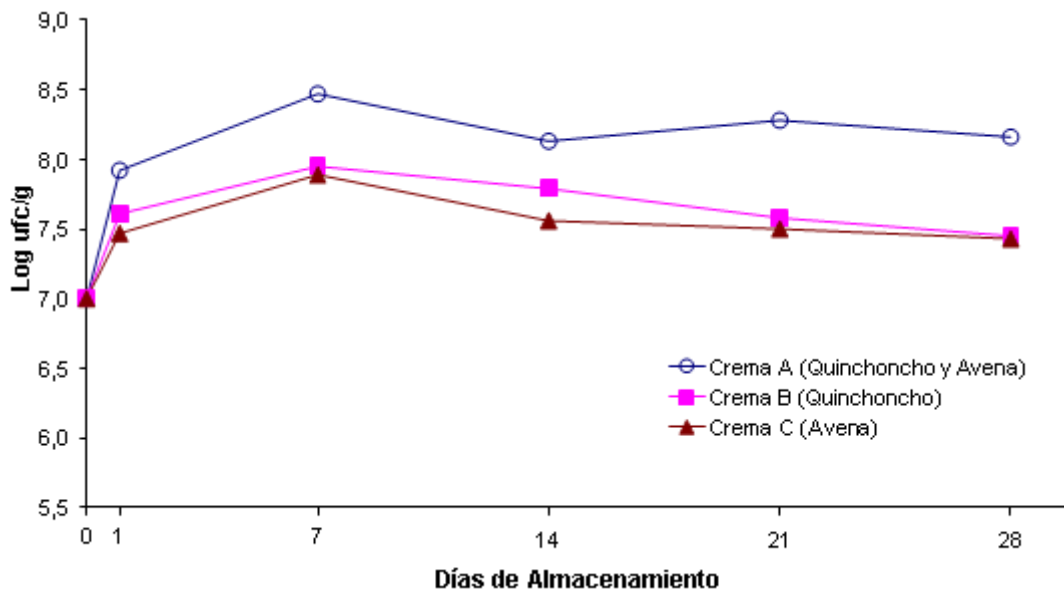
Los productos probióticos están usualmente estandarizados basados en la presunción de que la viabilidad del cultivo es una medida razonable de su actividad, de manera que la habilidad de la cepa de alcanzar una

elevada población celular es de primera importancia. La viabilidad de un probiótico en una matriz alimenticia depende de factores tales como la cepa seleccionada, la producción de peróxido de hidrogeno debido al metabolismo bacteriano, y la acidez del producto final (Vasiljevic y Shah, 2008). Por lo tanto, la adaptabilidad del probiótico en el sustrato es un criterio muy importante en el procedimiento de selección de una cepa adecuada (Oberman y Libudzisz, 1998).

En nuestro caso, el recuento de células viables de *L. reuteri* durante el almacenamiento refrigerado de las cremas A, B y C se presentan en la Figura 1. La concentración inicial (7 log ufc/g) en el día 0 fue afectada significativamente ($P < 0,05$) a través de los días, aumentando la población celular inicial en más de 1 ciclo log ufc/g (crema A). Todas las cremas presentan valores promedios durante el primer día de almacenamiento que oscilan entre 8,45 (A) hasta 7,80 log ufc/g (C), los cuales disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) después del día 7.

Al final del período de almacenamiento (día 28) la mayor población del microorganismo se registró en la formula A (quinchoncho y avena) con un valor de 8,16 log ufc/g mientras que para la B fue de 7,45 y para la C de 7,43 log ufc/g. En consecuencia, la combinación de quinchoncho y avena fue la más eficiente en sostener la viabilidad del cultivo, con un aumento significativo ($P < 0,05$) al final del periodo de almacenamiento.

Figura 1. Viabilidad (valores promedio) de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 en las cremas A, B, y C durante su almacenamiento refrigerado durante 28 días



Estos resultados indican que estos tipos de crema serían vehículos adecuados para bacterias probióticas. Estas consideraciones concuerdan con la conclusión relacionada con la selección cuidadosa de la matriz alimentaria para el desarrollo de un producto probiótico (Ranadheera y col., 2010). Una concentración de aproximadamente 10^7 células viables/g del producto al tiempo de consumo es considerado funcional (Gomes y Malaca, 1999; Shortt, 1999); otros autores sugieren valores de 10^6 ufc/g (Micanel y col., 1997). En nuestro trabajo, todas las cremas registraron valores por encima de 10^7 ufc/g.

Lactobacillus reuteri es considerado un microorganismo de interés ya que reside en el tracto gastrointestinal (GI) de humanos y animales y es considerada una de las pocas especies autóctonas en el hombre (Valeur, y col., 2004). Posiblemente la presencia de elevados niveles de factores de crecimiento esenciales tales como aminoácidos libres, vitaminas del complejo B o minerales en las cremas formuladas con quinchoncho y avena deben haber promovido su crecimiento, lo cual demuestra que este microorganismo puede sobrevivir en las cremas a un nivel suficiente ($> 10^7$ ufc/g) durante 28 días. La esterilización a la cual fueron sometidas las cremas liberan aminoácidos y otras sustancias que pueden promover el crecimiento. Además, este ambiente estéril excluye el crecimiento de otras bacterias y por lo tanto, la competencia por nutrientes disminuye.

En este sentido, Morishita, y col. (1981) y Severson (1998) señalan que los lactobacilos tienen requerimientos nutricionales complejos tales como carbohidratos, aminoácidos, péptidos y vitaminas, los cuales varían mucho de especie a especie. Adicionalmente, la formulación del alimento afecta fuertemente la viabilidad del probiótico durante su almacenamiento (Mattila-Sandholm y col., 2002; Saarela y col., 2006). Asimismo, también se ha reportado que la producción de reuteriicina (Gänzle y Vogel, 2003) y reuterina (Axelsson, y col., 1989) producida por *L. reuteri* contribuyen marcadamente a la estabilidad y persistencia del probiótico en ciertos productos y previene el crecimiento de microorganismos patógenos.

Hasta la fecha, no se encontró en la literatura información disponible sobre el crecimiento de *L. reuteri* ATCC 55730 en sustratos como el quinchoncho. La mayoría de los estudios sobre productos que no incluyen lácteos se han realizado utilizando cereales como avena, cebada, trigo y maíz (Kedia y col., 2007). La avena es una de las principales fuentes de

beta-glucano, el cual es reconocido como el principal componente funcional de la fibra del cereal (Angelov et al., 2006) y es utilizado comúnmente para realizar estudios con probióticos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son coherentes con publicaciones previas. Marklinder y Lönner (1992), utilizaron una solución enteral a base de avena, que contenía bacterias ácido lácticas incluyendo una cepa de *L. reuteri* que alcanzó valores de 10^9 ufc/ml. Concluyeron que la avena era un sustrato adecuado. Otro estudio similar indica que el número de *L. reuteri* aumentó significativamente durante la administración de una sopa de avena suplementada con cebada, malta y enzimas (Johansson y col., 1993).

Por otra parte, resultados similares en la viabilidad de *L. reuteri* se han observado en otro tipo de alimentos. Después de 30 días de almacenamiento, la viabilidad de *L. reuteri* ATCC 55730 fue de 10^8 ufc/ml en tres tipos de productos formulados con avena (Martensson y col., 2002). En general ciertos productos formulados con avena han mostrado ser un soporte adecuado para el crecimiento de bacterias de origen intestinal.

Charalampopoulos y col. (2002) han realizado experimentos con diferentes cereales para determinar los principales parámetros que deben ser considerados en el crecimiento de microorganismos probióticos. *L. reuteri* NCIMB 11951 alcanzó una población que varió entre 7 y 9 log ufc/g, y señalan que los principales factores que inhiben el crecimiento son el pH y la limitación de nutrientes.

Por otra parte, Charalampopoulos y col. (2003) apuntaron que muchos cereales soportan el crecimiento de probióticos con algunas

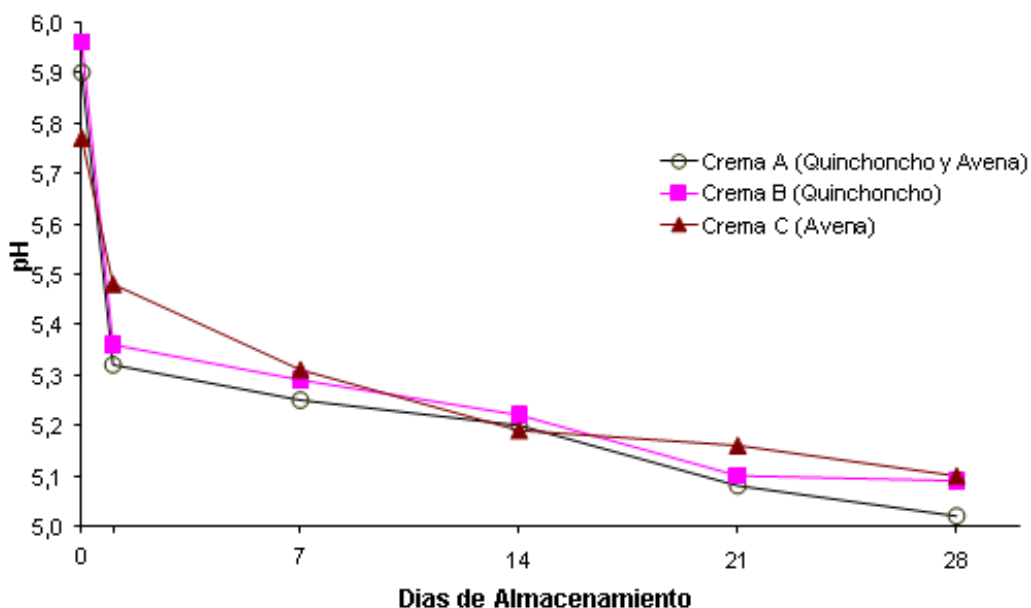
diferencias. El medio a base de malta soportó el crecimiento de todas las cepas examinadas (*L. reuteri* entre otras) mejor que los medios de cebada y trigo debido a su composición química. Por otra parte, Hekmat y col. (2009) consideran que *L. reuteri* RC-14 puede ser afectado por las condiciones ácidas del yogurt. Adicionalmente, la adaptabilidad del probiótico en el sustrato es un criterio muy importante en la selección de la cepa adecuada (Oberman y Libudzisz, 1998).

6.1.3. Evolución de los valores de pH durante el almacenamiento refrigerado de las cremas

Los valores promedios de pH obtenidos de las diferentes cremas A, B y C almacenadas se presentan en la Figura 2. Se observa que a pesar de las diferencias significativas ($P < 0,05$), entre los días 0 y 28 el pH disminuyó sólo a $5,02 \pm 0,06$ en la crema A, $5,09 \pm 0,04$ en la crema B y $5,10 \pm 0,02$ en la C. Estos resultados son consistentes con Muthukumarasamy y Holley (2005), que utilizaron 5 cepas de *L. reuteri* para evaluar su habilidad para fermentar mezclas destinadas a la elaboración de salchichón.

Este estudio señala que el pH de la mezcla disminuyó sólo hasta $5,4 \pm 0,04$, indicando que estas cepas, si se utilizan solas, no son capaces de fermentar en forma adecuada. Del mismo modo, Hidalgo y col. (2005) observaron que la pobre habilidad de acidificación de la leche que presentó *L. reuteri* puede estar más relacionada con un deficiente sistema proteolítico que con deficiencias de actividad de la β -galactosidasa, o que puede haber factores adicionales que afectan esta habilidad. En este estudio, la suplementación de esta leche con peptona y caseína permitió alcanzar una mayor concentración celular comparada con la leche sola.

Figura 2. Valores promedio de pH obtenidos de las cremas A, B y C almacenadas en refrigeración durante 28 días



Similares resultados habían sido obtenidos previamente por Xanthopoulos y col. (2000) en lo concerniente a la baja habilidad de acidificación de esta especie. Lucas y Donawa (1991) opinan que la capacidad *buffer* natural del quinchoncho puede ser adecuada para asegurar una elevada proporción de supervivencia de los lactobacilos. De modo que si el microorganismo es un productor débil de ácido, su valor como probiótico en la crema depende de su habilidad para sobrevivir durante el almacenamiento.

Las propiedades físico-químicas del alimento utilizado como vehículo para el probiótico, tales como capacidad *buffer* y pH son factores importantes que influyen en la supervivencia del probiótico. La formulación del alimento con un rango de pH apropiado y una elevada capacidad

buffer aumentará el pH del tracto gastrointestinal y por lo tanto extenderá la estabilidad del probiótico (Kailasapathy y Chin, 2000; Zárte y col., 2000). En este estudio, uno de los factores que contribuye a la capacidad *buffer* puede ser el contenido de proteínas de las cremas.

6.1.4. Evaluación sensorial

Los resultados de la evaluación sensorial (Tabla 5) indican que todas las cremas tuvieron un elevado nivel de agrado para todos los atributos valuados. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la calidad sensorial entre la fórmula control D (sin *L. reuteri*) y la fórmula A. En términos de sabor tuvieron una puntuación que varió de 2,86 a 3,27 (a menor valor, mayor nivel de agrado).

Tabla 5. Medias de la sumatoria de rangos* para las características organolépticas de los productos a base de leguminosas y *Lactobacillus reuteri*

Atributos	Formulaciones**			
	A	B	C	D
Color	65,07 (2,88)	58,33 (2,71)	76,97 (3,40)	64,01 (2,82)
Textura	63,88 (3,08)	59,25 (2,81)	76,80 (3,67)	62,79 (3,01)
Sabor	66,82 (2,86)	70,94 (3,27)	71,19 (3,19)	63,59 (2,81)

* Al menor valor en la media de la sumatoria de rangos, mayor nivel de agrado para el panelista

** A: Avena y quinchoncho; B: Quinchoncho; C: Avena; D (Control) Avena y quinchoncho S/ *L. reuteri*

Los resultados de este estudio concuerdan con otros autores: Stanton, y col. (1998), Aragón-Alegro y col. (2007) y Correa y col. (2008), quienes han incorporado cultivos de lactobacilos en productos como mousse de chocolate, queso Cheddar y flan de coco. Estos autores sostienen que los productos presentan sabor, textura y composición comparable a los productos control, indicando que la adición de *L. reuteri* no tuvo efectos adversos sobre el criterio sensorial, y no altera su composición química, tal y como se observa en el presente estudio con la crema de quinchoncho y avena.

La fermentación conduce a una mejora general en la vida útil, textura, sabor y aroma del producto final. Durante la fermentación de los cereales se forman varios compuestos volátiles, los cuales contribuyen con una mezcla compleja de sabores en los productos (Chavan y Kardam 1989). La presencia de aromas de diacetilo, ácido acético y butírico hace a los productos fermentados basados en cereales más apetitosos (Blandino y col., 2003).

6.2. Resultados y discusión relativos a la formulación y evaluación de panquecas de maíz preparadas con proteína plasmática de bovino y maíz tierno (Estudio 2)

De todas las fórmulas elaboradas (A, B, C, D y F) se seleccionó la fórmula D, ya que fue la que permitió agregar la mayor cantidad de plasma (40%) sin afectar el manejo técnico de la mezcla o las características organolépticas del producto final.

La Tabla 6 muestra los valores promedios de rendimiento, humedad, proteína, grasa, fibra, carbohidratos disponibles, cenizas y energía

metabolizable (Kcal) de las formulaciones A (control sin plasma) y D (con plasma).

Tabla 6. Valores promedio (g) de rendimiento y composición proximal de las formulaciones A y D

Variable	Formulación A*	Formulación D*
Rendimiento	77,17 ± 0,16 ^b	80,74 ± 0,16 ^a
Humedad	58,58 ± 0,12 ^b	63,28 ± 0,12 ^a
Proteína	3,54 ± 0,04 ^b	6,47 ± 0,04 ^a
Grasa	0,93 ± 0,02	0,98 ± 0,02
Fibra	1,45 ± 0,04	1,40 ± 0,04
Carbohidratos disponibles	26,03 ± 0,02	26,97 ± 0,02
Cenizas	0,8 ± 0,02	0,9 ± 0,02
Energía metabolizable (kcal)	126,65 ± 0,04 ^b	136,82 ± 0,04 ^a

^{a, b} Medias diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren significativamente ($p < 0,05$)

* A: Control B: Producto formulado con proteína plasmática

6.2.1. Rendimiento del producto

El valor promedio del rendimiento de la fórmula con plasma fue de $80,74 \pm 0,16$ y el control $77,17 \pm 0,16$ g/100, observándose diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los mismos. El elevado rendimiento mostrado en el producto con plasma (D), pudo ser atribuido a la capacidad ligante de las proteínas plasmáticas. Barboza y col. (1996) señalan que el efecto positivo que tiene el plasma de bovino sobre el rendimiento y la acción ligante, se debe a la propiedad de gelación que lo caracteriza, de manera que si es utilizado a una concentración proteica de 4,5 % mantiene su capacidad de formar gel sin verse afectado por la temperatura de refrigeración o congelación.

Muchos estudios han confirmado que la gelificación de las proteínas es una propiedad funcional fundamental en la preparación de varios alimentos y es importante ya que mejora la absorción del agua, espesamiento, adhesión y emulsión (Hickson y col., 1980). Márquez y col. (1997) indican que la sustitución de agua por plasma en la formulación de productos cárnicos mejora el rendimiento, ya que el gel que se forma atrapa grasa y agua, disminuyendo las pérdidas por cocción.

La capacidad de formar geles por efecto del calentamiento es probablemente el atributo más interesante del plasma, ya que muchos productos pasan por un tratamiento térmico antes de su comercialización. Bajo condiciones apropiadas puede formarse una red tridimensional, contribuyendo al desarrollo de la estructura interna de los alimentos tales como características de textura deseable y una mayor capacidad de retención de agua (Hermansson, 1982). Se ha demostrado que las interacciones entre proteínas desempeñan un papel clave en el desarrollo de las propiedades físicas de geles y este comportamiento debe tenerse en cuenta especialmente porque el uso de proteína plasmáticas como ingrediente en los alimentos está influenciado por la proporción de cada componente principal en la formulación de productos funcionales (Dávila y col., 2007).

6.2.2. Contenido de humedad, proteínas, grasa, fibra, carbohidratos y energía metabolizable

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de humedad entre los dos tratamientos. El producto con plasma tuvo mayor contenido de humedad (63,28 g/100) que el control, posiblemente debido a que las proteínas del plasma se desnaturalizan por la cocción

ocasionando una humedad adicional en el producto y haciéndolo más suave. Por lo tanto, la retención de agua en las panquecas de maíz es importante ya que una pérdida excesiva de agua lo hace un producto inaceptable.

Como era previsible los resultados de este estudio indican que hubo diferencias significativas en el contenido proteico de los tratamientos. El producto formulado con plasma resultó con mayor contenido proteico ($6,47 \pm 0,04$ gr/100), mientras que la formulación control presentó $3,54 \pm 0,04$ gr/100, debido a que el maíz tiene una baja concentración de proteínas, de manera que la adición de plasma, rico en lisina, produce un efecto positivo y mejora considerablemente su valor proteico. La Inclusión de este producto en la dieta de los niños contribuiría a satisfacer los requerimientos estándar diarios de proteína.

De los datos mostrados en la tabla 6 se aprecia no se han obtenido diferencias significativas entre los dos productos en lo concerniente al contenido en grasa. Esto podría atribuirse a la concentración mínima de grasa que se encuentra en el plasma y en el maíz tierno (Bressani y Mertz, 1988). Asimismo, este estudio reveló que el producto con la adición de plasma representa una importante fuente de fibra (1,40 g). El contenido de cenizas fue similar en ambas fórmulas.

6.2.3. Aminoácidos

La Tabla 7 muestra los contenidos en aminoácidos del producto formulado con plasma. Cuando comparamos estos resultados con el perfil de aminoácidos esenciales propuesto por la Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1991), se muestra claramente que

éstos se encuentran por encima de los requerimientos especificados. La metionina aparece en las recomendaciones de la FAO/WHO como sumatoria de (metionina + cisteína). Por ello no pudo ser comparada en nuestro caso con dichas recomendaciones. Como señalamos anteriormente, la calidad del maíz se halla limitada por la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales, sobre todo lisina y triptófano, pero tiene cantidades considerables de aminoácidos que contienen azufre como metionina y cisteína (Bressani y Mertz, 1988).

Tabla 7. Perfil de aminoácidos esenciales (g/100g de proteína) del producto a base de maíz tierno y proteína plasmática de bovino

Aminoácidos	Producto (g/100g)	FAO/WHO* Niños en edad escolar (6 -12 años)
Histidina	3,89	1,9
Isoleucina	3,82	2,8
Leucina	9,02	4,4
Lisina	5,12	4,4
Metionina	0,60	2,2**
Fenilalanina +tirosina	7,22	2,2
Treonina	4,43	2,8
Valina	4,02	2,5

* Food and Agriculture Organization/World Health Organization

** Sumatoria de metionina + cisteína

Las proteínas del plasma son similares a las proteínas del huevo, las cuales son consideradas como bien equilibradas, donde los aminoácidos esenciales se encuentran en proporciones adecuadas; sin embargo, la concentración de isoleucina y metionina es inferior a las proteínas de la leche, mientras que es superior en lisina y treonina. Debido a la deficiencia en isoleucina y metionina que presenta la sangre, consecuentemente

debe ser administrada en conjunto con otras proteínas que puedan suplir la deficiencia de estos aminoácidos (Márquez y col., 2005). Así, al combinar el maíz con el plasma se logró aumentar la calidad del preparado y se alcanzó un equilibrio adecuado de aminoácidos, obteniendo un producto con un valor nutritivo superior a cada uno de ellos, donde el plasma le aporta lisina al maíz y el maíz aporta metionina al plasma, aumentando y mejorando el valor biológico del alimento.

6.2.4. Evaluación biológica

La Tabla 8 muestra los valores de digestibilidad aparente y la ratio de eficiencia proteica (PER) del producto con plasma. De acuerdo a los resultados obtenidos las proteínas de la dieta experimental son bastante digeribles, ya que del total de proteína ingerida (4,30 g), solo se excretaron 0,79 g representando el 18,92%, lo que indica que el 81,08% restante fue digerido. Oropeza y Ortiz (1989) obtuvieron en granos de varios híbridos de maíz una digestibilidad inferior (66,54% y 70,25%) comparada con la encontrada en la presente investigación, mientras que otros autores han apuntado una digestibilidad para el plasma que oscila entre 83 y 92% (Del Rio de Reys y col., 1980).

El PER obtenido muestra que los animales alimentados con la dieta experimental ganaron 2,64 g de peso por cada gramo de proteína consumida, lo que confirma que las proteínas utilizadas en la formulación son capaces de sustentar y favorecer el crecimiento de animales jóvenes. El PER alcanzado en nuestro estudio se considera bueno al compararlo con la proteína control (caseína), la cual presentó valores de 3,03.

Tabla 8. Calidad biológica de la proteína del producto formulado con maíz tierno y proteína plasmática

Parámetros	Dieta control*	Dieta experimental
Digestibilidad Aparente (%)	-	81,08
PER	3,03 ^a ± 0.80	2,64 ^b ± 0.78

^{a,b}: Medias con diferentes superíndices dentro de la misma fila difieren significativamente ($p < 0,05$).

* Dieta a base de caseína

Oropeza y Ortiz (1989), al evaluar la calidad de la proteína del grano de varios híbridos de maíz mediante ensayos biológicos y químicos, usando caseína como control, encontraron valores de 1,57 y 1,74, para el maíz y de 3,41 para el control de caseína. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en esta investigación (PER 2,64) se puede observar que la incorporación de plasma mejora notablemente la ratio de eficiencia proteica.

6.2.5. Evaluación sensorial

Los resultados obtenidos en las pruebas de nivel de agrado muestran que no hubo diferencias significativas entre las dos formulaciones. Además, se evidenció que del total de niños que conformaron el panel de degustación, el 88,3 % lo aceptó por su sabor, mientras que el 95,3 % por su color (Tabla 9). Las características organolépticas del producto, unidas al

grato sabor obtenido por la adición de azúcar, influyeron positivamente en su aceptación. La incorporación de proteínas plasmáticas en la formulación no alteró el sabor y el color del producto. Es importante destacar que ningún panelista mostró mucho o muchísimo desagrado por el preparado. Aún cuando la textura no fue evaluada por los niños, se observó que el tratamiento con agregado plasmático tuvo mejor consistencia y una textura más suave, quizá debido a las propiedades funcionales de las proteínas del plasma que al igual que la albúmina y la globulina de la clara del huevo, permiten la incorporación de aire cuando es sometida a batido, propiedad ésta que permite obtener productos esponjosos que mejoran notablemente la textura (Lee y col., 1991; Duxbury, 1988).

Tabla 9. Evaluación sensorial (porcentaje de aceptabilidad) del producto a base de maíz tierno y proteína plasmática

Escala	Formulaciones			
	Sabor		Color	
	D*	A*	D*	A*
Me gusta muchísimo	88,4	87,9	95,3	94,9
Me gusta mucho	10,2	8,8	4,7	4,2
Me gusta un poco	0,9	3,3	0	0,9

*A: Control; D: Producto formulado con proteína plasmática

El alto nivel de aceptación, tanto en el color como en el sabor, permite utilizar el producto tipo “cachapa” enriquecido con plasma, como alimento fortificado que podría ser utilizado en el tratamiento de malnutrición por déficit en la población infantil.

6.2.6. Determinaciones microbiológicas

La tabla 10 muestra los resultados de las determinaciones microbiológicas de las panquecas de maíz en las condiciones evaluadas durante su almacenamiento. El recuento inicial de microorganismos viables aerobios totales fue de $2,52 \pm 0,04$ log ufc/g, para el día 0, con ausencia de hongos y levaduras, coliformes y *E. coli* siendo estos valores relativamente bajos lo cual revela la buena calidad del producto. Estos valores aumentaron durante el almacenamiento, alcanzando en el cuarto día $5,99 \pm 0,02$ para aerobios totales y de $3,78 \pm 0,03$ log ufc/g para hongos y levaduras, concluyendo que el período de vida útil para el producto sería hasta el tercer día donde se obtuvieron valores de 5,00 para aerobios totales y de 3,26 para hongos y levaduras. Los resultados obtenidos en este estudio se interpretaron de acuerdo a criterios o limitaciones de aceptación seleccionados sobre la base de estudios preliminares realizados y de algunas normas recomendadas (Curtis y col., 2000).

Tabla 10. Valores promedios (log ufc/g) de bacterias aerobias mesófilas (BAM), coliformes totales (CT), *E. coli* y hongos y levaduras (HL) en el producto a base de maíz tierno y proteína plasmática

Días de almacenamiento	BAM	CT	<i>E. coli</i>	HL
0	$2,52^a \pm 0,04$	<10	<10	$<10^a \pm 0,01$
1	$4,02^b \pm 0,02$	<10	<10	$1,24^b \pm 0,02$
2	$4,45^b \pm 0,04$	<10	<10	$2,56^b \pm 0,04$
3	$5,00^c \pm 0,02$	<10	<10	$3,26^c \pm 0,03$
4	$5,99^c \pm 0,02$	<10	<10	$3,78^c \pm 0,03$

^{a,b,c}: Medias con diferentes superíndices dentro de una misma columna difieren significativamente

7. Conclusiones

PRIMERA - La avena y el quinchoncho se muestran adecuados en el desarrollo de un alimento funcional potencial y pueden soportar un nivel adecuado de células viables de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 durante su almacenamiento refrigerado (28 días).

SEGUNDA - La viabilidad de *Lactobacillus reuteri* siempre estuvo por encima de los niveles recomendados, en especial por encima de 10^7 ufc/g durante su almacenamiento en refrigeración.

TERCERA - Todas las cremas tuvieron un elevado nivel de agrado para todos los atributos evaluados. La adición de *L. reuteri* no afectó el color, sabor y textura de las cremas.

CUARTA - La composición físico-química tampoco fue afectada por el microorganismo.

QUINTA - De las conclusiones anteriores se deduce que la adición de *L. reuteri* ATCC 55730 a las cremas posibilita la producción de un alimento con gran potencial como producto funcional y con excelentes características sensoriales.

SEXTA - La formulación de un producto tipo “panqueca” de maíz preparada con un 53,5% de maíz tierno y un 40% de proteína plasmática de bovino resultó la más factible desde el punto de vista tecnológico, y obtuvo una elevada aceptabilidad desde el punto de vista sensorial.

SÉPTIMA - El plasma de bovino proporciona al producto final mejor consistencia y una textura más suave, gracias a sus propiedades funcionales. Entre otras, una mayor humedad que deviene en una mayor suavidad del producto. También proporciona una importante fuente de fibras.

OCTAVA - La formulación seleccionada con plasma obtuvo un mayor contenido proteico que la control.

NOVENA - El perfil de aminoácidos esenciales de la formulación tipo “panqueca” seleccionada concuerda, y en algunos casos mejora los requerimientos especificados por la FAO/WHO, con excepción de la metionina, cuya referencia no es comparable con dicha fuente.

DÉCIMA - La calidad proteica de dicha formulación se considera satisfactoria, no sólo por tener la cantidad adecuada de aminoácidos sino también por su excelente digestibilidad y Ratio de eficiencia proteica (PER) (ganancia de 2,64g de peso por cada gramo de proteína consumida).

DECIMOPRIMERA - El recuento inicial de microorganismos viables aerobios totales fue de $2,52 \pm 0,04$ log ufc/g, para el día 0, con ausencia de hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, resultado adecuado para un producto fresco. En función de los resultados de almacenamiento, la vida útil para el producto sería hasta el tercer día.

DECIMOSEGUNDA - De las seis conclusiones anteriores se deduce que dicha formulación, basada en un producto tradicional de gran aceptación popular en Venezuela, podría ser utilizado como un medio de solventar problemas de malnutrición asociado con el consumo de productos a base de cereales.

DECIMOTERCERA - En definitiva, el presente estudio contribuye a los grandes esfuerzos que se hacen en los países para desarrollar mezclas alimenticias de calidad que puedan suplir particularmente proteínas a un coste económico, a través de la mejora y aumento del valor nutritivo de alimentos tradicionales o del aporte de beneficios funcionales.

8. Resumen

En los últimos años, los alimentos que afectan a funciones específicas o sistemas del cuerpo humano y proporcionan beneficios para la salud más allá del aporte de energía y nutrientes, han experimentado un crecimiento rápido en el mercado. Este crecimiento es impulsado por las innovaciones tecnológicas, desarrollo de nuevos productos y el número creciente de consumidores sensibilizados por la salud e interesados en productos que mejoren la calidad de vida. El propósito de este trabajo fue diseñar alimentos potencialmente funcionales sobre la base de productos tradicionales venezolanos.

Con este fin, el trabajo se ha dividido en dos estudios: Desarrollo de un producto potencialmente funcional (crema para untar) preparado con quinchoncho (*Cajanus cajan*), avena y *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730; y, en segundo lugar, la formulación y evaluación de productos tipo panqueca de maíz tierno y proteína plasmática de bovino.

Los objetivos específicos del primer estudio incluyen la evaluación de las características físico-químicas de los productos a base de quinchoncho, avena y *L. reuteri*, examinar sus características organolépticas y determinar la viabilidad de *Lactobacillus reuteri* en el producto. En relación al segundo estudio, sus objetivos específicos fueron evaluar las características físico-químicas de los productos tipo panqueca, examinar sus características organolépticas, valorar su calidad microbiológica,

establecer el perfil de aminoácidos y evaluar su eficiencia proteica y digestibilidad.

Para ello, en el estudio 1 se formularon cuatro productos; A con 40% de quinchoncho y 20% avena; B, con un 60% de quinchoncho; C con un 60% de avena; y D (control) con un 40% de quinchoncho y 20% de avena, sin *L. reuteri*. Los productos fueron analizados para determinar su contenido de proteína, humedad, grasas, fibra, carbohidratos disponibles y se sometió a análisis sensorial. El número de células viables y pH fue determinado después de 1, 7, 14, 21, y 28 días de almacenamiento a 4°C.

Los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en proteínas, grasas, fibra y carbohidratos disponibles entre las cremas. Todos los productos tuvieron un nivel de agrado aceptable y no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$). No se encontraron diferencias significativas en la calidad sensorial y composición química entre la crema control y la crema con *L. reuteri*. En general, todas las cremas mostraron ser un soporte adecuado para el microorganismo. *L. reuteri* ATCC 55730 presentó la mayor viabilidad en la crema A (8.16 log ufc/g). Después de 28 días, la viabilidad de *L. reuteri* estuvo siempre por encima de log 7 ufc/g en todas las cremas. El pH disminuyó sólo hasta 5.02 para la crema A.

En relación al estudio 2, se formularon 6 productos incluyendo un control. El tratamiento seleccionado fue el que permitió agregar la mayor cantidad de plasma de bovino y fue elaborado utilizando un 53,5% de maíz tierno y un 40% de plasma. Al producto seleccionado y al control se le determinó humedad, proteína, grasa, fibra, cenizas y rendimiento. Los aminoácidos esenciales se determinaron por HPLC. Para la evaluación biológica de las proteínas se determinó la digestibilidad aparente y el

Índice de Eficiencia Proteica (PER). La aceptabilidad fue evaluada mediante una encuesta realizada a 215 niños en edad escolar, la calidad microbiológica del producto también fue determinada.

El producto con agregado plasmático aportó 6,47% de proteínas, 0,98% de grasa, 1,40 de fibra, 0,9% de cenizas, 63,28% de humedad, y su rendimiento fue de 80,74%. El contenido de aminoácidos esenciales concuerda con los requerimientos establecidos por la FAO. El producto presentó un 81,08% de digestibilidad aparente y un PER de 2,64. La aceptabilidad por parte de la población escolar fue de 88,4% para el sabor y 95,3% para el color. El producto permaneció estable refrigerado a 4°C durante 3 días.

En definitiva, el presente estudio contribuye a los grandes esfuerzos que se hacen en los países para desarrollar mezclas alimenticias de calidad que puedan suplir particularmente proteínas a un coste económico, a través de la mejora y aumento del valor nutritivo de alimentos tradicionales o del aporte de beneficios funcionales

9. Summary

In recent years, food that affect specific functions or systems of the human body and provide benefits to health beyond energy and nutrients, have experienced a rapid growth in the market. This growth is driven by technological innovations, development of new products and the growing number of consumers aware of health and interested in products that improve the quality of life. The purpose of this work was to design potentially functional foods on the basis of traditional Venezuelan products.

To this purpose, the experience has been divided in two studies: Development of a potential functional food prepared with pigeon pea (*Cajanus cajan*), oats and *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730; and, in the second hand, the formulation and evaluation of corn pancakes containing bovine plasma protein and tender corn.

The specific objectives of the first study include the physico-chemical evaluation of the products prepared with pigeon pea, oat and *L. reuteri*, to examine its organoleptic characteristics and to determine the viability of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the product. In relation to the to the second study, their specific objectives were to evaluate the physico-chemical characteristics of products type panqueca, to examine its organoleptic characteristics, to assess microbiological quality, to establish the amino acid profile and to evaluate its protein efficiency and digestibility.

In doing so (study 1) four products were formulated; A with 40% pigeon pea and 20% oat; B, 60% pigeon pea; C, 60% oat and D (control), with 40% pigeon pea and 20% oat, without *L. reuteri*. Products were analyzed to determine their content of protein, fiber, moisture, fat, carbohydrates, ash and degree of likeness. Viable numbers of *L. reuteri* and pH were determined after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage at 4° C.

Results showed significant differences ($P < 0.05$) in protein, moisture, fat, fiber and carbohydrate content between creams. No significant differences ($P > 0.05$) were found on sensory quality and chemical composition between control and creams with *L. reuteri*. In general, the creams were shown to be a suitable support for this bacteria. *L. reuteri* ATCC 55730 had the highest viability in cream A (8.16 log cfu/g). After 28 days the cell viability was above 7 log cfu/g in all creams. pH dropped until 5.02 in product A.

Regarding to the second study, six products were formulated including a control. The selected treatment was the one that allowed to add the higher quantity of bovine plasma and was prepared using 53.5% of tender corn and 40% plasma. Protein, fat, fiber, humidity, ash and yield were determined to select between product and control. The essential amino acids were determined by HPLC. For the biological evaluation of protein, apparent digestibility and Protein Efficiency Ratio (PER) were determined. The acceptability and microbiological quality were also evaluated.

Results indicated that the selected product formulated (D) contained 6.47% of protein, 0.97% of fat, 1.40% of fiber, 0.9% of ash, 63.28% of humidity, and its yield was of 80.74%. In most of the cases, this product meets or

exceeds the estimated ideal concentration for all essential amino acids. The apparent digestibility was 81.08 and PER 2.64. Acceptability was 88.4% for flavour, and 95.3% for colour. The products remained stable under refrigeration (4°C) for 3 days.

In conclusion, the present work contributes to the main efforts of different countries to develop food products of high quality that may supply, specifically, low cost proteins, through improvement and increasing of the nutritive value of traditional foods, or supplying functional benefits.

10. Referencias bibliográficas

Abdel-Salam, A.M. (2010). Functional Foods: Hopefulness to good health. *American Journal of Foods Technology*, 5, 86-99.

Achieng, D. (2007). The potential of pigeon pea (*Cajanus cajan*) (L.) Millsp.) in Africa. *Natural Resources Forum*. 31, 297-305.

Aguilera, Y., Martín, M., Benítez, V., Molla, E., López, F., Esteban, R. (2009) Changes in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22, 678-683.

Alliet, P., Scholtens, P., Raes, M., Hensen, K., Jongen, H., Rummens, J., et al. (2007). Effect of prebiotic galactooligosaccharide, long-chain fructooligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. *Nutrition*, 23, 719-723

Alonso, R., Orue, E., Marzo, F. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chemistry*, 63, 505-512.

Alonso, R., Aguirre, A., Marzo, F. (2000). Effect of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68, 159-165.

Alzate, A., Pérez-Conde, M.C., Gutiérrez, A.M., Cámara, C. (2010). Selenium-enriched fermented milk: a suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal*, 20, 761-769.

Amarteifio, J.O., Munthali, D., Karikari, C., Morke, T.K. (2002). The composition of Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) grown in Botswana. *Plant Foods Human Nutrition*. 57, 173 – 177.

American Dietetic Association (ADA). (1999). Functional foods-position of the ADA. *Journal of American Dietetic Association*, 99, 1278-1285.

Amjad, I., Khalil, A., Ateeq, N., Khan, M. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food Chemistry*. 97, 331-335.

Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., Hristozova T. (2006). Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 75–80.

Anónimo. (2006). Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 30.12.2006

Anónimo. (2008). Reglamento (CE) nº 353/2008 de la Comisión de 18 de abril de 2008 por el que se establecen normas de desarrollo para las solicitudes de autorización de declaraciones de propiedades saludables con arreglo al artículo 15 del Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 19.04.2008

Aragón-Alegro, L., Alarcón-Alegro, J., Cardarelli, H., Ming Chih, S., Saad, I. (2007). Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. *LTW-Food Science and Technology*. 40, 669-675.

AOAC. (2004). *Official Methods of Analysis*. 18th Edn., Association of Official Analytical Chemist, Arlington. VA., USA.

Arai, S. (2002). Global view on functional foods: Asian perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, S139–S143.

Axelsson, L., Chung, T., Dobrogosz, W., Lindgren, S. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology Health Disease*, 4, 2131- 2136

Axelsson, L.T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Saminen, & A.Q. Von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria* (pp. 1-64). New York, USA: Marcel Dekker.

Barboza, Y., Rangel, L., Archile, A., Izquierdo, P., Márquez, E (1996). Estudios de algunos factores que afectan las propiedades de gelación del plasma sanguíneo animal. Revista. Científica de la FCV-LUZ, 6, 31-36.

Amjad, I., Khalil, A., Shah, H. (2003). Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer. Sarh J Agric, 19: 127-134.

Barboza, Y., Márquez, E., Gómez, O., Rangel, L. (1997). Development of a bovine plasma medium for propagation of Lactobacilli. Journal of Food Science and Technology. 34, 261-263.

Bech-Larsen, T., Grunert, K.G. (2003). The perceived healthiness of functional foods. A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods. Appetite. 40, 9–14.

Benítez, B., Archile, A., Rangel, L., Ferrer, K., Barboza, Y., Márquez, E. (2008). Proximal analysis, microbiological and sensory evaluation of a cookie made of cassava flour and bovine plasma. Interciencia. 33, 61-65.

Bernet, F.M., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen cell interaction. Applied Environmental Microbiology. 59, 4121-4128

Bernet, M., Brassart, D., Neeser, J., Servin, A. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut. 35, 483–489

Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. Trends in Food Science and Technology, 22, 498-508.

Betoret, N., Puente, L., Díaz, M., Pagán, M., García, M., Gras, M. (2003). Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. Journal of Food Engineering, 56, 273-277.

Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 399–405.

Blandino, A., AL-Aseeri, M., Pandiella, S., Cantero, D., Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527–543.

Bomba, A., Jonecova, Z., Koscova, J., Nemcova, R., Gancarcikova, S., Mudronova, D., et al. (2006). The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: A review. *Biologia*, 61, 729–734.

Bressani, R., Gómez-Brenes, R., Luiz, E. (1986). Calidad nutricional de la proteína del gandul tierno y maduro y su valor suplementario a los cereales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 36, 109-116.

Bressani, R., Mertz, E. (1988). Studies on Corn protein. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. *Cereal Chemistry*, 35, 227-235.

Brown, J. (1992). Mechanism of serum cholesterol reduction by oat bran. *Hepatology* 20: 1450 -1457.

Casas, I. A., Dobrogosz, W. (2000). Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology Health Disease*, 12, 247-285.

Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. (2008). Vitamins A and E content in infant milk-based powdered formulae after opening the packet. *Food Chemistry*, 106, 299-309.

Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., Martín, M., Chifré, R., Lopez- Sabater, M. C. (2009). Stability during storage of LC-PUFA supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk. *Food Chemistry*, 113, 484-492.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S., Webb C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 851-859.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. (2003). Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially

probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 133–141.

Charalampopoulos, D., Vazquez, J., Pandiella, S. (2009). Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 96-105.

Champagne, C.P., Gardner, N.J., Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morell, L., Collins, J.K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 759–768.

Chavan, U.D., Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1988. Effect of fermentation on soluble proteins and in vitro protein digestibility of sorghum, green gram and sorghum green gram blends. *Journal of Food Science*, 53, 1574– 1575.

Chavan, J.K., Kadam, S.S., Salunkhe, D.K., 1989. In: Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (Eds.), *Handbook of World Food Legumes: Nutritional, Processing, Technology and Utilization*. CRC, Boca Raton, FL.

Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.E., Dobrogosz, W. (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2, 137-144.

Clark, P.A., Martin, J.H. (1994). Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III—tolerance to stimulated bile concentrations of human small intestines. *Culture of Dairy Product Journal*. 29, 18–21.

Cofrades, S., Guerra, M., Carballo, J., Fernández-Martín, F., Jiménez-Colmenero, F. (2000). Plasma protein and soy fibre content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. *Journal of Food Science*, 65, 281-287.

Collado, M.C., Sanz, Y. (2006). Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiology Methods*, 66, 560–563.

Crittenden, R. (2009). Incorporating probiotics into foods. In: Lee, Y.K., Salminen, S. (Eds.): *Handbook of probiotics and prebiotics*. Second ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.

Connolly, E. (2004). *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 a clinically proven probiotic. *Nutrafoods*, 3, 15-22.

Connolly, E. (2005). *Lactobacillus reuteri* drops - Novel delivery system. *Nutrafoods*, 4, 65–68.

Connolly, E., Abrahamsson, E., Bjorksten, B. (2005). Safety of D (L) - lactic acid producing bacteria in the human infant. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41, 489–492.

Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70, 1–12.

Correa, S., Castro, I., Saad, M. (2008). Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Journal of Food Science Technology*, 43, 1560–1568.

Cruz, A., Cadena, W., Faria, J., Bolini, H., Pinheiro, H., Santána, A. (2010). Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Research International*, 43, 1444-1448.

Curtis, M.L., Franceschi, O., Castro, N. (2000). Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50, 177-182.

Dave, R.I., Shah, N.P. (1997). Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 7, 31-41.

Davila, E.D., Pares, G. Cuvelier Relkin, P. (2007). Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.

Del Hoyo, P., Rendueles, M., Díaz, M. (2008). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.

Del Rio de Reys, M.T., Constantinides, S.M., Sgarbieri, V.C., Eldash, A.A. (1980). Chicken blood plasma proteins. Physicochemical nutritional and functional properties. *Journal of Food Sciences*, 45, 17-20.

Desmond, C., Ross, R.P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2005). Development of dairy-based functional foods containing probiotics, and prebiotics. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 121-126.

Devcich, D., Pedersen, I., Petrie, K. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48: 333-337.

Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E., Panfili, G. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams *Journal of Dairy Science*, 93, 4555-4564.

Diplock, A.T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Borneo, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1-S27.

Dobrogosz, W., Peacock, T., Hassan, H. (2010). Evolution of the Probiotic concept: From Conception to Validation and Acceptance in Medical Science. *Advances Applied Microbiology*, 72: 1-41.

Doleyres, Y., Lacroix, C. (2005). Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal*, 15, 973-988.

Duhan, A., Khetarpaul, N., Bishnoi, S. (2002). Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chemistry*, 78, 9–14

Dunne, C., O'Mahoney, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386–393.

Dogi, C.A., Perdigon, G. (2006). Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. *Journal of Dairy Research*, 73, 357–366.

Duxbury, D.D. (1988). Powdered beef plasma replaces eggs in cakes. *Food Processing (USA)*, 49, 73-74.

Eneche, E.H. (1999). Biscuit-making potential of millet/pigeon pea flour blends. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54, 21–27.

Erkkila, S., Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297–300.

FAO/WHO, 1991. Protein quality evaluation Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation FAO Food and Nutrition Paper 51, Food & Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

FAO/WHO. 1996. Preparation and use of food-based dietary guidelines. Nutrition Programme, Geneva: WHO.

FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm accessed on 5th August 2009.

FAO, WHO (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva: WHO Press.

Farzana, W., Khalil, I. (1999). Protein quality of tropical food legumes. Journal of Food Science and Technology, 23: 13-19.

FDA, 2004. <http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099.cfm>.

Fernández, M., Aranda, P., López-Jurado, M., García-Fuentes, M.A., Urbano, G. (1997). Bioavailability of phytic acid phosphorus in processed *Vicia faba* L. var. Major. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 45, 4367–4371

Fogliano, V., Vitaglione, P. (2005). Functional foods: planning and development. Molecular Nutrition Food Research, 49, 256–62.

Food and Nutrition Board (1994). Opportunities in the Nutrition and Food Sciences: Research Challenges and the Next Generation of Investigators. National Academy Press, USA.

Francavilla, R., Lionetti, E., Magistà, A., Castellaneta, S., De Canio, A., Bucci, N., Piscitelli, D., Cavallo, L., Ierardi, E. (2008). Clinical impact of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance on eradication therapies in children: A cohort retrospective study. Digestive and Liver Disease, 40, A91-A92.

Gänzle, M.G., Ehmann, M., Hammes, W.P. (1998) Modelling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2616-2623

Gänzle, M.G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W. P. (2000). Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4325-4333.

Gänzle, M.G, Vogel, R. (2003). Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in industrial sourdough fermentation. International Journal of Food Microbiology, 80, 31–45.

Gibson, G.R., Probert, H. M., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259–275.

Gilliland, S. E., Staley, T. E., Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67, 3045–3051.

Girgis, H., Smith, J., Luckansky, J., Klaenhammer, T. (2003). Stress adaptation of lactic acid bacteria. In *Microbial Stress adaptation and Food Safety*. Edited by Yousef AE, Juneja VK. CRC Press; 159-211.

Gomes, A., Malaca, F.X. (1999). *Bifidobacterium spp.* & *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 10, 139-157.

Gomes, A., Braga, S., Cruz, A., Cadena, P., Lollo, C., Carvalho, J., Amaya-Farfán, J. Faria, H., Bolini, H. (2011). Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses *Journal of Dairy Science*, 94, 4777-47861

Gonzalez-Molina, E., Moreno, D.A., García-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115, 1364-1372.

González-Barrio, R., Vidal-Guevara, M.L., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. (2009). Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 374-382.

Granato, D., Branco, G., Nazzaro, F., Cruz, A., Faria J. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology*, 9, 292–302

Guerrero, M., Dohnalek, M., Newton, P., Murphy, T., Ruiz, G. (1996). Effect of probiotic-containing beverages on incidence of diarrhea. 1st World Congress of Pediatric Infectious Diseases, 610, 45-52.

Han, S., Huh, C.S., Ahn, Y. T., Lim, K.S., Baek, Y.J., Kim, D.H. (2005). Hepatoprotective effect of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 887–890.

Hasler, C.M. (2002). Functional foods: Benefits, concerns and challenges—A position paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132, 3772–3781.

Hekmat S. W., Soltani, H., Reid, G. (2009). Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yoghurt for use as a functional food. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 10, 293–296.

Heller, J.K. (2001). Probiotic bacteria in fermented food: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (Suppl.): 374S-379S.

Hermansson, A.M., (1982). Gel characteristics-structure as related to texture and water binding of blood-plasma gels. *Journal of Food Sciences*, 47, 1965-1972.

Hernández M. (2012). Aspectos de seguridad: Claves para la obtención de probióticos saludables y seguros. *Farmacocinética. Efectos adversos. Ensayos clínicos en animales y humanos. Exigencias*. En: A. Ramos-Cormenzana, M. Monteoliva y F. Nader (Eds.): *Probióticos y Salud*. Díaz de Santos, Madrid, España.

Herrero, A.M., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Hoz, L., Carmona, P. (2009). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*, 113, 493-499.

Hickson, D.W., Dill, C.W., Morgan, D.A., Suter, A., Carpenter, L. (1980). A comparison of heat-induced gel strengths of bovine plasma and albumen proteins. *Journal of Animal Science*, 51, 69-73.

Hidalgo, M., Robles, V., García, H. (2005). *Lactobacillus reuteri* β -galactosidase activity and low milk acidification ability. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 261–267.

Huggett, A.C., Schliter, B., (1996). Research needs for establishing the safety of functional foods. *Nutrition Review*, 54, S143–S148.

Huotilainen, A., Seppa T., Pirttila-Backman, A.M., Tuorila, H. (2006). Derived attributes as mediators between categorization and acceptance of a new functional drink. *Food Quality and Preference*, 17, 328–336.

Hyun, C.H., Shin, H.K. (1998). Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 34-37.

Imase, K., Tanaka, A., Tokunaga, K., Sugano, H., Takahashi, S. (2007). *Lactobacillus reuteri* tablets can suppress *Helicobacter pylori* infection: A double blind, randomized, placebo controlled cross-over clinical study. *Journal Japan Association Infectectology Disease*, 81, 387–393.

International Food Information Council, (2002). Functional foods: attitudinal research. Retrieved November 10, 2005, from <http://www.ific.org/research/funcfoodsres02.cfm>.

Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J., Olmedilla-Alonso, B. (2010). Design and development of meat-based functional foods with walnut: technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry*, 123, 959-967.

Johansson, M., Molin, G., Jeppsson, S., Nobaek, S., Ahrne, S., Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 15–20.

Johnson, C., Dicksved, J., Jonsson, H., Roos, S. (2003). Anti *Helicobacter pylori* activity among lactic acid bacteria isolated from gastric biopsies and strains of *Lactobacillus reuteri*. *Helicobacter*, 8, 467-473.

Jones, P.J., Jew, S. (2007). Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 387–390.

Jousse, F. (2008). Modeling to improve the efficiency of product and process development Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 7, 175–181

Kailasapathy, K., Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunology and Cell Biology, 78, 80–88.

Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. LWT - Food Science and Technology, 44, 1065-1072.

Karvonen, A., Casas, I., Versikari, T. (2001). Safety and possible anti-diarrhoeal effect of probiotic *Lactobacillus reuteri* after oral administration to neonates. Clinical Nutrition, 20, 63-67.

Kedia, G., Wang, R., Patel, H., Pandiella, S. (2007) Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. Process Biochemistry, 42, 65-70.

Khattab, R., Arntfield, S. (2009). Nutritional quality of legumes seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. LWT-Food science and Technology. 42, 1113-1118.

Kim, J., Ko, Y., Park, Y.K., Kim, N.I., Ha, W.K., Cho, Y. (2010). Dietary effect of lactoferrin-enriched fermented milk on skin surface lipid and clinical improvement of acne vulgaris. Nutrition, 26, 902-909.

Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J. (1999). Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50, 45-57.

Konietzny, U., Greiner, R. (2003). Phytic acid/nutritional impact. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), Encyclopedia of food science and nutrition (pp. 4555–4563). London, UK: Elsevier.

Kurman, J.A., Rasic, J.L. (1991). The Health Potential of Products Containing Bifidobacteria. In: Therapeutic Properties of Fermented Milks, Robinson, R.K. (Ed.). Elsevier Applied Science, London, UK. pp: 117-157.

Kyritsi, A., Tzia, C., Karathanos, V. T. (2011). Vitamin fortified rice grain using spraying and soaking methods. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 312-320.

Laforest, L., Moulin, P., Schwalm, M.S., Le Jeune, P., Chretien, S., Kitio, B., et al. (2007). Use of margarine enriched in phytosterols by patients at high cardiovascular risk and treated by hypolipidemic drugs. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 17, 657-665.

Lambo A.M, Oste R, Nyman MGEL. (2005). Dietary fibre in fermented oat and barley α -glucan rich concentrates. *Food Chemistry*, 85, 283–93.

Lankaputhra, W.E., Shah, N.P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. *Culture Dairy Product Journal*, 30, 45-50.

Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Izydorczyk, M.S. (2003). Molecular size effects on rheological properties of oat beta-glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids*, 17, 693–712.

Lee, H.Y., Park, J. H., Seok, S.H., Cho, S. A., Baek, M.W., Kim, D.J., Lee, Y. (2004). Dietary intake of various lactic acid bacteria suppresses type 2 helper T cell production in antigen-primed mice splenocyte. *Journal of Microbiol and Biotechnology*, 14, 167– 170.

Lee, C.C., Johnson, L.A., Love, J.A., Johnson, S. (1991). Effect of processing and usage level on the performance of bovine plasma as an egg white substitute in cakes. *Cereal Chemistry*, 68, 100-104.

Lee, Y.K., Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2nd edition. Wiley, Hoboken, New Jersey, Estados Unidos de América

Livesey G. (1995). Metabolizable energy of macronutrients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1135-1142.

Lorri, W., Svanberg, U. (1993). Lactic-fermented cereal gruels with improved in vitro protein digestibility. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 44, 29– 36.

Lucas R, Donawa A. (1991). Potential uses of pigeon pea in the small scale manufacture of fermented sausages in the Caribbean. *Tropical Agriculture*, 68, 23-26.

Mäkinen, A., Bigret, M. (1993). Industrial use and production of LAB. In S. Salminen & A.von Wright (Eds). *Lactic acid bacteria* (pp. 65-96). New York, USA: Marcel Dekker.

Márquez, E., Barboza, Y., Izquierdo, P., Torres, G. (1997). Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsion type of meat product. *Journal of Food Science and Technology*, 34, 337-339.

Márquez, E., Bracho, M., Archile, A., Rangel, L., Benítez, B. (2005). Proteins, isoleucine lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. *Food Chemistry*, 3, 503-505.

Manzini, P., Marconi, S., Pizzoferrato, L. (2007). New functional milk-based products in the Italian market. *Food Chemistry*, 104, 808-813.

Margolles A., Mayo B., Ruas-Madiedo P. (2009). Screening, identification and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. En: Y. K. Lee y S Salminen (Eds.): *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2ª edición. Wiley, Hoboken, New Jersey, Estados Unidos de América.

Marklinder I, Lönner C. (1992). Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. *Food Microbiology*, 197-205.

Martensson, O., Oste, R., Holst, O. (2002). The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Research International*, 35, 775-784.

Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R., Swings, J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 221-230.

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12, 173–182.

Medina, L.M., Jordano, R. (2012). Petrifilm. A simplified cultural technique. *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd edition). Elsevier. En prensa.

McCartney, A. L. (2002). Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(Suppl. 1), S29–S37

Metchnikoff, I. I. (2004). *The prolongation of life: Optimistic studies* (reprinted edition 1907). New York, NY, USA: Springer.

Micanel, I., Haynes, N., Palyne, M. (1997). Viability of probiotic cultures in commercial Australian yoghurts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52, 24-27.

Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, J., Perales-Sánchez, E., Cuevas-Rodríguez, B., Ramírez-Wong, B., Reyes-Moreno, C. (2006). The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 727–736.

Mishra, V., Prasad, D.N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 109–115.

Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T Yura, T. (1981). Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: Genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal Bacteriology*, 148, 64-69.

Myylyluoma, E., Ahlroos, T., Veijola, H., Rautelin H., Tynkkynen, S., Korpela, R. (2007). Effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment and probiotic supplementation on intestinal microbiota. *International Journal of Antimicrobial agents*, 29, 66-72.

Muthukumarasamy P, Holley R. (2005). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate microencapsulated

Lactobacillus reuteri. International Journal of Food Microbiology, 111,164–169.

Niva, M. (2007). All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*, 48, 384–393

Nestec. (1987). Proteins—what for? Where from? How much? Switzerland: Documentation Centre, Corporate Affairs Department, Nestec Ltd.

Norton, G. (1991). Proteinase inhibitors. In J. P. F. D' Mello, C. M. Duffus, & J. H. Duffus (Eds.), *Toxic substances in crop plants* (pp. 68–106). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Oberman, H., Libudzisz, Z., (1998). Fermented milks. In: Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*, vol. 1. Blackie Academic and Professional, London, UK, pp. 308–349.

Ockerman, H.W., Hansen, C. L. (2000). *Animal by-product processing*. USA: Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster, p. 523.

Oropeza, E., Ortiz, B.L. (1989). Evaluación nutricional de la proteína del grano de seis cultivares de maíz (*Zea Maíz L*). *Revista Científica de la FA-LUZ*, 15, 225-234.

Oyewole, O.B., (1997). Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control*, 8, 289– 297.

Pares, D., Saguer, E., Sauririna, J., Suñol, J. Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray dried porcine blood plasma as influenced by pH. *Journal of Food Science*, 63, 958-961.

Peterson, D.M., (2001). Oat antioxidant. *Journal of Cereal Science*, 33, 115-129.

Petitot, M., Boyer, L., Minier, C., Micard, V. (2010). Fortification of pasta with split pea and faba bean flours: Pasta processing and quality evaluation. *Food Research International*, 43, 634-641.

Pettersson, J.E., Lindberg, S., Thomke, S., Eggum, B.O. (1996). Nutrient digestibility and protein quality of oats different in chemical composition evaluated in rat and in vitro technique. *Animal Feed Science and Technology*, 62, 203-213.

Phillippy, B. Q. (2003). Inositol phosphates in foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 1–60.

Pietrasik, Z., Jarmoluk, A., Shand, P.J. (2007). Effect of non-meat proteins on hydration and textural properties of pork meat gels enhanced with microbial transglutaminase. *LWT-Food Science Technology*, 40, 915-920.

Plummer, S.F., Garaiova, I., Sarvotham, T. (2005). Effects of probiotic on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 69-74.

Puccio, G., Cajozzo, C., Meli, F., Rochat, F., Grathwohl, D., Steenhout, P. (2007). Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition*, 23, 1-8.

Putnam, F.W. (1987). *The plasma proteins: Structure, function, and genetic control*. New York: Academic Press.

Ramos, Nader-Macías & Monteoliva. (2012). *Probióticos y salud*. Ed. Diaz de Santos, Madrid.

Ranadheera R.C, Baines S.K, Adams M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43, 1-7.

Reddy, L.J., Green, J.M., Bisen, S.S., Singh, U., Jambunathan, R., (1979). Seed protein studies on *Cajanus cajan* L., *Atylosia* spp, and some hybrid derivatives. In: *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*. Volume 2, pp. 105–117. IAEA/FAO, Neuherberg.

Reid, G., Bruce, A. W. (2009). Commercially available human probiotic microorganisms. *Lactobacillus rhamnosus*, GR-1® and *Lactobacillus reuteri* RC-14®. En: Y. K. Lee y S Salminen (Eds.): *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2ª edición. Wiley, Hoboken, New Jersey, Estados Unidos de América.

Reuter, G. (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora on the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2: 43-53.

Rivas, A., Rodrigo, D., Company, B., Sampedro, F., Rodrigo, M. (2007). Effects of pulsed electric fields on water-soluble vitamins and ACE inhibitory peptides added to a mixed orange juice and milk beverage. *Food Chemistry*, 104, 1550-1559.

Rivero, M., Fábrega, J., Moreno, J.A. (2012). Probióticos en productos alimenticios y farmacéuticos. En: A. Ramos-Cormenzana, M. Monteoliva y F. Nader (Eds.): *Probióticos y Salud*. Díaz de Santos, Madrid, España

Roberfroid, M.B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1660–1664.

Rockland, B. L., Nishi, K. S. (1979). Tropical grain legumes. In G. E. Inglett & G. Charalambous (Eds.), *Proceedings of an international conference on tropical foods: Chemistry and nutrition*, March 28–30 (pp. 547–574). Hawaii: Honolulu.

Rodríguez, L., Pérez, A., Campderrós, M. (2010). Inuline like lyoprotectan of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. *Food Resaerch International*, 43, 788-796.

Rodríguez, L., Rinaldoni, A., Padilla, A., Campderrós, M. (2011). Assessment of functional properties of bovine plasma proteins compared with other protein concentrates, Application in a hamburger formulation. *American Journal of Food Technology*, 6, 235-243.

Romeo, M. G., Romeo, D. M., Trovato, L., Oliveri, S., Palermo, F., Cota, F., Betta, P. (2010). Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *Journal of Perinatology*. (Epub ahead of print; doi: 10.1038/jp 2010.57).

Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S., Michaelsen, K., Jeppesen, D., Valerius, D., Paerregaard, A. (2003). Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 389-395

Rowland IR, Gut microflora and cancer, in *Gut flora and health-past, present and future*, ed by Leeds AR and Rowland IR. The Royal Society of Medicine Press Ltd, UK, pp 19–25 (1996).

Rosengren, A., Hagman, M., Wedel, H., Willhelmsen L. (1997). Serum cholesterol and long-term prognosis in middle-aged men with myocardial infarction and angina pectoris: A 16-year follow-up of the Primary Prevention Study in Göteborg, Sweden. *Europe Heart Journal*, 18, 754–61.

Ruiz, G., Guerrero, M., Hilty, M. (1996). Feeding of a probiotic for the prevention of community-acquired diarrhea in young Mexican children. *Pediatric Research*, 39, 1089-1092.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.

Salgado, P., G. Fernández, S., Drago., Mauri, A. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1433- 1440.

Salminen, S E., Isolauri, E. (1996). Probiotics and stabilization of the gut mucosal barrier *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5, 53–56

Sanders, M. E. (1999). Probiotics. *Food Technology*, 53, 67-73.

Sanders, M.E. (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 341-347.

Sangeeta, C., Neelam, K. (2001). Probiotic fermentation of indigenous food mixture: effect on antinutrient and digestibility of starch and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 601–609.

SAS PROC GLM, (1997). SAS User's Guide: Statistics. 5th ed. SAS Institute INC., Cary NC Saliminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., Gorbach.

Schuller-Malyoth, R., Ruppert, A., Muller, F. (1968). The microorganisms of the bifidus group (*Lactobacillus bifidus*). I. Historical review, nutritional, physiological and therapeutic aspects, morphology, culture procedures and taxonomy. *Milchwissenschaft*, 23: 356-360

Sedef, N., Sebriem, S. (2012). Food technological applications for optimal nutrition: An overview of opportunities for the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 2-12.

Sendra, E., Sayas, E., Fernández, J., Pérez, J. (2010). Bioactive foods in promoting health. *Probiotic and probiotic*, 22, 335-351.

Severson, D. K. (1998). Lactic acid fermentations. In: Nagoda withana, T.W., Reed, G. (Eds.), *Nutritional Requirements of Commercially Important Microorganisms*. Esteekey Associates, Milwaukee, USA, pp. 258– 297.

Shah, N.P. (2000). Probiotic bacteria. Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.

Shah, N.P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55, 46-53.

Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262–77

Shornikova, A., Cassa I. A., Isolauri, E. Mykkanen, N., Vesikari, T.(1997). *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*, 24, 399-404.

Shortt, C. (1999). The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Science Technology*, 10, 411– 417.

Silva, J., Morais, H., Oliveira, A., Silvestre, M. (2003). Addition effects of bovine globin and sodium caseinate on the quality characteristics of raw and cooked ham pate. *Meat Science*, 63, 177-184.

Singh, U. (1998). Anti-nutritional factors of pea and pigeon pea and their removal by processing. *Plant Foods in Human Nutrition*, 38, 251–261.

Singh, N., Sandhu, K. S., Kaur, M. (2004). Characterization of starches from Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Journal of Food Engineering*, 63, 441–449.

Sinkiewicz, G., and Ljunggren, I. (2008). Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk. *Microbiology and Ecology Health Disease*, 20, 122–126.

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008). Functional food: product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51, 456–67.

Spinler, J., Taweechoatipatr, M., Rognerud, C., Ching, N., Somying, T., Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14, 166-171.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P.B, Collins, J.K., Fitzgerald, G., Ross, R.P. (1998). Probiotic cheese. *International Dairy Journal*, 8, 491–496.

Stanton, C., Desmond, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. (2003). Probiotic health benefits-reality or myth? *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 107-113.

Talarico, T.L., Chung, T.C., Casas, I.A., Dobrogosz, W. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 3, 1854-1858.

Tannock, G.W. (1998). Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *International Dairy Journal*, 8, 527–533.

Temmerman, R.B., Huys, G., Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1-10.

Tharanathan, R.N., Mahadevamma, S., (2003). Grain legumes a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 14, 507–518

Thavarajah, D., Thavarajah, P., See, Ch., Vandenberg, A. (2010). Phytic acid and Fe and Zn concentration in lentil (*Lens culinaris* L.) seeds is influenced by temperature during seed filling period. *Food Chemistry*, 122, 254-259

Torres, A., Frías, J., Granito, M., Vidal-Valverde, C. 2007. Germinated *Cajanus cajan* seeds as: ingredients in pasta products: chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 101, 202-211.

Tybor, P.T., Dill, C.W. (1975). Functional properties of proteins isolated from the bovine blood by a continuous pilot process. *Journal of Food Science*, 40, 155-159.

Urala, N., Lahteenmaki, L. (2003). Reasons behind consumers 'functional food choices. *Nutrition and Food Science*, 33, 148–158.

USDA. (2010). Dietary guidelines for Americans. U.S. Dept. of Health and Human Services and U.S. Dept. of Agriculture.

Valeur, N., Engel, P., Carbajal, N., Connolly, E., Ladefoged, K. (2004). Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 1176–1181

Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2008). Probiotics from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714-728.

Verbeke, W. (2005). Consumer acceptance of functional foods: Sociodemographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference*, 16, 45–57.

Verschuren, P.M. (2002). Functional foods: Scientific and global perspectives. *British Journal of Nutrition*, 88, S125–S130.

Viana, F.R., V.D. Silva, F.M. Delvivo, C.S. Bizzotto M.P. Silvestre. (2005). Quality of ham paté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Sci.*, 70: 153-160.

Vidal-Valverde, C., Frias, J., Valverde, S. (1993). Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. *Journal of American Dietetic Association*, 93, 547–550.

Viviane, D.M., V.D. Silva M.P. Silvestre. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensm Wiss Technology*, 36, 709-718.

Weizman, Z., Asli, G, Alsheikh, A. (2003). Infant formula supplemented with probiotics reduces gastrointestinal infections rate in day care infants. *Clinical Nutrition*, 22 (suppl 1) S69.

Weizman, Z., Alsheik, A. (2006). Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: A pilot study. *Journal of American Coll. Nutrition*, 25, 415–419.

Wolf, B.W., Garleb, K. Ataya, D., Casas, I.A. (1995). Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adult's male subjects. *Microbial Ecology Health Disease*, 8, 41-50.

Wolf, B.W., Garleb, K. Ataya, D., Wheeler, K. (1998). Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infested with the human immunodeficiency virus. *Food Chemical Toxicology*, 36, 1085-1094.

Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetaki, N. (2000). Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjunct. *Food Microbiology*, 17, 205–215.

Yamaguishi, C., Sanada, C., Gouvêa, P., Pandey, A., Woiciechowski, L., Parada, J., Soccol, C. (2009). Biotechnological process for producing black vean slurry without stachyose. *Food Research International*, 42, 425-429.

Yousif, A., Cranston, P., Deeth, D. (2003). Incorporation of bovine dry blood plasma into biscuit flour for the production of pasta. *Lebensm Wiss Technology*, 36, 295-302.

Zare, F., Boye, J.I., Orsat, V., Champagne, C., Simpson, B.K. (2011). Microbial, physical and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Research International*, 44, 2482-2488.

Zárate, G., Chaia, A.P., Gonzalez, S., Oliver, G. (2000). Viability and a galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *Journal of Food Protection*, 63, 1214–1221.

Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E.J., Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86, 15-31.

Ziemer, C.J., Gibson, G.R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473– 479.

ANEXO I

**Artículo publicado en el International Journal of Food Sciences and
Nutrition**

Development of a potential functional food prepared with pigeon pea (*Cajanus cajan*), oats and *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730

YASMINA BARBOZA¹, ENRIQUE MÁRQUEZ¹, KATYNNNA PARRA¹, M. PATRICIA PIÑERO¹,
& LUIS M. MEDINA²

¹Nutrition R&D Laboratory, Faculty of Medicine, Nutrition and Dietetic College, University of Zulia, Maracaibo, Venezuela, and ²Food Science and Technology Department, University of Cordoba, Córdoba, Spain

Abstract

The purpose of this study was to investigate the survival of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in creams, prepared with pigeon peas and oat. Products were analysed to determine their content of protein, fibre, fat, carbohydrates and degree of likeness. Viable numbers of *L. reuteri* and pH were determined after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage at 4°C. Results showed significant differences ($P < 0.05$) in protein, fat, fibre and carbohydrate content between creams. No significant differences ($P > 0.05$) were found on sensory quality between control and creams with *L. reuteri*. After 28 days, the cell viability was above 7 log cfu/g in all creams. *L. reuteri* ATCC 55730 had the highest viability in cream with 40% pigeon pea and 20% oat (8.16 log cfu/g). In conclusion, due to its acceptability and highly nutritious value, the product could be used so as to support the growth of *L. reuteri*.

Keywords: probiotic, functional food, *Lactobacillus reuteri*, pigeon pea, oats

Introduction

Legumes play an important role in human nutrition since they are rich sources of protein, calories, certain minerals and vitamins (Singh et al. 2004). Cereal proteins are deficient in certain essential amino acids, particularly lysine (Amjad et al. 2003). On the other hand, legumes have been reported to contain adequate amounts of lysine, but are deficient in S-containing amino acids (methionine, cystine and cysteine) (Farzana and Khsalil 1999). Red gram (*Cajanus cajan* L.), also called pigeon pea, is among the important grain legumes and is grown and consumed in the tropics and semi-arid tropics of the world (Singh 1998). Pigeon peas have a potential value as an economic source of high protein. However, pigeon peas, like other legumes, are deficient in methionine and cysteine but high in lysine as reported by Amarteifio et al. (2002).

In addition, nutritional science has moved on from the classical concepts of avoiding nutrient deficiencies

and basic nutritional adequacy to the concept of 'positive or optimal nutrition', this is maximizing life expectancy and quality by identifying food ingredients that, when added to a balanced diet, improve the capacity to resist disease and enhance health (Niva 2007). The development of foods that promote health and well-being is one of the key research priorities of food industry and has favoured consumption of foods enriched with physiologically active components such as probiotics (Klaenhammer and Kullen 1999; Betoret et al. 2003).

The research of novel formulations with selected probiotic strains is important to satisfy the increasing request of the market and to obtain functional products in which the probiotic cultures are more active and protected from the gastrointestinal stress. Probiotics are defined as live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host (FAO 2002). To realize

Correspondence: Yasmina Barboza, Calle 60 Sector Zapara II Conjunto Residencial Pequeña Europa Torre IV Apto 5 A, Maracaibo, Venezuela. Tel: + 58 414 6165659; +58 261 7441088. Fax: + 58 261 7597236. E-mail: yasmib@cantv.net; bt2babay@uco.es

health benefits, probiotic bacteria must be viable and available at high concentration, typically 10^6 cfu/g of product (Shah 2000).

If probiotic organisms are not present in the product in sufficient viable concentration at the time of consumption, potential probiotic health benefits will not be conferred to the consumer. Besides their desired health properties, probiotics should meet several basic requirements for the development of marketable probiotic products including their survival and activity in the product, and stability during storage of the product. In addition, probiotics should not adversely affect the taste or aroma of the product nor acidification during the shelf life of the product (Heller 2001).

Lactobacillus reuteri is an established probiotic agent that resides in the gastrointestinal tract of humans and animals (Casas and Dobrogosz 2000), and is considered to be one of the few true autochthonous (indigenous) *Lactobacillus* species in humans (Valeur et al. 2004). *L. reuteri* ATCC 55730 also designated SD2112 has been extensively studied and is widely used as a food additive to improve human gastrointestinal health. Clinical trials have shown that *L. reuteri* ATCC 55730 administration is safe and significantly reduces the incidence and the severity of diarrhoea of different origins, reducing gastrointestinal illness and infections (Casas and Dobrogosz 2000; Karvonen et al. 2001; Connolly 2004). Many human clinical studies have been conducted such as efficacy for rotavirus-induced diarrhoea in children, treatment of infantile colic, increase in work-place healthiness in adults, eradication of *Helicobacter pylori* and improvements on oral health (Dobrogosz et al. 2010).

Therefore, the utilization of *L. reuteri* in pigeon peas and oat substrate would produce a fermented food with defined and consistent characteristics and possibly health-promoting properties. However, several technological aspects have to be considered in the design of such a novel food process, such as the composition and processing of the raw material, the growth capacity and productivity of the culture, the stability of the probiotic during storage, the organoleptic properties and the nutritional value of the final product. Therefore, the objectives of this study were (i) to formulate and evaluate chemical composition and degree of likeness of creams prepared with pigeon peas, oat and *L. reuteri* ATCC 55730 and (ii) to determine the viability of *L. reuteri* with the purpose of offering novel probiotic food.

Materials and methods

Raw material

Pigeon pea seeds (*Cajanus cajan* L. Millsp) were supplied by Agronomy Department of University of Zulia. The seeds were then taken to the laboratory in air-tight polyethylene bags, cleaned and kept in a cool

and dry place prior to use. The oat flakes were purchased from a local supermarket. *L. reuteri* ATCC 55730 was obtained from Biogaia Biologics Inc, USA.

Experimental design and formulation

Several formulations were developed to determine the feasibility of using *L. reuteri* as functional ingredient in a product type cream made with pigeon pea. During this research, a total of 432 samples (72 of each formula) were prepared every 15 days (6 replicates). Formula A was made with 40% pigeon pea, 20% oat flakes and *L. reuteri*; formula B was prepared with 60% pigeon pea and *L. reuteri*; formula C contained 60% oat flakes and *L. reuteri* and D (control) was prepared the same as A, but without *L. reuteri*. The rest of the ingredients, sesame cream (8%), sugar (1%), salt (1%) and water (30%), were added in equal proportions to all formulas (Table I).

Products preparation

To prepare the products, pigeon pea was manually selected, weighed and washed. The seeds were soaked for 12 h as it is general practice in households to soak legume seeds overnight prior to processing and cooking. The amount of water used for ordinary cooking was three times the weight of the seeds. Seeds were cooked until soft as felt between the fingers. The ingredients of each formula were added and processed for 5 min in a blender (Oster™). The mixtures were then packaged in individual glass cups, each containing 130 g of the product, sealed with a metallic cover and immediately autoclaved at 121°C for 15 min. Formulas A, B and C were inoculated with probiotic culture and stored at 30°C for 6 h before being refrigerated at 4°C for 1, 7, 14, 21 and 28 days.

Bacterial strain and culture conditions

L. reuteri SD2112 ATCC 55730 was maintained on *Lactobacillus* MRS Agar (Oxoid, Basingstoke, and Hampshire, UK) Petri dishes at 4°C. Before use, the strain was activated by taking one bacterial colony and inoculating this colony into *Lactobacillus* MRS broth in culture tubes at 37°C for 18 h under using Gas Pack

Table I. Ingredients used to make creams (g/100 g).

Ingredients	Formulations			
	A	B	C	D
Pigeon pea	40	60	–	40
Oats	20	–	60	20
Ajonjoli cream	8	8	8	8
Sugar	1	1	1	1
Salt	1	1	1	1
Water	30	30	30	30
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1	1	1	–

System (BBL Microbiology Systems Sparks, MD, USA), and then its purity was checked. Isolated colonies from MRS agar plates were pre-cultured twice in MRS broth (Oxoid) for approximately 24 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at 5000g, for 10 min, 4°C and washed twice with sterile saline solution. The bacterial suspensions were then used to inoculate the cream at 1% (v/v). In all cases, the initial microbial concentration was approximately 7 log cfu g⁻¹.

Cell counts

The viability of *L. reuteri* was determined during the storage period (1, 7, 14, 21 and 28 days). For this purpose, 11 g from each sample was aseptically weighed into sterile jars. Samples were blended for 2 min at high speed after the addition of 99 mL of 0.1% sterile peptone water (Oxoid) and submitted to serial dilutions with the same diluent. Each dilution was spread-plated, in duplicate, on MRS agar at 37°C for 48 h using Gas Pack Jars (BBL Microbiology Systems). Colony-forming units (cfu/g) were counted and the results were expressed as their log₁₀ values.

Physical-chemical analysis

The pH values were determined at 0, 7, 14, 21 and 28 days with a pH metre (Orion model 410A), which was calibrated with buffer solutions supplied by the same trademark. The product mean composition (moisture, ash, fat and protein content) was determined in the final product in triplicate samples. Ash was determined according to AOAC 945.46. Moisture was determined using the drying oven method, by drying a representative sample in an oven (AOAC 925.04). Protein (AOAC 991.20) was estimated by measuring the product nitrogen content by the Kjeldahl method and multiplying it by a conversion factor (6.38). Fat (AOAC 989.05) was determined through lipid, extraction with ethyl ether, using the Soxhlet device (Association of Official Analytical Chemists 2000). The carbohydrate content was calculated by difference to achieve 100% of total

content. The metabolic energy was determined using the empirical method proposed by Livesey (1995).

Sensory analysis

Sensory evaluation (degree of likeness) of all treatments was carried out employing a nine-point non-structured hedonic scale where '1' represented 'like greatly' and '9' 'dislike intensely'. One hundred and fifteen untrained panellists from the Faculty of Medicine of Zulia University took part in this study. White plastic plates labelled with three digit codes from a random number table were used to conceal the identity of the cream samples. Samples (20 g) of each cream and the respective tools for degustation (napkins, knives, unsalted cracker) were served in random order to the panellists, isolated in partitioned booths illuminated with white fluorescent light. Glass of water was provided between the samples to clean the palate.

Statistical analysis

For physical-chemical and microbiological variables, the experimental design was a randomized block. Analysis of variance (ANOVA) was applied using PROC-GLM of SAS (1997). When the effects proved to be significant, Tukey test for comparison of means between treatments was used. For the statistical analysis of sensory evaluation non-parametric test of Kruskal-Wallis was used.

Results and discussion

Chemical composition

Table II shows the mean values for moisture, protein, fat, available carbohydrates, fibre, ash and caloric energy of the different formulations. As expected, the results of this study show a significant difference ($P < 0.05$) in protein content of the formulations. The product formulated with pigeon pea (B) resulted in a higher protein content 8.19 ± 0.21 than the product made with oats (C), with a value of 4.26 ± 0.25 ($P < 0.05$), while treatments with pigeon pea and oats

Table II. Chemical composition (g/100 g) of the different creams made from pigeon pea and oats.

Variables	Formulations*			
	A	B	C	D
Moisture	61.63 ± 1.02	61.18 ± 0.85	61.00 ± 0.98	61.53 ± 1.84
Protein	7.60 ± 0.28 ^b	8.19 ± 0.21 ^a	4.26 ± 0.25 ^c	7.58 ± 0.22 ^b
Grasa	8.06 ± 0.70 ^a	7.55 ± 0.55 ^b	9.38 ± 0.65 ^c	8.07 ± 0.59 ^a
Carbohydrates	21.24 ± 0.60 ^a	21.64 ± 0.83 ^a	23.94 ± 0.70 ^b	21.39 ± 0.69 ^a
Fibre	2.12 ± 0.35 ^b	2.86 ± 0.31 ^a	2.26 ± 0.32 ^b	2.14 ± 0.30 ^b
Ash	1.44 ± 0.31	1.44 ± 0.24	1.42 ± 0.19	1.43 ± 0.32
Caloric energy	185.62 ± 4.74 ^a	181.55 ± 5.53 ^a	197.04 ± 0.28 ^b	188.51 ± 4.36 ^a

^{a,b,c}Means with different superscripts within a row differ significantly ($P < 0.05$); *A, oats and pigeon pea; B, pigeon pea; C, oats; D (control) Oats and pigeon pea without *L. reuteri*.

preparations (A) showed intermediate values of 7.60 ± 0.28 . The control formulation (D) reported values of 7.58 ± 0.20 .

These results may be due to treatment B was prepared with the highest proportion of pigeon pea and in the formulation A 20% of pigeon pea was replaced by oats and C oats only which protein content is lower (9.6%). The quality of a protein depends on the relationship between the quantity and quality of amino acids; thus, the combination of cereal such as oats and legumes is very helpful, because the amino acids of both types of food are combined to form a complete protein.

From the data shown in Table II, there was significant difference between treatments in fat content. Treatment C had a higher percentage of fat than A, B and D. This could be explained by the presence of oats (7% fat), in comparison with the values of pigeon pea which contributes only between 1.2% and 1.3% fat. Fat content, concentration and type of proteins, sugars and pH of the product are the factors that could affect the probiotic growth and survival in food. Therefore, product formulation can be manipulated to aid their efficacy. Same probiotic strains could vary in functional and technological properties in the presence of different food ingredients (Ranadheera et al. 2010).

The use of cereal–legume blends provides a better nutrient profile including an improved amino acid pattern. However, the main limitation in the biological utilization of cereals and legumes or their blends is the presence of high amounts of antinutrients such as phytic acid, polyphenols, trypsin inhibitors (Vidal-Valverde et al. 1993) and flatulence-causing oligosaccharides (Singh 1998). Fermentation with probiotic organisms is an important process, which significantly lowers the content of antinutrients improving the digestibility (Sangeeta and Neelam 2001; Khattab and Arntfield 2009), and also provides optimum pH conditions for enzymatic degradation of phytate which is present in cereals in the form of complexes with polyvalent cations such as iron, zinc, calcium, magnesium and proteins. Such a reduction in phytate may increase the amount of soluble iron, zinc and calcium several folds and thereby improves the nutritive value of food grains (Chavan and Kadam 1989). Thus, if a cereal–legume-based food mixture is fermented with probiotic organism/s, it may not only improve the nutrient profile but also exert beneficial health effects.

For moisture and ash, no significant differences ($P > 0.05$) were detected between the formulations. Mean values found for moisture ranged between $61.00\% \pm 0.98$ and $61.63\% \pm 1.02$, which is evident as the amount of water was equal for the four treatments. Significant differences were detected ($P < 0.05$) in relation to carbohydrate and calories in the formulation C. The B treatments had a higher proportion of fibre ($P < 0.05$). It is important to note

that the addition of *L. reuteri* in the products did not alter the nutrient content.

Viability of L. reuteri during cold storage

Probiotic products are usually standardized based on the presumption that culture viability is a reasonable measure of probiotic activity; thus, the ability of the strain to attain high cell population is of primary importance. The viability of probiotics in a food matrix depends, among many other factors, on the strain selected, the interactions between the microbial species present, the production of hydrogen peroxide due to bacterial metabolism and the final acidity of the product (Vasiljevic and Shah 2008). Therefore, the adaptability of the probiotic in the substrate is a very important criterion in the selection procedure of a suitable strain (Oberman and Libudzisz 1998).

In our case, viable counts of *L. reuteri* during cold storage of creams A, B and C are presented in Figure 1. The initial concentration (7 log cfu/g) on day 0 was significantly affected ($P < 0.05$) after day 1, increasing the initial cell population (more than 1 log cycle for cream A). All creams have mean values during the first day of storage ranging from 8.45 (A) to 7.80 log cfu/g (C), which decrease significantly ($P < 0.05$) after 7 days of storage. At the end of the storage period (day 28), an increase in *Lactobacilli* population was registered with the formula A (pigeon pea and oats) with a value of 8.06 while B and C had numbers of 7.45 and 7.43 cfu/g, respectively. Hence, the combination of pigeon pea and oat was the most efficient in sustaining the viability of the organism, with a significant increase at the end of the storage period. These results indicate that these types of creams would be a suitable vehicle for probiotic bacteria. This consideration agrees with the conclusion about a careful selection of a food matrix to develop probiotic products (Ranadheera et al. 2010).

A concentration of approximately 10^7 viable cells/g product at the time of consumption is considered functional (Gomes and Malaca 1999; Shortt 1999); others researchers suggest concentration levels above 10^6 cfu/g (Micanel et al. 1997). In our work, all creams recorded values above 10^7 cfu/g. Possibly, the presence of high levels of essential growth factors such as amino acids, carbohydrates, B vitamins and minerals in the creams made with pigeon pea and oats may have promoted the growth of *L. reuteri*, which demonstrated that this microorganism could survive in creams at sufficient levels ($> 10^7$ cfu/g) for 28 days.

The food formulation strongly affects the viability of probiotics during storage (Mattila-Sandholm et al. 2002; Saarela et al. 2006). In addition, it has been reported that populations of *L. reuteri* strains are less variable because production of reutericyclin (Gänzle and Vogel 2003) and reuterin (Axelsson et al. 1989) appears to contribute markedly to their stability and

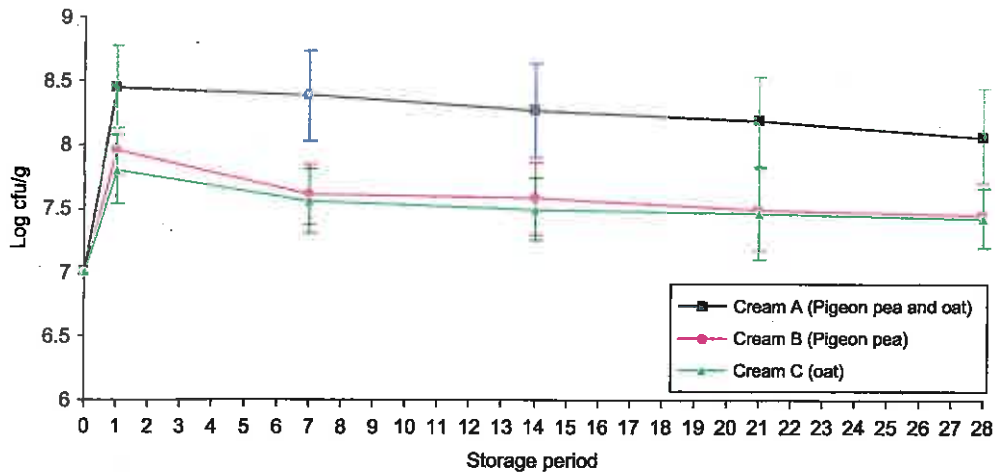


Figure 1. Viability (mean values) of *L. reuteri* ATCC 55730 in creams A, B and C during refrigerated storage.

persistence in certain foods products and suppress the proliferation of bacterial pathogens.

Up to date, no available literature was found on the growth of *L. reuteri* on substrates such as pigeon pea. Most of the studies excluding milk have been made using cereals such as oats, barley, wheat and maize (Kedia et al. 2007). Oat, one of the major sources of beta-glucan, which is recognized as the main functional component of cereal fibre (Angelov et al. 2006) is too commonly used to perform probiotic studies.

The results obtained in our work are consistent with previous reports. Marklinder and Lönner (1992) used an enteral solution based on oat which contained lactic acid bacteria including *L. reuteri*, which reached values of 10^9 cfu/ml. They concluded that oatmeal is a suitable substrate. Another similar study indicates that the number of *L. reuteri* increased significantly during the administration of products such as oatmeal soup supplemented with barley, malt and enzymes (Johansson et al. 1993).

Moreover, similar results for the viability of *L. reuteri* were observed in other foods. *L. reuteri* ATCC 55730 had the highest viability (10^8 cfu/ml) after 30 days of storage and during fermentation of non-dairy, oat-based products (Martensson et al. 2002). In general, the oat-based products were shown to be a suitable support for these intestinal bacteria.

Charalampopoulos et al. (2002) have done experiments with different cereals to determine the main parameters to be considered in the growth of probiotic microorganisms. *L. reuteri* NCIMB 11951 reached a cell population that ranged from 7 to 9 log cfu/g, and notes that the main factors that inhibit growth are the pH and nutrient limitation. In 2003, Charalampopoulos et al. (2003) reported that many cereals supported the growth of probiotics with some differences. Malt medium supported the growth of all examined strains (*L. reuteri* among others) better than barley and wheat media due to its chemical composition. On the other hand, Hekmat et al. (2009) considered that *L. reuteri* RC-14 seems to be

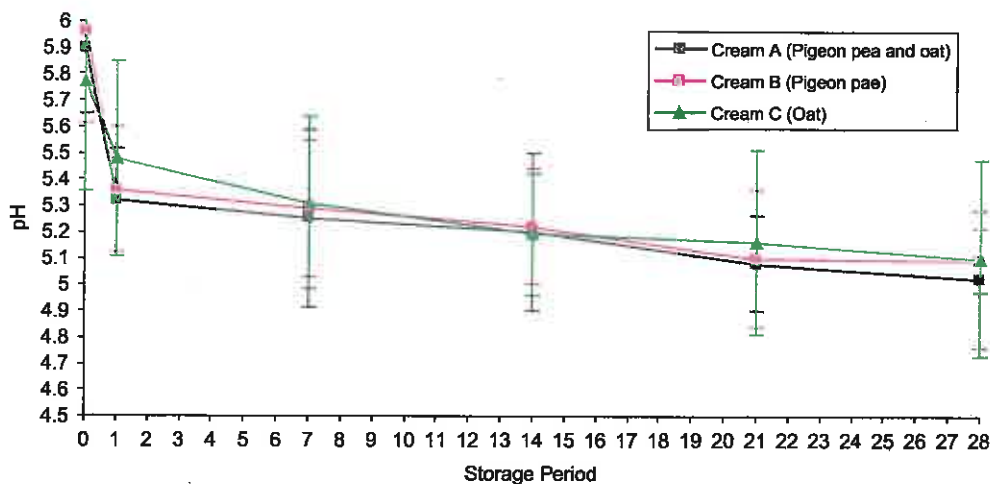


Figure 2. Mean pH values obtained for the different creams A, B and C studied during refrigerated storage.

Table III. Average of the sum of ranges* for the organoleptic characteristics of the legume-based products and *L. reuteri*.

Attributes	Formulations [†]			
	A	B	C	D
Colour	65.07 (2.88)	58.33 (2.71)	76.97 (3.40)	64.01 (2.82)
Texture	63.88 (3.08)	59.25 (2.81)	76.80 (3.67)	62.79 (3.01)
Tastes	66.82 (2.86)	70.94 (3.27)	71.19 (3.19)	63.59 (2.81)

* For the panellists, when the value is lower, the degree of likeness is greater; [†] A, oats and pigeon pea; B, pigeon pea; C, oats; D (control) oats and pigeon pea without *L. reuteri*.

adversely affected by factors such as acidic condition of yoghurt.

Evolution of pH values during storage creams

The mean pH values obtained from the different creams A, B and C are shown in Figure 2. It is noted that despite the significant differences between days 0 and 28, the pH decreased only to 5.02 ± 0.06 in cream A, 5.09 ± 0.04 in cream B and 5.10 ± 0.02 in cream C. These results are consistent with those reported by Muthukumarasamy and Holley (2005), who reported that when *L. reuteri* was used alone, the organism was incapable of adequately fermenting meat batter. Therefore, if probiotic organisms are weak lactic producers like *L. reuteri*, their value as probiotics in dry fermented sausage depends on their ability to survive during the ripening process.

Hidalgo et al. (2005) have reported that the poor milk acidification ability observed in *L. reuteri* may be more related to a weak proteolytic system than to deficient β -galactosidase activity or that there may be additional factors that affect the ability of *L. reuteri* to acidify milk. In that study, supplementation of milk with casein peptone allowed them to confirm these observations, since *L. reuteri* was characterized by both higher cell concentration and higher specific growth rates compared with those obtained with milk alone.

Similar results were reported previously by Xanthopoulos et al. (2000) regarding poor acidification. Lucas and Donawa (1991) has reported that the natural buffering capacity of pigeon pea might be adequate to ensure high rates of survival of *Lactobacillus*. Therefore, if the organism is a weak acid producer its value as a probiotic in cream depends on its ability to survive during storage.

Physical-chemical properties of food carriers used for probiotic delivery, such as buffering capacity and pH, are the significant factors that influence survival of the probiotic. Food formulations with appropriate pH ranges and high buffering capacity would increase the pH of the gastric tract and hereby enhance the stability of probiotics (Kailasapathy and Chin 2000; Zárate et al. 2000). In this study, one factor that contributes

to the buffering capacity could be the protein content of the creams.

Sensory evaluation

The results of sensory evaluation (Table III) indicate that all the creams had a high degree of likeness for all attributes evaluated. No significant difference ($P > 0.05$) in sensory quality was found between control and formula A. In relation to the flavour, a score that ranged from 2.86 to 3.27 was reported (when the value is lower, the degree of likeness is greater).

The results of this study agree with other researchers (Stanton et al. 1998; Aragon-Alegro et al. 2007; Correa et al. 2008) who have incorporate cultures of *Lactobacillus* in products such as chocolate mousse, cheddar cheese and coconut flan. The authors reported that the products exhibited flavour, texture and composition comparable with those of the control, indicating that the addition of lactobacilli had no adverse effect on sensory criteria, and did not alter its composition, as observed in the present study with pigeon pea and oats cream.

Fermentation leads to a general improvement in the shelf life, texture, taste and aroma of the final product. During cereal fermentations, several volatile compounds are formed, which contribute to a complex blend of flavours in the products (Chavan and Kadam 1989). The presence of aromas representative of diacetyl, acetic acid and butyric acid make fermented cereal-based products more appetizing (Blandino et al. 2003).

Conclusion

The present work is the first study investigating the potential use of *L. reuteri* (and specifically *L. reuteri* ATCC 55730) in pigeon pea and oat-based products, and shows that this type of substrates is suitable and can support a high level of viable cells during refrigerated storage for 28 days. The viability of the microorganism was always above the recommended levels of 10^6 – 10^7 cfu/g. All the creams had a high degree of likeness for all attributes evaluated. The addition of *L. reuteri* did not affect colour, flavour, texture and chemical composition of the creams. Also, the combination of oats and pigeon pea is very helpful, because the amino acids of both types of food are combined to form a complete protein and could be used as a means of resolving the problem of malnutrition associated with the consumption of cereal-based foods. Hence, the addition of *L. reuteri* to creams resulted in a product with great potential as a functional product with excellent sensory characteristics.

Declaration of interest:

The authors would like to thank Zulia University Human and Scientific Development Council

(CONDES-LUZ) for the financial support. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Amarteifio JO, Munthali DC, Karikari SK, Morke TK. 2002. The composition of Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) grown in Botswana. *Plant Foods Hum Nutr* 57:173–177.
- Amjad I, Khalil IA, Shah H. 2003. Nutritional yield and amino acid profile of rice protein as influenced by nitrogen fertilizer. *Sarh J Agric* 19:127–134.
- Angelov A, Gotcheva V, Kuncheva R, Hristozova T. 2006. Development of a new oat-based probiotic drink. *Int J Food Microbiol* 112:75–80.
- Aragon-Alegro LC, Alegro JH, Cardarelli HR, Chiu MC, Saad SM. 2007. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. *LWT – Food Sci Technol* 40:669–675.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 2000. Official methods of analysis of AOAC. International 17th edn Gaithersburg, USA.
- Axelsson L, Chung T, Dobrogosz W, Lindgren S. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecol Health Dis* 4:2131–2136.
- Betoret N, Puente L, Diaz M, Pagán M, García M, Gras M, et al. 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. *J Food Engin* 56:273–277.
- Blandino A, AL-Aseeri M, Pandiella S, Cantero D, Webb C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int* 36: 527–543.
- Casas I, Dobrogosz W. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecol Health Dis* 12: 247–285.
- Charalampopoulos D, Pandiella S, Webb C. 2002. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *J Appl Microbiol* 92:851–859.
- Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C. 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *Int J Food Microbiol* 82:133–141.
- Chavan J, Kadam S. 1989. Critical reviews in food science and nutrition. *Food Sci* 28:348–400.
- Connolly E. 2004. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 a clinically proven probiotic. *Nutrafoods* 3:15–22.
- Correa S, Castro I, Saad M. 2008. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *Int J Food Sci Technol* 43: 1560–1568.
- Dobrogosz W, Peacock T, Hassan H. 2010. Evolution of the probiotic concept: from conception to validation and acceptance in medical science. *Adv Appl Microbiol* 72:1–41.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm Accessed on 5th August 2009.
- Farzana W, Khalil IA. 1999. Protein quality of tropical food legumes. *J Food Sci Technol* 23:13–19.
- Gänzle MG, Vogel R. 2003. Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in industrial sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol* 80: 31–45.
- Gomes AM, Malaca FX. 1999. *Bifidobacterium spp.* & *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Technol* 10:139–157.
- Heller JK. 2001. Probiotic bacteria in fermented food: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr* 73(Suppl.): 374S–379S.
- Hekmat SW, Soltani H, Reid G. 2009. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yoghurt for use as a functional food. *Innov Food Sci Emerg Tech* 10:293–296.
- Hidalgo M, Robles V, Garcia H. 2005. *Lactobacillus reuteri* β -galactosidase activity and low milk acidification ability. *Can J Microbiol* 51:261–267.
- Johansson M, Molin G, Jeppsson S, Nobaek S, Ahrne S, Bengmark S. 1993. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl Environ Microbiol* 59:15–20.
- Kailasapathy K, Chin J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. *Immun Cell Biology* 78:80–88.
- Karvonen A, Casas I, Versikari T. 2001. Safety and possible anti-diarrhea effect of probiotic *Lactobacillus reuteri* after oral administration to neonates. *Clin Nutr* 20:58–63.
- Kedia G, Wang R, Patel H, Pandiella S. 2007. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. *Process Biochem* 42:65–70.
- Khattab R, Arntfield R. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *LWT Food Sci Tech* 42:1113–1118.
- Klaenhammer TR, Kullen MJ. 1999. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol* 50:45–57.
- Livesey G. 1995. Metabolizable energy of macronutrients. *Am J Clin Nutr* 62:1135–1142.
- Lucas R, Donawa A. 1991. Potential uses of pigeon pea in the small scale manufacture of fermented sausages in the Caribbean. *Tropical Agr* 23:26.
- Marklinder I, Lönnér C. 1992. Fermentation properties of intestinal strains of *Lactobacillus*, of a sour dough and of a yoghurt starter culture in an oat-based nutritive solution. *Food Microbiol* 197:205.
- Martensson O, Oste R, Holst O. 2002. The effect of yoghurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products. *Food Res Int* 35:775–784.
- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fonden R, Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J* 173(12)–182.
- Micanel L, Haynes N, Palyne M. 1997. Viability of probiotic cultures in commercial Australian yoghurts. *Aust J Dairy Technol* 24:27.
- Muthukumarasamy P, Holley R. 2005. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol* 111:164–169.
- Niva M. 2007. All foods affect health: understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite* 48:384–393.
- Oberman H, Libudzisz Z. 1998. Fermented milks. In: Wood BJB, editor. *Microbiology of fermented foods*. Vol. 1. London: Blackie Academic and Professional. p 308–349.
- Ranadheera RC, Baines SK, Adams MC. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res Int* 43:1–7.
- Saarela M, Virkajarvi I, Alakomi HL, Sigvard-Mattila P, Matto J. 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *Int Dairy J* 16:1477–1482.
- Sangeeta C, Neelam K. 2001. Probiotic fermentation of indigenous food mixture: effect on antinutrients and digestibility of starch and protein. *J Food Com Anal* 14:601–609.
- SAS PROC GLM. SAS User's guide: statistics. 1997. 5th ed, Carry, NC: SAS Institute INC..
- Shah NP. 2000. Probiotic bacteria. Selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83:894–907.
- Shortt C. 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci Tech* 10:411–417.

- Singh U. 1998. Anti-nutritional factors of pea and pigeon pea and their removal by processing. *Plant Foods Hum Nutr* 251: 251–261.
- Singh N, Sandhu KS, Kaur M. 2004. Characterization of starches from Indian chickpea (*Cicer arietinum L.*) cultivars. *J Food Engin* 63:441–449.
- Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. 1998. Probiotic cheese. *Int Dairy J* 8:491–496.
- Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70:1176–1181.
- Vasiljevic T, Shah NP. 2008. Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* 18:714–728.
- Vidal-Valverde C, Frias J, Valverde S. 1993. Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. *J Am Diet Ass* 93:547–550.
- Zárate G, Chaia AP, Gonzalez S, Oliver G. 2000. Viability and α galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J Food Protect* 63:1214–1221.
- Xanthopoulos V, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetaki N. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjunct. *Food Microbiol* 17:205–215.

ANEXO II

Artículo publicado en el *Advance Journal of Food Science and Technology*

Formulation and Evaluation of Corn Pancakes Containing Bovine Plasma Protein and Tender Corn

¹Y.M. Barboza, ¹E.J. Márquez, ¹B.M. Benítez, ¹K.C. Parra, ¹M.P. Piñero and ²L.M. Medina

¹Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Nutrición. Facultad de Medicina. Escuela de Nutrición y Dietética. Universidad del Zulia, Apartado 4003, Maracaibo, Venezuela.

²Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Edificio Darwin, Anexo. Campus Universitario Rabanales, Universidad de Córdoba. E-14071, Córdoba, Spain.

Abstract: The purpose of this research was to fortify and evaluate some nutritional properties of a new product (corn pancakes), prepared with tender corn and bovine plasmatic protein. In doing so, two products were formulated. Both products were analyzed to determine their yield as well as their content of protein, fat, fiber, moisture, ash and essential amino acids. In addition to that, microbiological quality, degree of likeness, protein efficiency ratio and digestibility were also analyzed. All the results showed that the product containing bovine plasma had a higher yield, moisture and protein content ($p < 0.05$). In almost all cases, the product containing bovine plasma met or exceeded the established ideal requirements of essential amino acids. The Protein Efficiency Ratio (PER), shows that the animals fed with the experimental diet, showed a weight gain of 2.64 g per each g of protein intake. Corn pancakes had acceptable sensory score 88.4% for taste and 95.3% for color. In conclusion, due to its acceptability and highly nutritious value, the product containing bovine plasma could be used as an alternative to help solve the nutritional problems the population is facing these days.

Keywords: Amino acid, bovine plasma, chemical composition, corn pancakes, nutritional quality

INTRODUCTION

The growth of world demand for protein-enriched products generates a great interest in the search of new protein sources of higher nutritional value and, therefore, in the use of cutting edge technologies to achieve that goal. Blood plasma protein has been extensively used because of its functional and nutritional properties (Tybor and Dill, 1975; Márquez *et al.*, 1997; Viviane *et al.*, 2003; Del Hoyo *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010). Various food applications for blood plasma have been reported in the literature. Blood plasma has been incorporated into products such as cookies, pasta, meat products, protein-based films, *Lactobacillus* culture medium etc. (Barboza *et al.*, 1997; Yousif *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2005; Benítez *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011).

The main functional properties of plasma proteins are the ability to produce and stabilize foams and emulsions and the ability to form heat-induced gels (Suter *et al.*, 1976; Pares *et al.*, 1998; Cofrades *et al.*, 2000; Pietrasik *et al.*, 2007). Studies on gelling, emulsifying and foaming abilities suggest that plasma could replace some widespread ingredients, such as egg albumen and may

increase their nutritional value (Račker *et al.*, 1995; Viviane *et al.*, 2003; Davila *et al.*, 2007; Del Hoyo *et al.*, 2008).

Plasma proteins have good functional properties, thus making it easy to incorporate them into protein-deficient foods for improving their nutritional and functional properties.

Maize contains 7-13 g/100 g proteins. However, the quality of maize proteins is poor, because they are deficient in the essential amino acids lysine and tryptophan and hence should be supplemented with proteins rich in these amino acids so as to optimize the utilization of the proteins supplied in the diet (Milán-Carrillo *et al.*, 2006).

Three approaches have been tried: genetic manipulation, processing and fortification (Ortega and Bates, 1983; Ayala *et al.*, 2009; Gómez-Galera *et al.*, 2010; Naqvi *et al.*, 2011). There have been many efforts to fortify maize, with outstanding results, but unfortunately fortification has not been implemented to a large extend (Ortega and Bates, 1983).

In Venezuela corn is used to prepare arepa (Cuevas *et al.*, 1985) and corn pancakes. The introduction of new food products with organoleptic characteristics similar to

Corresponding Author: Y.M. Barboza, Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Nutrición. Facultad de Medicina. Escuela de Nutrición y Dietética. Universidad del Zulia, Apartado 4003, Maracaibo, Venezuela, Tel.: + 58 414 6165659; + 58 261 7441088

the traditional ones, would contribute to better and faster consumer acceptability; so every technique, aimed to improve and increase the nutritious value of any particular food, intended for human consumption, represents a challenge. Therefore, the purpose of this research was to fortify and evaluate a new product (corn pancakes), prepared with tender corn and bovine plasmatic protein, which could be used as food alternative for the population.

MATERIALS AND METHODS

Blood samples and separation of plasma proteins: Blood was obtained from an industrial slaughter house using sterile bleeding containers containing sodium citrate as anticoagulant (2% w/v final concentration). The blood was immediately taken to the laboratory, where it was centrifuge (INTERNATIONAL™ K N° 69984M23) at 2500 x g for 30 min to separate the red cells and plasma. Plasma was kept at 4°C until use.

Raw material: The tender corn (*Zea mays* L.) was obtained from a local supermarket. It was then peeled and the kernels were separated from the cob using a stainless steel knife and kept in sealed plastic containers.

Experimental design and formulation: The research was done in two phases. The first one helped determine the feasibility of using bovine plasmatic protein as a fortifying ingredient in the preparation of corn pancakes. In doing so, several formulas were attempted in order to select one, which would allow the use of the greatest amount of plasma without affecting the mixture, when being processed to obtain the final product. During this research, a total of 6 formulas were presented namely A, B, C, D, E and F. Formula A (control, without plasma) was made with 53.5% tender corn and 40% water; formula B contained 65.5% tender corn and 30% plasma; formula C had 58.5% tender corn and 35% plasma; formula D was made with 53.5% tender corn and 40% plasma; formula E contained 48.5% tender corn and 45% plasma; finally, formula F was made with 43.5% tender corn and 50% plasma. The rest of the ingredients, sugar (6%) and salt (0.5%), were added in equal proportions to all formulas.

Table 1: Ingredients (g/100)

Ingredients	Formulation	
	A (%)*	D (%)*
Tender corn	53.5	53.5
Water	40	-
Plasma	-	40
Sugar	6	6
Salt	0.5	0.5

* (A: Control; D: Product formulated with plasmatic protein)

During the second phase, a total of 216 samples (108 without plasma and 108 with plasma) were prepared during a period of 3 months, at a rate of 36 "corn pancakes" every 15 days (6 batches). The D formula was selected out of all formulas. The ingredients used to prepare formulas A (control) and D are shown on Table 1. The kernels were separated from the cob and processed for one minute in a blender (ELECTROMASTER™). Then the rest of the ingredients were added and processed for another minute. Following that, the mixture was divided into portions of 100 g and cooked for 1 min then turned over and cooked for another minute, using a Teflon® frying pan. To complete the cooking phase, the corn pancakes were turned over again to the original side. The corn pancakes were packed in individual plastic bags and stored in a refrigerator at 4°C for 1, 2, 3, 4 and 5 days.

Cook yield: Cooking yield of corn pancakes was determined by measuring the weight of six units for each batch and calculating weight differences for corn pancakes before and after cooking according to the following equation:

$$\text{Cooking yield (\%)} = \frac{\text{Cooked weight} \times 100}{\text{Raw weight}}$$

Chemical analysis: A total of 6 units (corn pancakes) were selected randomly from each batch. They were homogenized using a food processor (OSTER™) and kept refrigerated at a temperature of 5°C until they were analyzed. The content of proteins, fat, crude fiber, ashes and humidity of the final product were determined following the method established by (AOAC, 2004). The metabolic energy was determined using the empirical method proposed by Livesey (1995).

Amino acid analysis: Amino acids were analyzed by high performance liquid chromatography. A Shimadzu model LCC-6A HPLC, equipped with a FLD-6A fluorescence detector, two LC 6A pumps, a SCL-6B auto injector, CTO-6A column oven and C-R4A chromatopack integrator was used throughout the experiments.

An altex ultrasphere ODS, C-18, 15 cm length x 4 mm ID, 5 µm column was used. Two solvent systems were used. Solvent A was composed of acetate buffer (0.05 M), methanol and tetrahydrofurane (80:19:1). Solvent B was composed of methanol and acetate buffer (80:20). A Sigma laboratory standard solution 50 µmol/mL amino acid concentrations was used as a reference.

A precolumn derivatization of the amino acids was performed. Samples of 0.02 mL were injected into the column. Flow rate was 1 mL/min. Fluorescence was read at 470 nm with an excitation wave length of 350 nm. Peak areas were used for quantitative calculations.

Biological tests: The protein quality of the product, made with tender corn and bovine plasmatic protein, was determined by means of using the Protein Efficiency Ratio (PER) and the Apparent Digestibility (AD), following the methods proposed by the AOAC (2004). To do so, 20 recently weaned Sprague Dawley male rats were used. They were divided into groups of 10 and placed in individual galvanized wire-net-floor cages, under the same environmental conditions, which are temperature, air and lighting (12 h light/12 h darkness). Before starting the research, the rats were acclimatized for 3 days; one group was fed a controlled diet based on casein and the other was fed with the product made with tender corn and plasmatic protein, previously dehydrated at a temperature of 100°C on a 3536 LAB-LINE™ conventional stove.

The food and water intake was provided ad libitum. The apparent digestibility was measured during the first ten days of the research; while the protein efficiency rate was taken on the 28th day.

Sensory assessment: A untrained panel of 215 children of both sexes, whose ages ranged from 10 to 14 chosen from the fifth and sixth grade of a local elementary school; assessed cooked corn pancakes for two sensory attributes colour and taste for degree of likeness. White plastic plates labeled with four digit codes from a random number table were used to conceal the identity of the corn pancakes samples. Samples (50 g) were served in random order to the child, isolated in partitioned booths illuminated with white fluorescent light.

The product was offered once a day, during school week, to each fifth and sixth grade section; in both, morning (9:00 AM) and afternoon (3:00 PM) sessions. Water was provided to each child as a means for cleansing and rinsing their palates between each sample. All data was recorded on an instrument designed for such purpose using a 5-point hedonic scale. The evaluation scale was as follows: I like it very much, I like it, it makes no difference to me, I do not like it very much and I do not like it at all.

Microbiological analysis: Eleven grams from each sample were aseptically weighed into sterile jars. Samples were blended for 2 min at high speed after the addition of 99 mL of 0.1 peptone (Oxoid, Basingstoke, UK) solution. Aliquots (1 mL) of sample were serially diluted in 9 mL of sterile 0.1 peptone solution. Sevenfold serial dilutions were carried out. Each dilution was spread-plated and duplicated, on plate count agar (Difco Laboratories, Sparks, Md) for enumeration of total viable counts at 35°C for 24 to 48 h. Petrifilm plates were used to determine (in duplicate) coliform count, *E. coli* count and fungus and yeast. The procedures followed were those developed and outlined by 3M™ (St. Paul, Minn). The

Table 2: Mean values (g/100) of cooking yield and chemical composition of corn pancakes

Attributes	Formulation A*	Formulation D*
Cooking yield	77.17±0.16 ^b	80.74±0.16 ^a
Humidity	58.58±0.12 ^b	63.28±0.12 ^a
Protein	3.54±0.04 ^b	6.47±0.04 ^a
Fat	0.93±0.02	0.98±0.02
Fiber	1.45±0.04	1.40±0.04
Carbohydrates	26.03±0.02	26.97±0.02
Ash	0.80±0.02	0.90±0.02
Caloric energy (Kcal.)	126.65±0.04 ^b	136.82±0.04 ^a

Means with different superscript differ significantly (p<0.05) as indicated by LSD procedure; * (A: Control; D: Product formulated with plasmatic protein)

manufacturer's written instructions were followed. Bacterial counts were transformed to logs.

Statistical analysis: The statistical analysis of the final results was performed using a mixed model, which included the fixed effect and the random effect of the sample on the observations. The differences between means were obtained with T student tests. Data was analyzed by the general linear model procedure of the Statistical Analytical System (SAS PROC GLM, 1997). The predetermined acceptable level of probability was 5% (p<0.05) for all comparisons.

RESULTS AND DISCUSSION

The D formula was selected out of all formulas; since it allowed the greatest addition of plasma (40%), without affecting the technical handling of the mixture or the organoleptic characteristics of the final product. Table 2 shows the mean values regarding cook yield, moisture, protein, fat, raw fiber, carbohydrates, ashes and caloric energy for formulas A (without plasma) and D (with plasma).

Cook yield: Significant differences were found between the two of them (p<0.05). The formula with plasma presented the highest yield (80.74±0.16 g/100) while the one without plasma had lower yield (77.17±0.16 g/100). The higher yield, given by the product with plasma, could be attributed to the binding properties of the plasmatic protein. Barboza *et al.* (1996), point out that the positive effect, the bovine plasma has over the yield and the binding action, is due to its unique gelation property. In addition, if it is used at a protein concentration of 4.5%, this property will not be affected by refrigerating or freezing temperature.

Many researches have confirmed the gelation property of proteins to be a functional one, essential in the preparation of various types of food; since it increases water absorption, thickness, stickiness and emulsion. Márquez *et al.* (1997) point out that the use of plasma instead of water, when preparing meat products, improves their yield; since the gel it produces helps retain fat and water, thus reducing product loss at the moment of cooking.

Table 3: Essential amino acid profile (g/100g of protein) of product formulated with plasmatic protein and tender corn and amino acids profile reported by FAO/WHO

Amino acid	Product with plasmatic protein	FAO/WHO (1991)* (standard)
Histidine	3.89±0.27	1.9
Isoleucine	3.82±0.33	2.8
Leucina	9.02±0.42	6.6
Lysine	5.72±0.20	5.8
Methionine	1.60±0.45	2.5**
Phenylalanine + tyrosine	7.22±0.64	6.3
Threonine	4.43±0.33	3.4
Valine	4.02±0.42	3.5

Food and Agriculture Organization/World Health Organization; *: Methionine + cysteine

The gel-forming ability upon heating is probably the most interesting attribute of plasma, because many food products go through a thermal treatment prior to commercialization. Under appropriate conditions, a three-dimensional network may be formed, contributing to the development of the internal structure of the foods such as desirable texture characteristics and improved properties like water holding capacity (Hermansson, 1982). It has been shown that protein interactions played a key role in the development of the gels physical properties and this behavior had to be taken into account particularly because the use of plasma proteins as ingredients in the food industry is influenced by the proportion of each major constituent in the formulated functional products (Davila *et al.*, 2007).

Moisture, proteins, fat, raw fiber, carbohydrates and caloric energy: A significant difference ($p < 0.05$), regarding moisture, was found between the two formulas. The product with plasma showed a higher moisture content (63.28 g/100); it was probably due to the fact that the proteins found in the plasma denature during cooking, thus causing the product retain additional humidity and therefore making it softer. Therefore, retention of water in corn pancakes is important since excessive water loss makes an unacceptable product.

Fulfilling all expectations, the results of this research indicated there were significant differences between the two formulas, regarding protein content ($p < 0.05$). The product with plasma showed a have higher protein content (6.47±0.04 g/100), while the one without plasma showed to be (3.54±0.04 g/100). This could be attributed to the fact that the addition of plasma increases the low protein content of the product. This indicates that the addition of plasma, which is high in the amino acid lysine, produces a positive nutritional effect in the resulting product. Including this product in the children's diet would contribute to satisfy the standard protein daily requirements.

From the data shown in Table 2, there was no significant difference between the two products in fat content; this could be attributed to the minimum concentration of fat found in plasma and the low percentage (1%) of it found in tender corn (Bressani and

Table 4: Protein quality of corn pancakes prepared with tender corn and plasmatic protein

Parameters	*Control diet	Experimental diet
Apparent digestibility (%)	78.94	81.08
PER	3.03 ^a ±0.80	2.64 ^b ±0.78

Means with different superscript differ significantly ($p < 0.05$) as indicated by LSD procedure Diet based on casein

Mertz, 1988). This research revealed that the product with addition of plasma represents an important source of fiber (1.40 g). The content of ashes was similar in both formulas.

Amino acids: Once the results, obtained from analyzing the product with plasma, were compared to the profile of essential amino acids (Table 3), proposed by the Food and Agriculture Organization/World Health Organization, it was clearly shown that they are above the standard requirements; with the exception of methionine, which could not be compared to the parameter established by the (FAO, 1991), since these institutions report its value as the sum of sulfur amino acids (methionine + cysteine). As it was indicated previously, the corn quality is limited due to its deficient in of certain essential amino acid, especially lysine and tryptophan; however, it contains sulfur amino acids such as methionine and cysteine (Bressani and Mertz, 1988).

Animal blood proteins are similar to egg proteins, which are considered well balanced, where the essential amino acids are found in adequate proportions; however, due to the deficiency in isoleucine and methionine found in the blood, it should be supplied along with other proteins which can compensate for the deficiency of these amino acids (Marquez *et al.*, 2005). This research determined that the combination of methionine and lysine found in corn and plasma respectively, helped obtain a product with a higher protein value.

Biological evaluation: Table 4 shows the apparent digestibility and the protein efficiency ratio of the product with plasma. According to the results, experimental diet proteins are very digestible; considering that out of the total protein ingested (4.30 g) only 18.92% was excreted while the rest (81.08%) was digested. Oropeza and Ortiz (1989) reported lower digestibility values (66.54 and 70.25%), compared to the ones reported by this research, after testing several tender hybrid corn kernels; while other authors have reported a plasma digestibility that ranges between 83 and 92% (Del Rio de Reys *et al.*, 1980).

The Protein Efficiency Ratio (PER) obtained in this research, shows that the animals fed with the experimental diet, experienced a weight gain of 2.64 g per each g of protein ingested; which confirms that the proteins used in the formula are capable of sustaining and helping the growth of young animals.

Oropeza and Ortiz (1989), after evaluating the kernel's protein quality of several corn hybrids through

Table 5: Sensorial evaluation of corn pancakes prepared with tender corn and plasmatic protein

Degree of likeness	percentage/formulation		percentage/formulation	
Scale taste colour	D *	A *	D *	A *
I like it very much	88.4	87.9	95.3	94.9
I like it	10.2	8.8	4.7	4.2
It makes no difference	0.9	3.3	0.9	0.9

A: Control; D: Product, with tender corn and plasmatic protein

Table 6: Mean values (log cfu/g) for aerobic plate count (RTA), *E. coli* and fungus and yeast (HL) in corn pancakes prepared with tender corn and plasmatic protein

Days	RTA	EC	HL
0	2.52 ^a ±0.04	<1±0.0	<1 ^a ±0.01
1	4.02 ^b ±0.02	<1±0.0	1.24 ^b ±0.02
2	4.45 ^b ±0.04	<1±0.0	2.56 ^c ±0.04
3	5.00 ^c ±0.02	<1±0.0	3.26 ^d ±0.03
4	5.99 ^d ±0.02	<1±0.0	3.78 ^d ±0.03

a, b, c, d: Means with different superscript differ significantly (p<0.05) as indicated by LSD procedure

biological and chemical tests, using casein as a control agent, reported values of 1.57 and 1.74 for corn and 3.41 for casein control. When comparing these results to the ones obtained in this research (PER 2.64), it is evident that the addition of plasma improves considerably the protein efficiency.

Sensorial evaluation: The result of the degree of likeness test show no significant difference between the two formulas; furthermore it was shown that out of all the children who formed the tasting panel, 88.3% accepted the product for its taste, while 95.3% did it for its color (Table 5). The addition of plasmatic protein to the formula, did not affect the taste or the color. It is important to emphasize that none of the children showed total displeasure for the product.

Even though the texture was not evaluated, it was shown that the plasma gave the product better consistence and softer texture; thanks to the functional properties of the plasma, which as well as the albumin and globulin, found in egg white make the air intake easier during the whisking process. Bovine blood plasma proteins are equivalent in functional aspects to egg albumen (Lee *et al.*, 1991) providing heat coagulation properties similar to natural egg in cereal products (Duxbury, 1988).

Microbiological evaluation: Table 6 shows the results of the microbiological growth on the corn pancakes during storage under condition evaluated. The initial total viable count was 2.52±0.04 log ufc/g at day 0, which indicates an acceptable initial microbiological quality and no fungus, yeast, or *E. coli* were found. These values increased during storage; reaching on the fourth day, values of 5.99±0.02 log ufc/g for aerobics and 3.78±0.03 log ufc/g for fungus and yeast. This helped establish the shelf life of the product, which can be estimated to be 3 days. The results of this research were interpreted based on acceptability limitations selected from previous researches as well as some recommended norms (Curtis *et al.*, 2000).

CONCLUSION

After evaluating the results obtained related to the product acceptability and protein quality, not only for having the right amount of essential amino acid but for its excellent digestibility and PER, it is evident that this product could be used as a means of resolving the problem of malnutrition associated with the consumption of cereal-based foods due to their low protein content. The plasma gave the product better consistence and softer texture; thanks to the functional properties of the plasma. Corn fortification with plasma has led to improvements of the protein quantity and quality of this food.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Zulia University Human and Scientific Development Council (CONDES-LUZ) for sponsoring this research.

REFERENCES

- AOAC, 2004. Official Methods of Analysis. 18th Edn., Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA., USA.
- Ayala, A., R. Gutiérrez, J. Milán, S. Rochín, J. López, A. Valdez, O. Paredes and C. Reyes, 2009. Nixtamalised flour and tortillas from transgenic maize (*Zea mays* L.) expressing amarantin: Technological and nutritional properties. Food Chem., 114: 50-56.
- Barboza, Y., L. Rangel, A. Archile, P. Izquierdo and E. Márquez, 1996. Estudios de algunos factores que afectan las propiedades de gelación del plasma sanguíneo animal. Rev. Cient. FCV-LUZ., 6: 31-36.
- Barboza, Y., E. Márquez, O. Gómez and L. Rangel, 1997. Development of a bovine plasma medium for propagation of Lactobacilli. J. Food Sci. Technol., 34: 261-263.
- Benítez, B., A. Archile, L. Rangel, K. Ferrer, Y. Barboza and E. Márquez, 2008. Proximal analysis, microbiological and sensory evaluation of a cookie made of cassava flour and bovine plasma. Interciencia, 33: 61-65.
- Bressani, R. and E. Mertz, 1988. Studies on Corn protein. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. Cereal Chem., 35: 227-235.
- Cofrades, S., M. Guerra, J. Carballo, F. Fernández-Martin and F. Jiménez-Colmenero, 2000. Plasma protein and soy fibre content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. J. Food Sci., 65: 281-287.
- Cuevas, R., E. Figueroa and E. Racca, 1985. The technology for industrial production of precooked corn flours in Venezuela. Cereal Foods World, 30: 707-712.

- Curtis, M.L., O. Franceschi and N. Castro 2000. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50: 177-182.
- Davila, E., D. Pares, G. Cuvelier and P. Relkin, 2007. Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Sci.*, 76: 216-225.
- Del Hoyo, P., M. Rendueles and M. Díaz, 2008. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Sci.*, 78: 522-528.
- Del Rio de Reys, M.T., S.M. Constantinides, V.C. Sgarbieri and A.A. Eldash, 1980. Chicken blood plasma proteins. Physicochemical nutritional and functional properties. *J. Food Sci.*, 45: 17-20.
- Duxbury, D.D., 1988. Powdered beef plasma replaces eggs in cakes. *Food Processing (USA)*, 49: 73-74.
- FAO/WHO, 1991. Protein quality evaluation Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation FAO Food and Nutrition Paper 51, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Gómez-Galera, S., E. Rojas, D. Sudhakar, C. Zhu, A. Pelacho, T. Capell and P. Christou, 2010. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transg. Res.*, 19: 65-80.
- Hermansson, A.M., 1982. Gel characteristics-structure as related to texture and water binding of blood-plasma gels. *J. Food Sci.*, 47: 1965-1972.
- Herrero, A.M., M.I. Cambero, J.A. Ordóñez, L. Hoz and P. Carmona, 2009. Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chem.*, 113: 493-499.
- Lee, C.C., L.A. Johnson, J.A. Love and S. Johnson, 1991. Effect of processing and usage level on the performance of bovine plasma as an egg white substitute in cakes. *Cereal Chem.*, 68: 100-104.
- Livesey, G., 1995. Metabolizable energy of macronutrients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62: 1135-1142.
- Márquez, E., Y. Barboza, P. Izquierdo and G. Torres, 1997. Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsion type of meat product. *J. Food Sci. Technol.*, 34: 337-339.
- Marquez, E., M. Bracho, A. Archile, L. Rangel and B. Benitez, 2005. Proteins, isoleucine lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. *Food Chem.*, 3: 503-505.
- Milán-Carrillo, J., R. Gutiérrez-Dorado, J. Perales-Sánchez, E. Cuevas-Rodríguez, B. Ramírez-Wong and C. Reyes-Moreno, 2006. The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41: 727-736.
- Naqvi, S., K. Ramessar, G. Farré, M. Sabalza, B. Miralpeix, R. Twyman, T. Capell, C. Zhu and P. Christou, 2011. High-value products from transgenic maize. *Biotechnol. Adv.*, 29: 40-53.
- Ortega, E. and L. Bates, 1983. Biochemical and agronomic studies of two modified hard-endosperm opaque-2 maize (*Zea mays* L.) population. *Cereal Chem.*, 60: 107-111.
- Oropeza, E. and B.L. Ortiz, 1989. Evaluación nutricional de la proteína del grano de seis cultivares de maíz (*Zea Maíz* L.). *Rev. FA-LUZ.*, 15: 225-234.
- Pares, D., E. Saguer, J. Sauririna, J. Suñol and C. Carretero, 1998. Functional properties of heat induced gels from liquid and spray dried porcine blood plasma as influenced by pH. *J. Food Sci.*, 63: 958-961.
- Pietrasik, Z., A. Jarmoluk and P.J. Shand, 2007. Effect of non-meat proteins on hydration and textural properties of pork meat gels enhanced with microbial transglutaminase. *LWT-Food Sci. Technol.*, 40: 915-920.
- Račker, M.O. and L.A. Johnson, 1995. Thermal and functional properties of bovine blood plasma and egg white proteins. *J. Food Sci.*, 60: 685-690.
- Rodríguez, L., A. Pérez and M. Campderrós, 2010. Inulin like lyoprotectant of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. *Food Res. Int.*, 43: 788-796.
- Rodríguez, L., A. Rinaldoni, A. Padilla and M. Campderrós, 2011. Assessment of functional properties of bovine plasma proteins compared with other protein concentrates, Application in a hamburger formulation. *Am. J. Food Technol.*, 6: 235-243.
- Salgado, P., G. Fernandez, S. Drago and A. Mauri, 2011. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids.*, 25: 1433-1440.
- SAS PROC GLM, 1997. SAS User's Guide: Statistics. 5th Edn., SAS Institute INC., Cary NC
- Suter, D.A., E. Sustek, C.W. Dill, W.H. Marshall and Z.L. Carpenter, 1976. A method for measurement of the effect of blood protein concentrates on the binding forces in cooked ground beef patties. *J. Food Sci.*, 41: 1428-1432.
- Tybor, P.T. and C.W. Dill, 1975. Functional properties of proteins isolated from the bovine blood by a continuous pilot process. *J. Food Sci.*, 40: 155-159
- Viana, F.R., V.D. Silva, F.M. Delvivo, C.S. Bizzotto and M.P. Silvestre, 2005. Quality of ham paté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Sci.*, 70: 153-160.
- Viviane, D.M., V.D. Silva and M.P. Silvestre, 2003. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensm Wiss Technol.*, 36: 709-718.
- Yousif, A., P. Cranston and D. Deeth, 2003. Incorporation of bovine dry blood plasma into biscuit flour for the production of pasta. *Lebensm Wiss Technol.*, 36: 295-302.