

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA FERMENTACIÓN DE LICUADO DE AVENA (*Avena Sativa* L) CON MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ALTERNATIVA A LAS LECHES DE ORIGEN ANIMAL.

Suárez-Guzmán, L., Bernat, N., Cháfer, M.T.¹; Chiralt, A., González-Martínez, C.²

RESUMEN

En el presente trabajo se plantea el aprovechamiento de las grandes ventajas funcionales y nutricionales de los microorganismos probióticos combinados con la interesante composición de la avena (*Avena sativa*) para elaborar productos fermentados alternativos a las leches de origen animal. Para ello, se realizó un estudio preliminar del proceso fermentativo del licuado de avena con un cultivo mixto de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Streptococcus termophilus* CECT 986 como etapa previa a la elaboración de un producto probiótico. Se determinó la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos y se analizó la influencia de diferentes factores de crecimiento (glucosa, fructosa, inulina y cantidad de inóculo) aplicando un diseño central compuesto con superficies de respuesta en aras a optimizar la viabilidad del producto fermentado. Además se caracterizaron las principales propiedades físicas del fermentado de avena optimizado. La temperatura óptima de crecimiento de la mezcla de microorganismos fue de 40°C y la formulación óptima para conseguir viabilidad mayor a 10⁷ UFC/mL en el fermentado fue de 0.75% de glucosa, 0.75% de fructosa, 0.5% de inulina y 4% de inóculo.

Palabras clave: licuado de avena, probiótico, fermentación, superficie de respuesta, viabilidad, optimización.

ABSTRACT

Functional and nutritional advantages of probiotic bacteria combined with the interesting composition of Oats (*Avena sativa*) have been considered as an alternative of the traditional fermented dairy products. In the present study, a preliminary process of fermented oat with mixed bacteria culture of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Streptococcus termophilus* CECT 986 was analyzed as a previous stage to develop a probiotic product. Optimal growth temperature of bacteria was determined and a central composite

¹ mtchafer@tal.upv.es. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España.

² cgonza@tal.upv.es. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España.

design with response surface methodology was proposed to analyze and optimize the effect of two different levels of the growing factors glucose, fructose, inuline and starter culture on the final viable cell population of the fermented oat. Physical properties of the fermented oat were also determinate. Optimal temperature of the bacteria was 40°C and the final combination of growing factors to obtain a cell population above 10⁷CFU/mL was 0.75% of glucose, 0.75% of fructose, 0.5% of inuline and 4% of started culture.

Keywords: Oat, probiotic, fermentation, surface response methodology, optimization.

RESUM

En el present treball es planteja l'aprofitament dels grans avantatges funcionals i nutricionals dels microorganismos probiòtics combinats amb la interessant composició de la civada (*Avena sativa*) per elaborar productes fermentats alternatius a les llets d'origen animal. Així mateix, es va realitzar un estudi preliminar del procés fermentatiu del líquat de civada amb un cultiu mixte de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 i *Streptococcus termophilus* CECT 986 com una etapa prèvia a l'elaboració d'un producte probiòtic. Es va determinar la temperatura òptima de creixement dels microorganismes i es va analitzar la influència de diferents factors de creixement (glucosa, fructosa, inulina i quantitat de inòcul) aplicant un disseny central compost amb superfícies de resposta per optimitzar la viabilitat del producte fermentat. A més, es caracteritzaren les principals propietats físiques del fermentat de civada optimitzat. La temperatura òptima de creixement de la barreja de microorganismes va ser de 40°C i la formulació òptima per aconseguir la màxima viabilitat del fermentat (10⁷ UFC/mL) va ser de 0.75% de glucosa, 0.75% de fructosa, 0.75% de inulina i 4% de inòcul.

Paraules clau: líquat de civada, probiòtic, fermentació, superfície de resposta, viabilitat, optimització.

INTRODUCCION

Se definen como probióticos a los microorganismos vivos que ingeridos en cantidades suficientes, pueden conferir efectos beneficiosos en la salud del huésped, más allá de los nutricionales (Rivera y Gallardo, 2010). Uno de los requisitos para que un producto puede ser considerado probiótico es que debe contener al menos 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo de producto (UFC/g) (Martensson *et al.*, 2002). Los géneros de los microorganismos generalmente reconocidos con estas propiedades son *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* aunque también han sido investigadas especies del género *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* y *Propionibacterium* (Rivera y Gallardo, 2010). Sin embargo, para que puedan ser utilizadas como probióticas deben cumplir ciertas características: ser no patógenas, sobrevivir el paso por el tracto digestivo, colonizar el intestino delgado y el colon, adherirse al epitelio intestinal, producir sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), tener buenas características de crecimiento, promover el sistema inmune y las actividades metabólicas, mantener la viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento y resistir los procesos tecnológicos de los alimentos (Prado *et al.* 2008).

El uso de probióticos en la elaboración de productos alimenticios se ha dado desde la antigüedad como una forma de conservarlos y mejorar sus propiedades organolépticas. Actualmente son reconocidas por sus efectos nutricionales y beneficios sobre la salud, tales como: reducción del colesterol sanguíneo, prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, fortalecimiento del sistema inmune, formación de flora intestinal balanceada, disminución de la duración de diarreas, reducción de amonio y otros compuestos tóxicos, producción de algunas vitaminas del complejo B, disminución de infecciones gástricas por *Helicobacter pylori*, inhibición de células tumorales. Además pueden mejorar la digestión de la lactosa y contribuir a la inhibición del crecimiento de otros microorganismos patógenos debido a la producción de ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Prado *et al.*, 2008). Estos efectos sobre la salud están sujetos al tipo de cepa que se utilice para su elaboración (Sharareh *et al.*, 2009).

Los beneficios mencionados han hecho que en los últimos años, el consumo de bebidas y alimentos que contienen microorganismos probióticos haya aumentado de forma notable. Según indican Granato *et al.*, (2010), entre los años 2002 y el 2007, el consumo ha aumentado entorno al 13% en Europa occidental y al 18% en Europa oriental. Estos productos se han elaborado tradicionalmente por fermentación de leche de origen animal, siendo el yogur el más conocido dentro de este grupo, con un 36.6% de las ventas en Europa. No obstante, se han investigado otros medios para el crecimiento de los microorganismos probióticos, tales como carne, comida para bebés, helados, bebidas de frutas y cereales (Granato *et al.*, 2010). En este sentido muchas bebidas a base de soja, arroz, trigo y maíz tienen un gran potencial de mercado debido a que en los últimos años se ha incrementado la demanda de productos sustitutos de la leche (Martensson *et al.*, 2000) como una alternativa a consumidores vegetarianos, con alergias o intolerantes a la lactosa.

En este sentido, el uso de la avena como sustrato para elaborar productos probióticos supone interesantes características funcionales y nutricionales, lo que lo ha convertido en una fuente alimenticia de gran importancia para conseguir una dieta equilibrada. Su contenido en fibra soluble y no soluble previenen y alivian de diferentes enfermedades (Massod 2008). Su alto contenido en carbohidratos complejos como beta-glucanos, fuente de fibra soluble más importante que contiene este cereal, han demostrado que disminuyen de los niveles de colesterol en sangre, reducen los desordenes cardiovasculares, mejoran el metabolismo lipídico y de la glucosa (Massod *et al.* 2008), además de ejercer acción prebiótica en el organismo debido a que estimula el crecimiento de bifidobacterias y bacterias acidolácticas (Angelov *et al.*, 2005).

A pesar de las ventajas que tiene sobre la salud humana, los productos a base de avena han tenido poca aceptación por parte del consumidor debido a sus cualidades sensoriales. No obstante, procesos biotecnológicos como los fermentativos pueden ayudar a mejorar este aspecto, además de potenciar los beneficios sobre la salud y sus características nutricionales debido a la combinación de prebióticos con probióticos. Ensayos previos realizados en nuestro laboratorio con *Lactobacillus reuteri* demostraron que el pH del licuado bajó en menos de seis horas y la adición de *Streptococcus thermophilus* permitía mejorar sus propiedades organolépticas como sabor y aroma. El objetivo de esta investigación fue estudiar el proceso fermentativo del licuado de avena (*Avena Sativa*) con los microorganismos previamente seleccionados *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Streptococcus thermophilus* CECT 986. Para ello, primero se determinó la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos. En segundo lugar, se analizó el efecto de los diferentes factores de crecimiento (glucosa, fructosa e inulina) así como la cantidad de inóculo en aras a optimizar la viabilidad de los microorganismos al final de la fermentación. Por último, se caracterizó el fermentado de avena en sus principales propiedades físicas.

MATERIALES Y METODOS

Elaboración del licuado de avena

Para la elaboración del licuado de avena se utilizó un equipo a diseñado para la obtención de bebidas vegetales (Starsoja de Farmanutrients Labs, S.L, Barcelona, España). La materia prima utilizada fueron granos de avena pelada (*Avena sativa*) suministrados por Monserrat Antoli (Valencia-España). Los granos fueron triturados y posteriormente introducidos al filtro del equipo, donde se realizó una extracción solido-liquido de avena en agua en una proporción de 7% (p/v) (Angelov *et al.* 2005).

La extracción se realizó a 90°C por un periodo de 20 minutos con tres ciclos de moltura. Después el extracto obtenido se homogenizó en un Ultraturrax durante 3 minutos para su homogenización y se esterilizó (121°C durante 15 minutos) en un autoclave (modelo Presoclave II, JP-Selecta; Barcelona, España).

Preparación de cultivos iniciadores

La reactivación de *L. reuteri* se llevó a cabo por incubación durante 24 horas en caldo MRS en una proporción de 1g/10 mL. En el caso de *S. termophilus* se sembró en agar M17 y se incubó durante 48 horas. Posteriormente, ambas cepas se propagaron de forma independiente en caldo de cultivo MRS a 40°C e incubados durante 24 horas y después se almacenaron a una temperatura de 5°C.

Para la obtención de cada cultivo iniciador, las dos cepas se incubaron por separado en caldo MRS a 40°C por 12 horas, la cantidad de inóculo transferido fue de 1% (v/v). Posteriormente fueron centrifugados a 10000rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, el sobrenadante se desechó. Luego se diluyeron en agua peptonada y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Cada uno de los microorganismos se re suspendió en agua peptonada hasta su utilización en el proceso fermentativo. La cantidad de inóculo inicial para el proceso fermentativo fue de 10⁸ UFC/mL.

Proceso de fermentación

Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos.

Para determinar la temperatura óptima de crecimiento se realizaron tres ensayos por duplicado a cuatro temperaturas de incubación diferentes 37°C, 40°C, 42°C y 45°C. En el primer ensayo se incubó *L. reuteri*, en el segundo *S. termophilus* y en el tercero se incubaron ambos microorganismos (ratio 1:1). El crecimiento de los microorganismos se realizó en caldo MRS al 10% (v/v), durante 24 horas a la temperatura de trabajo. A intervalos de tiempo de una hora se tomó 1mL de la suspensión microbiana y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-Vis, Barcelona-España) con el fin de construir las curvas de crecimiento de cada uno de los microorganismos utilizados.

Las curvas de crecimiento obtenidas para las diferentes temperaturas se ajustaron al modelo primario de crecimiento según la ecuación modificada de Gompertz (Ecuación 1) para determinar los parámetros cinéticos de la velocidad máxima de crecimiento (μ_m) y la duración de la fase de latencia (λ).

$$y = A * \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m * e}{A} (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (1)$$

Donde:

A: Valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente

μ_m : Velocidad máxima de crecimiento

λ : Duración fase de latencia

e=2.718

Influencia de los factores de crecimiento

Para realizar la fermentación del licuado de avena se seleccionaron como variables los factores de crecimiento glucosa, fructosa e inulina, así como la cantidad de inóculo. Con el objetivo de encontrar la mejor combinación de factores de crecimiento y optimizar el proceso de fermentación, se eligió un diseño central compuesto aleatorizado con superficie de respuesta con cuatro factores, dos niveles, siete puntos centrales y ocho axiales. Los factores y niveles, (Tabla 1) fueron elegidos teniendo en cuenta estudios anteriores de avena fermentada con diferentes bacterias ácido lácticas (Angelov *et al.* 2005, Sumangala *et al.* 2005). Como variable de respuesta se fijó que el nivel de población de ambos microorganismos en el producto final fuera mayor a 10^7 UFC/mL, representado por Log_{10} (número de células viables* mL^{-1}), uno de los requisitos para poder considerar un producto como probiótico.

TABLA 1. Niveles de los factores del diseño experimental

Factor	Límite inferior (% p/v)	Límite superior (% p/v)
Glucosa	1.5	3.0
Fructosa	1.5	3.0
Inulina	1	2
Inóculo	5	7

El licuado de avena esterilizado, se dejó enfriar hasta una temperatura de 37°C con agitación constante para garantizar su homogeneidad. Posteriormente, se agregaron las diferentes concentraciones de los factores de crecimiento fructosa, glucosa e inulina y los cultivos iniciadores *L. reuteri* y *S. thermophilus* (ratio 1:1), según las concentraciones obtenidas en la matriz experimental al utilizar el programa estadístico Minitab 15.

La fermentación se llevó cabo a 31 formulaciones propuestas y a la temperatura seleccionada en la experiencia anterior (40°C). El pH se midió cada hora hasta que las muestras alcanzaron un nivel entre 4.4-4.6, momento en el cual se daba por finalizada la fermentación. A continuación se realizó el conteo de células viables en el producto mediante diluciones seriadas y siembra en placa en profundidad en agar MRS (15g/L) e incubados a 40°C durante 48 horas. (AOAC Official Method 966.23).

Validación de la respuesta óptima

La fórmula obtenida con la mejor combinación de factores se validó realizando el proceso fermentativo a la temperatura seleccionada (40°C). La viabilidad (UFC/mL) al final fue evaluada mediante siembra en placa. Las propiedades físicas de pH, conductividad, densidad, reología y color fueron determinadas como se describe a continuación.

Propiedades físicas

A continuación se detallan las mediciones realizadas al licuado y fermentado de avena optimizado. Todas se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente.

pH, densidad y conductividad

El pH se tomó con un pH-metro GLP 21+ (Crison Instruments S.A; Barcelona, España). Para la medida de densidad se utilizó un picnómetro Gay-Lussac de 50ml y para la conductividad se utilizó un conductímetro portátil modelo CM 35 (Crison Instruments S.A; Barcelona, España).

Propiedades reológicas

Para medir el comportamiento reológico del licuado de avena se usó un reómetro (HAKKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania), equipado con un cilindro concéntrico de punta cónica (Rotor Z34 DIN 53019 serie 1). Se realizaron dos barridos de gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$). Un primer barrido ascendente de 0 a 120 s⁻¹ y un segundo barrido descendente de 120 a 0 s⁻¹, a intervalos de tres segundos se registró el esfuerzo cortante (τ). Los datos fueron ajustados al modelo de Ostwald-de Waele determinándose los parámetros reológicos índice de consistencia (K) e índice de comportamiento al flujo (n), ecuación (2). Igualmente se calculó la viscosidad aparente para un gradiente de velocidad de 100s⁻¹, ecuación (3).

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

Donde,

K: Índice de consistencia

n: Índice de comportamiento al flujo

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (3)$$

Propiedades ópticas

El color se determinó con un espectocolorímetro modelo CM-3600 d (MINOLTA Co, Osaka, Japón), usando como sistema de referencia el observador 10° y el iluminante D65. El color se determinó a partir del espectro de reflexión en cubetas transparentes de 50x30x20mm para asegurar que se trabaja con una muestra de espesor infinito. A partir del espectro de reflexión se obtuvieron las coordenadas CIE L*a*b*. Las diferencias de color se evaluaron a través del índice de blancura (IB) y los parámetros croma (C*) tono (h_{ab}) y la diferencia de color ΔE, según las ecuaciones (4), (5) (6) y (7).

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (4)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

$$hab = \arctan(b^*/a^*) \quad (6)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \dots\dots\dots (7)$$

Análisis Estadístico

El análisis se realizó con el software para análisis estadístico MINITAB 15, obteniéndose de éste el análisis de varianza y el ajuste a comportamiento lineal y/o cuadrático para los 31 ensayos propuestos por la misma herramienta. El nivel de significación de los ensayos fue del 95%. Al final se optimizó la respuesta para encontrar la mejor combinación de factores de crecimiento e inóculo que favorecen el crecimiento microbiano.

Para el tratamiento de los demás datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor considerando un nivel de significación del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano es una de las principales variables a considerar cuando se trabaja con microorganismos, debido a la influencia que ésta tiene sobre las reacciones químicas y metabólicas catalizadas por las enzimas. Los microorganismos utilizados en este estudio tienen temperaturas óptimas de crecimiento diferentes y es importante conocer el comportamiento de los microorganismos y sus posibles fenómenos de interacción y así poder establecer las mejores condiciones de trabajo para fermentar el licuado de avena.

La Figura 1 muestran las curvas de crecimiento y el ajuste del modelo de *S. thermophilus*, *L. reuteri* de los cultivos aislados (Figura 1; A,B) como en forma combinada (Figura 1, C). Las curvas muestran un crecimiento exponencial que sucede entre la primera y las ocho horas de incubación. El efecto de la temperatura sobre la variable no mostró una influencia significativa ($p > 0.05$) para todos los ensayos evaluados. No obstante, y para profundizar en el análisis se llevó a cabo el ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz.

Los parámetros de cinéticos (Tabla 2) hallados con el ajuste del modelo de Gompertz muestran que, en general, la fase de latencia de los microorganismos estudiados no excede la hora de incubación tanto en los microorganismos por separado como juntos. A partir de este tiempo punto comienza el crecimiento exponencial donde la pendiente de esta zona corresponde a la velocidad específica de crecimiento. Para *S. thermophilus* esta velocidad es mayor cuando se incubaba a 45°C mientras que para *L.*

reuteri es a 42°C, sin embargo cuando las cepas están combinadas el mayor crecimiento se sitúa a 40°C (0.653). En base a esta evaluación se escogió 40°C como la temperatura óptima de crecimiento, lo cual es lógico ya que es la temperatura intermedia entre las temperaturas óptimas de crecimiento de cada uno (*S.thermophilus* es de 42°C y *L. reuteri* es de 37°C).

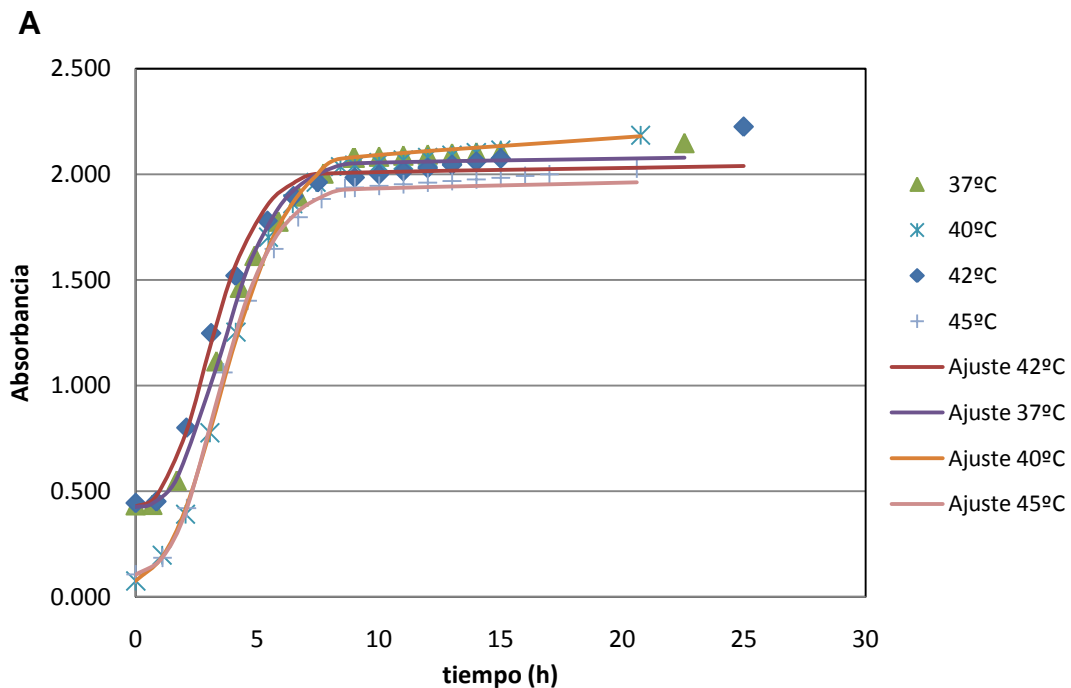
TABLA 2. Parámetros cinéticos de los microorganismos en función de la temperatura

	<i>S. thermophilus</i>		<i>L. reuteri</i>		Combinación	
	μ_m	λ	μ_m	λ	μ_m	λ
37°C	0.434	1.161	0.268	0.504	0.436	1.030
40°C	0.786	0.114	0.309	0.173	0.653	0.945
42°C	0.477	0.911	0.567	0.426	0.562	0.786
45°C	0.815	0.422	0.322	0.160	0.398	0.790

μ_m : Velocidad máxima de crecimiento ((absorbancia/mL)/h)

λ : Duración fase de latencia (h)

Finalmente, comparando las curvas de crecimiento se puede apreciar que cuando los microorganismos están juntos su interacción es de comensalismo, es decir que uno se beneficia del otro, mientras que el otro no se afecta. En este caso *L. reuteri* se beneficia de *S.thermophilus* bien sea porque produce factores de crecimiento que beneficia su desarrollo o porque hace aprovechables diferentes compuestos.



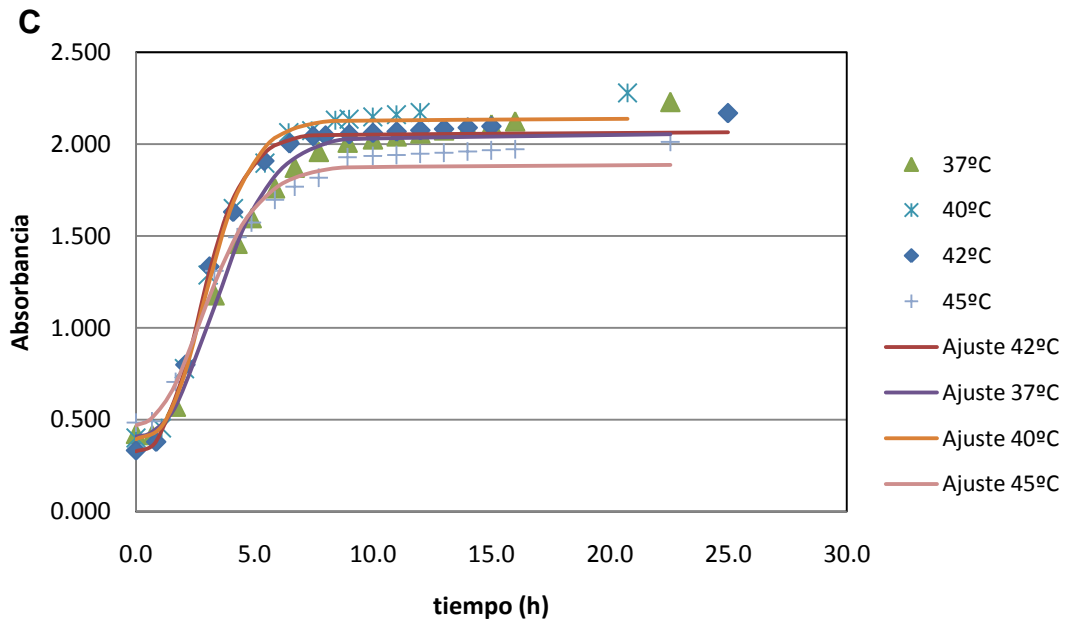
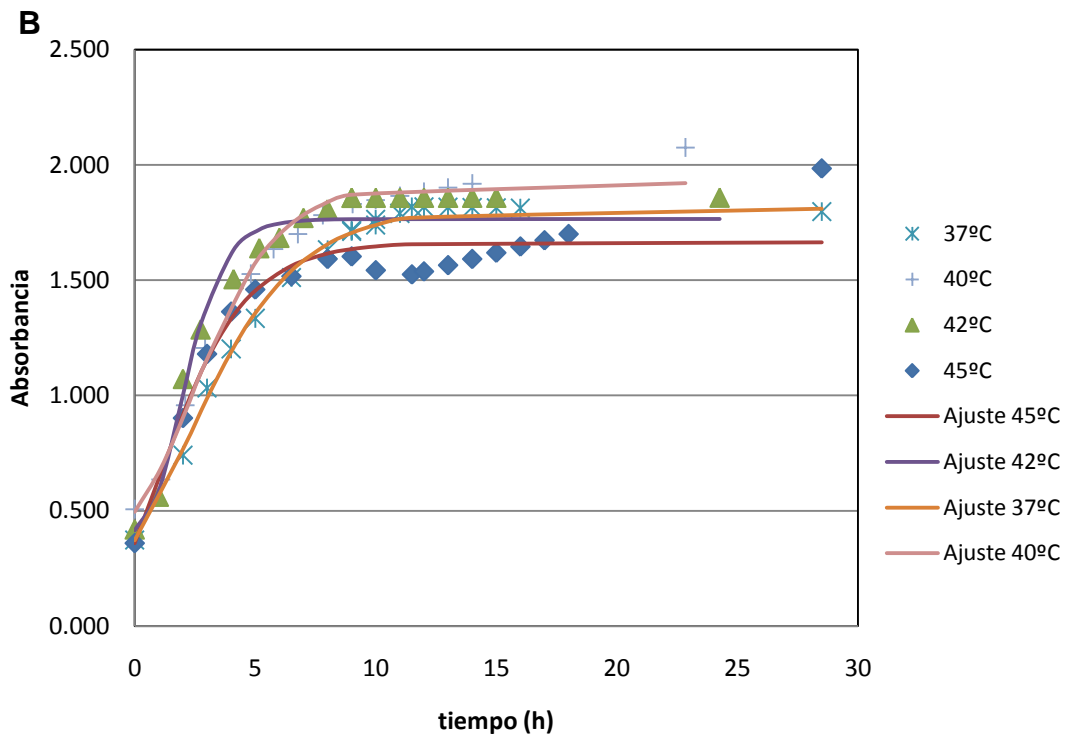


FIGURA 1. Curvas de crecimiento para los microorganismos estudiados a las cuatro temperaturas de experimentación. (A) *S.thermophilus* (B) *L. reuteri* (C) *S.thermophilus* y *L. reuteri* combinados.

Influencia de los factores de crecimiento en el licuado de avena

El tipo y concentración de nutrientes es clave para optimizar el crecimiento de los microorganismos, además de lograr una fermentación rápida que contribuya a disminuir el riesgo de contaminación en el producto final. La fermentación del licuado de avena se realizó teniendo en cuenta la matriz experimental del diseño central compuesto cuyos niveles y factores de crecimiento glucosa, fructosa e inulina y porcentaje de inóculo (mezcla de *S. thermophilus* y *L. reuteri* en un ratio 1:1) se indican en la Tabla 3. La respuesta de las diferentes combinaciones representado como Log_{10} (número de células viables $\times \text{mL}^{-1}$) se encuentra 7.4-10.2 Log_{10} (UFC/mL). Esta respuesta es superior a la población establecida inicialmente (7 Log_{10} UFC/mL), lo que indica que cualquier combinación de estos factores y en los niveles estudiados, sería adecuada para desarrollar un producto probiótico a base de avena. A continuación se va a profundizar en el análisis estadístico, examinando el efecto de la interacción de los diferentes factores en aras a optimizar la viabilidad del crecimiento de microorganismos al final del proceso fermentativo.

TABLA 3. Diseño experimental y población de microorganismos *S. thermophilus* y *L. reuteri* (Log_{10} UFC/mL) al final del proceso fermentativo.

	Glucosa (%)	Fructosa (%)	Inulina (%)	Inoculo (%)	Log_{10} UFC/mL
1	2.25	2.25	1.5	6	8.255
2	1.5	1.5	2	5	8.813
3	3	1.5	2	7	8.212
4	2.25	2.25	1.5	6	8.079
5	1.5	3	1	7	8.041
6	0.75	2.25	1.5	6	9.146
7	1.5	1.5	2	7	8.146
8	2.25	2.25	1.5	6	8.362
9	2.25	2.25	1.5	6	9.342
10	2.25	0.75	1.5	6	9.462
11	1.5	1.5	1	7	9.279
12	3	3	1	5	8.322
13	2.25	2.25	1.5	6	8.079
14	2.25	2.25	2.5	6	8.230
15	1.5	1.5	1	5	9.833
16	2.25	3.75	1.5	6	8.041
17	2.25	2.25	1.5	6	8.255
18	3	1.5	1	7	8.949
19	2.25	2.25	1.5	4	8.544
20	1.5	3	2	5	9.114

21	2.25	2.25	1.5	6	9.204
22	3	3	1	7	9.000
23	3	3	2	5	9.602
24	1.5	3	1	5	9.204
25	2.25	2.25	0.5	6	9.342
26	3	1.5	2	5	7.462
27	3.75	2.25	1.5	6	10.255
28	3	3	2	7	9.279
29	3	1.5	1	5	8.756
30	2.25	2.25	1.5	8	8.672
31	1.5	3	2	7	8.732

Los resultados experimentales para el crecimiento de *S. thermophilus* y *L. reuteri* se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo orden aplicando un análisis de regresión múltiple que explica el 75.2% de la variabilidad de la variable de respuesta. En la Tabla 4 se resumen los coeficientes de regresión del modelo con los términos lineales, cuadráticos y las interacciones binarias así como los resultados del ANOVA obtenidos para un nivel de confianza del 95%. Los valores p se utilizan como una herramienta para comprobar lo significativo que puede ser cada coeficiente a menor valor de p más significativo es el coeficiente. Esto permite determinar que variables tienen mayor influencia para alcanzar una población mayor a 10^7 UFC/mL tras el proceso de fermentación del licuado de avena. Como se puede observar, la adición de glucosa, término simple ($P=0.003$) y doble ($P=0.015$), y la interacción fructosa-inulina ($P=0.009$) son factores limitantes en el crecimiento de los microorganismos. Con estas variables significativas el modelo se aplicó de nuevo para ajustar los coeficientes de la ecuación y los resultados experimentales se ajustan a la ecuación cuadrática de segundo orden (Ecuación 8).

$$Y = 18.5008 - 3.3466x_1 - 2.8556x_2 - 3.6370x_3 - 0.6437x_4 + 0.4804x_1^2 + 0.0587x_2^2 + 0.1667x_3^2 - 0.0033x_4 + 0.4224x_1 * x_2 + 0.1799x_1 * x_3 + 0.3385x_1 * x_4 + 1.0571x_1 * x_3 - 0.076x_2 * x_4 + 0.0279x_3 * x_4 \dots \dots \dots (8)$$

Donde,
Y=Viabilidad (Log_{10} UFC/mL)
 X_1 =Glucosa (%)
 X_2 =Fructosa (%)
 X_3 =Inulina (%)
 X_4 =Inóculo (%)

TABLA 4. Coeficientes y resultados estadísticos para el análisis de regresión múltiple de la población de microorganismos *S. thermophilus* y *L. reuteri* (Log₁₀ UFC/ml).

Términos	Coeficientes de regresión	t	P
Constante	22.4748	3.615	0.002
Glucosa	-5.3751	-3.511	0.003
Fructosa	-2.3966	-1.566	0.137
Inulina	-3.3966	-1.655	0.117
Inóculo	-0.6437	-0.466	0.647
Glucosa*Glucosa	0.4798	2.718	0.015
Fructosa*Fructosa	0.0581	0.329	0.746
Inulina*Inulina	0.1653	0.416	0.683
Inóculo*Inóculo	-0.0033	-0.033	0.974
Glucosa*Fructosa	0.4224	1.79	0.092
Glucosa*Inulina	0.1799	0.508	0.618
Glucosa*Inóculo	0.3385	1.913	0.074
Fructosa*Inulina	1.0571	2.986	0.009
Fructosa*Inóculo	-0.076	-0.43	0.673
Inulina*Inóculo	0.0279	0.105	0.918

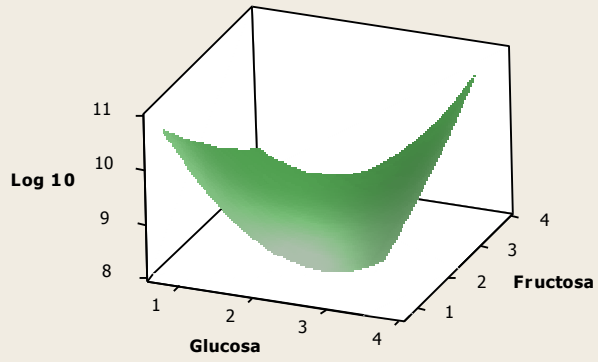
Las gráficas de superficie de respuesta (Figura 4) con sus respectivos gráficos de contorno (Figuras 5) ayudan a visualizar los intervalos de la respuesta. Estos gráficos muestran el efecto de dos variables independientes sobre la respuesta (Log₁₀ CFU/mL), manteniendo constante los otros dos factores a niveles intermedios. Los contornos están especialmente delimitados en tonos azules cuando la respuesta es inferior a 8.5 Log₁₀ (UFC/mL) y en tonos verdes cuando es mayor, entre más intenso es el color verde mayor es la respuesta.

Las interacciones de glucosa con fructosa, inóculo e inulina (Figuras 4. A, B y C y 5. A, B, C, respectivamente) indican que a niveles bajos y altos de glucosa (menores al 1% y mayores al 3.5%), la respuesta es mayor a 10 Log₁₀ (UFC/mL) con independencia de las concentraciones de fructosa, inulina e inóculo de las formulaciones correspondientes. Las figuras fructosa-inulina (Figura 4; D y Figura 5; D) indican que, concentraciones altas (mayores a 3% y 2% respectivamente) y bajas (menores a 1.5% y 1.0%), provocan un crecimiento mayor a 10 Log₁₀ (UFC/mL).

Lo contrario sucede con las interacciones entre fructosa-inóculo (Figura 4. E y Figura 5. E) e inóculo-inulina (Figura 4. F y Figura 5. F). A valores mayores del 2.0% de fructosa y 6% de inóculo (Figura 5. E y Figura 6. E) y valores mayores de 1.0% de inulina con cualquier porcentaje de inóculo (Figura 4. F y Figura 5. F), el crecimiento de microorganismos decrece, aunque siempre por encima de 7 Log₁₀ (UFC/mL) fijadas.

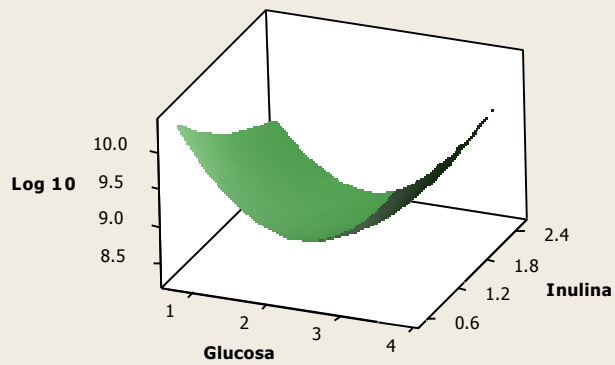
A

Valores de retención	
Inulina	1.5
Inóculo	6



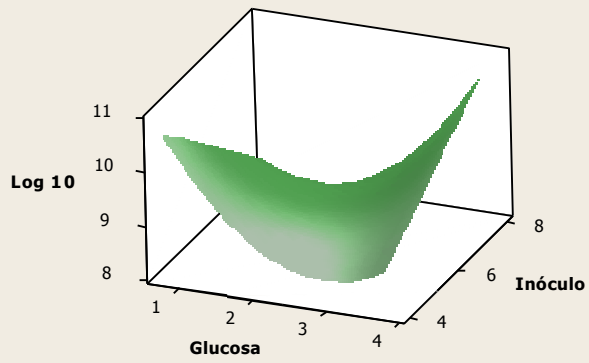
B

Valores de retención	
Fructosa	2.25
Inóculo	6



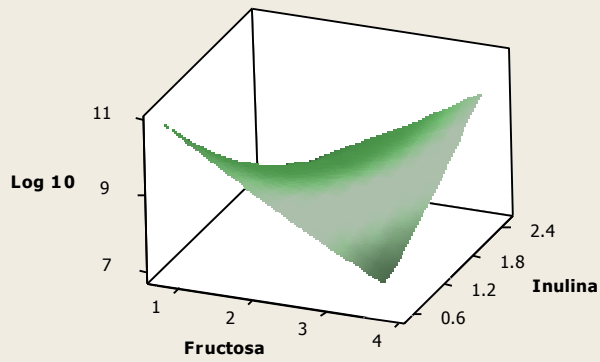
C

Valores de retención	
Fructosa	2.25
Inulina	1.5



D

Valores de retención	
Glucosa	2.25
Inóculo	6



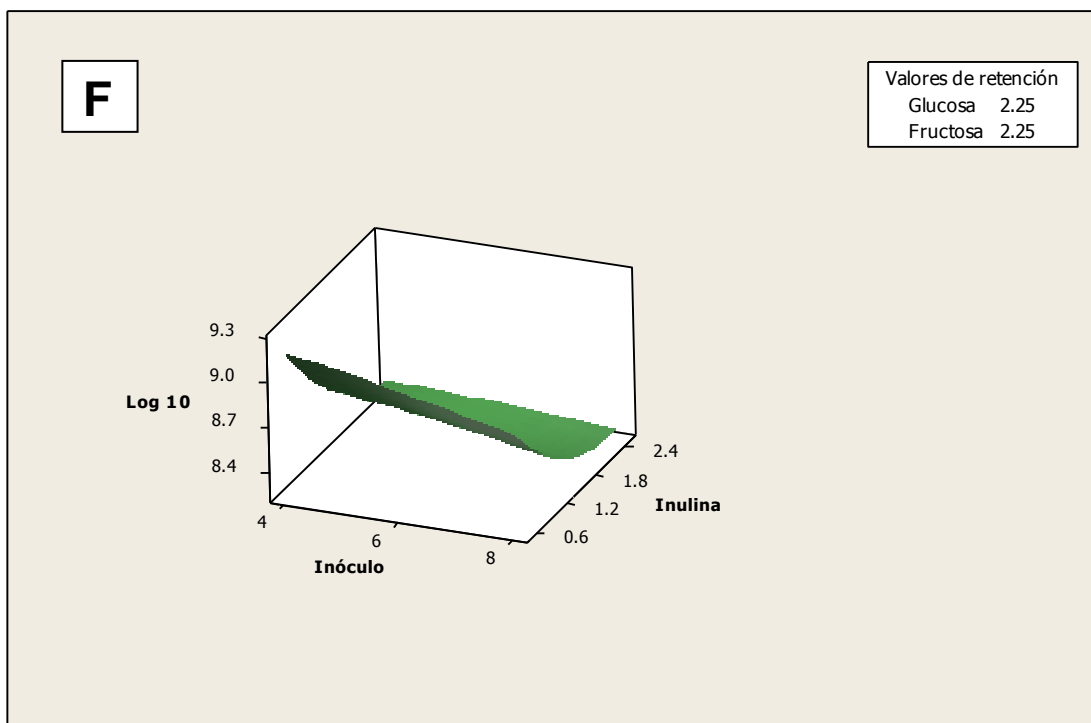
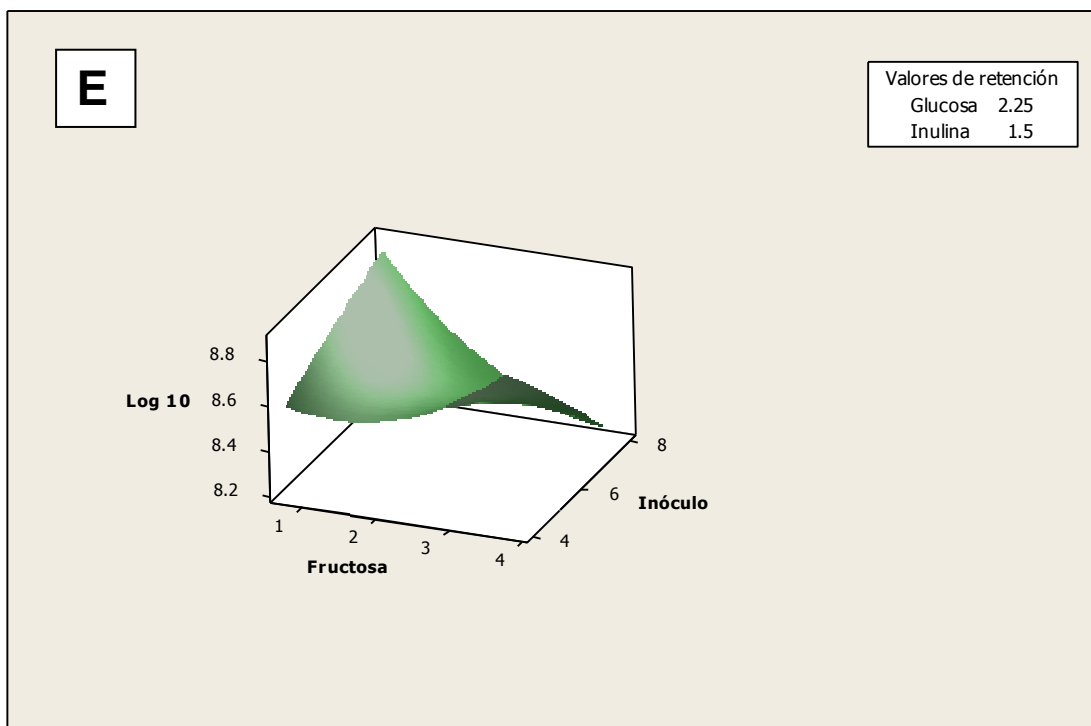


FIGURA 4. Gráfica de superficie de respuesta para las interacciones de los diferentes factores de crecimiento sobre la población de microorganismos en el producto final. **A.** Glucosa-Fructosa, **B** Glucosa-Inulina. **C** Glucosa-Inóculo, **D** Fructosa-Inulina, **E** Fructosa-Inóculo, **F** Inóculo-Inulina.

Finalmente, se optimizó y verificó el modelo desarrollado para maximizar la variable de respuesta (obtener un número de células viables mayor a 10^7)

en el fermentado de avena). El resultado ofrece como formulación óptima la siguiente combinación y concentración de factores: 0.75% de glucosa, 0.75% de fructosa, 0.5% de inulina y 4% de inóculo.

La fermentación de la formulación optimizada duró 4.5 horas a una temperatura de 40°C. El pH disminuyó de 6.6 al inicio del proceso fermentativo (inmediatamente después de añadir la mezcla de microorganismos) hasta valores de 4.58, con una supervivencia de 7.4×10^8 UFC/mL (8.8 Log₁₀). Estudios previos de fermentación realizados con *L. reuteri* en licuados de avena mostraron una supervivencia de 10^8 UFC/mL y este nivel disminuyó a 10^7 UFC/mL en un proceso fermentativo de 16 horas, al combinar el *L. reuteri* con los microorganismos característicos del yogur (Martesson *et al.* 2002). Otras bacterias probióticas como el *L. plantarium* con sacarosa como factor de crecimiento han demostrado su alta viabilidad en licuados de avena alcanzándose crecimientos de 2.5×10^{10} UFC/mL y 7.5×10^{10} UFC/mL en procesos fermentación entre 8 y 4 horas, respectivamente (Angelov 2005 y Gupta 2010).

Caracterización del licuado y fermentado de avena

La formulación óptima fue verificada y analizada en sus principales propiedades físicas al inicio y al final del proceso de fermentación.

La Tabla 5 muestra los resultados de pH, densidad (ρ) y conductividad eléctrica (σ). Los parámetros de conductividad y densidad aumentaron tras el proceso fermentativo pero no presentan diferencias significativas $p > 0.05$. El descenso del pH es un factor importante para el seguimiento de la fermentación, además si al final del proceso este es muy bajo, sensorialmente el producto es menos aceptado por el consumidor. En estudios previos realizados con otros microorganismos probióticos en licuados de avena, se alcanzó un pH entre 4.0 y 4.5 (Angelov, 2005) y cuando se utilizó *L. reuteri* con los microorganismos del yogur con se obtuvo un pH de 4.0 (Matesson *et al.*, 2002). En las cepas de este estudio, el pH disminuyó hasta 4.58.

TABLA 5. Valores medios y desviación estándar (entre paréntesis) de pH, densidad y conductividad eléctrica del licuado y fermentado de avena.

Producto	pH	ρ (Kg/m ³)	σ (μ S/cm)
Licuado Avena	6.42 (0.03)	1.013 (0.003)	714 (26)
Licuado fermentado	4.58 (0.06)	1.024 (0.008)	1197 (41)

Los parámetros reológicos y el coeficiente de correlación (r^2) del ajuste al modelo de Ostwald-de-Waele se muestran en la Tabla 6. Tanto el licuado como el fermentado de avena presentan un comportamiento pseudoplástico ($n < 1$). Aunque los el índice de consistencia (K) aumenta y el índice de comportamiento al flujo (n) disminuye, los cambios no son estadísticamente significativos ($p > 0.05$). Por otro lado la viscosidad aparente disminuye significativamente ($p = 0.069$) por efecto del proceso fermentativo. La presencia de beta-glucanos en el licuado de avena hace que el producto sea

más viscoso por lo tanto la disminución en la viscosidad después de la fermentación puede hacerlo más aceptable y con mejor apariencia sensorial (Gupta *et al.*, 2010).

TABLA 6. Parámetros reológicos y viscosidad aparente tras ajuste del modelo de Ostwald-de-Waele. Valores medios y desviación estándar (entre paréntesis).

Producto	K	n	r ²	η (Kg m ⁻¹ s ⁻¹)
Licuido Avena	1.193(0.113)	0.735(0.022)	0.935	0.357 (0.07)
Licuido fermentado	2.26 (0.436)	0.507(0.026)	0.941	0.229 (0.02)

En cuanto a los parámetros de color (Tabla 7) analizados, sólo el tono presentó cambios significativos por efecto de la fermentación. En general, el producto vira hacia tonalidades más amarillentas y menos puras. En el índice de blancura, el proceso fermentativo no produjo un cambio significativo de este parámetro.

La diferencia de color entre el producto base y el fermentado es de ΔE=2.229 que según la escala de color propuesta por Schmidhofer (1994) es una diferencia de color evidente.

TABLA 7. Valores (media (d.e)) de los diferentes parámetros de color.

Producto	L*	C*	h _{ab}	I.B
Licuido Avena	68.78 (0.37)	14.09 (0.44)	88.764 (1.11)	67.237(0.086)
Licuido fermentado	70.66(0.42)	12.96 (0.08)	89.09 (0.28)	67.92 (0.34)

CONCLUSIONES

Esta evaluación preliminar sobre la fermentación del licuido de avena con la combinación de microorganismos (*L. reuteri* y *S. thermophilus*) así como los diferentes factores de crecimiento propuestos, demuestran que la obtención de un producto probiótico no lácteo a partir de avena es viable y factible, tanto desde el punto de vista microbiológico como tecnológico.

La aplicación del análisis por regresión múltiple y superficie de respuesta son una herramienta útil para fijar la mejor combinación y concentración de los factores de crecimiento en aras a conseguir la máxima viabilidad en el fermentado de avena. Además, contribuyen a comprender mejor la interacción de los diferentes factores analizados. La adición de glucosa y la interacción entre fructosa-inulina son los factores que mayor influencia tienen en el proceso de fermentación para los niveles estudiados.

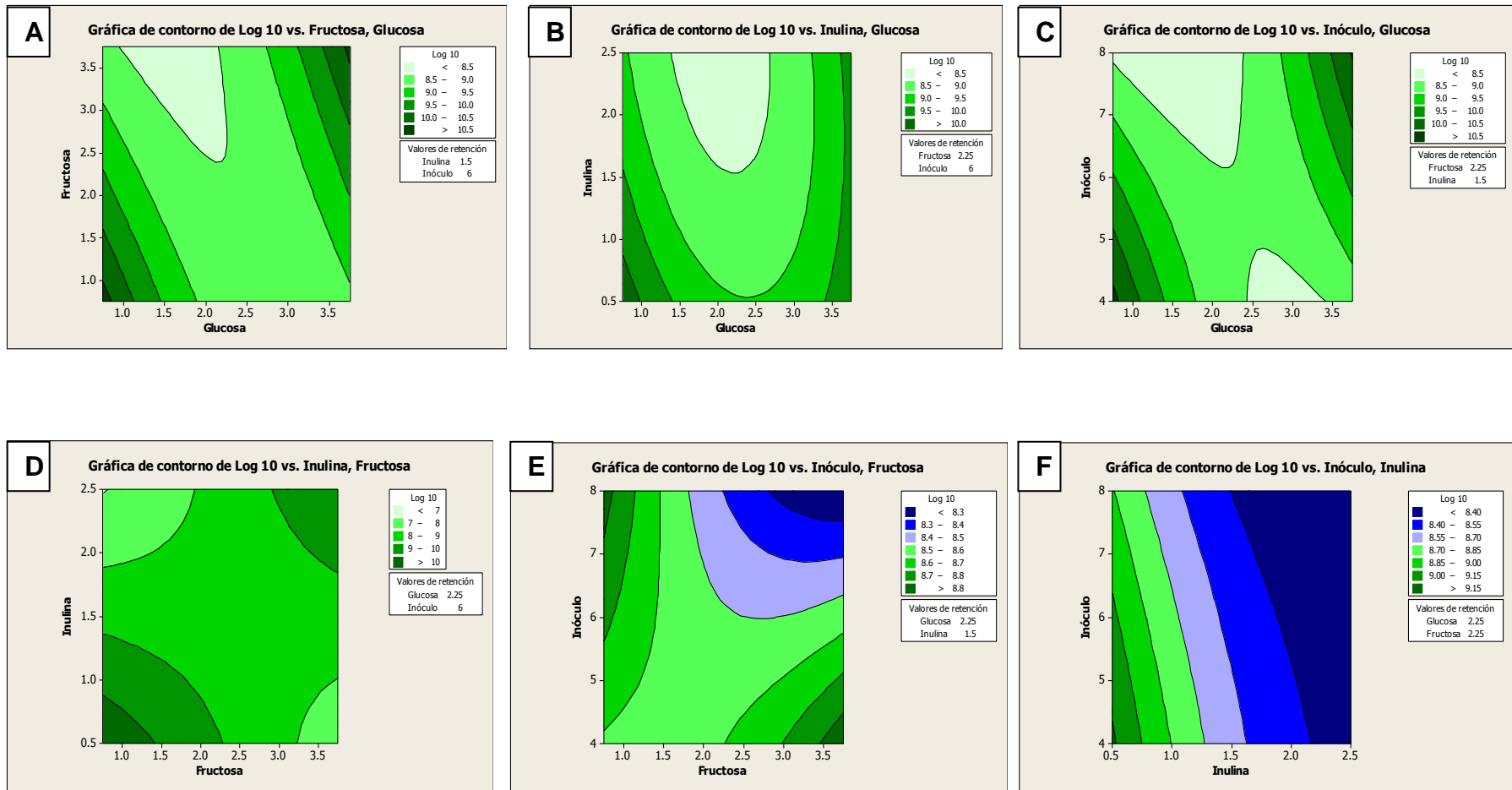


Figura 5 Gráficas de contorno de los factores de crecimiento sobre la población microbiana al final del proceso fermentativo. A. Glucosa-Fructosa. B Glucosa-Inulina. C Glucosa-Inóculo. D Fructosa-Inulina. E Fructosa-Inóculo. F Inóculo-Inulina.

REFERENCIAS

- Angelov A, Gotcheva V, Kuncheva R, Hristozova T. 2005. Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology* **112**: 75-80.
- Benavides M., Quicazán M., 2009. Valoración de Diferentes Indicadores de la Fermentación de Bebida de Soya y de Leche de Vaca utilizando Cultivos Probióticos. *Brazilian Journal of Food Technology*. Vol. VII: 100-106.
- Blandino A., Al-Aseeri M.E., Pandiella S.S., Cantero D., Webb. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* **36**: 527-543.
- Charalampopoulos D., Pandiella W., Webb C. 2002. Application of cereals and cereal componentes in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. **79**: 131-141.
- Cuesta-Muñoz C. "Metodología de Superficies de Respuesta, gran alternativa para incrementar la productividad de sus procesos" [en línea]. Centro de Ingeniería de la Calidad. Dirección URL: <<http://www.cicalidad.com>>. [Consulta: 29 de Jul. 2011].
- Fioramonti J., Theodorou V., Bueno L. 2003. Probiotics: What are they? What are they effects on gut physiology?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. Vol. 17: 711-724.
- Fluidos Viscosos. [en línea] RUA. Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante. Dirección URL: <<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/3623/1/tema2RUA.pdf>> [Consulta: 20 de May. 2011].
- Granato D, Branco G, Nazzaro F, Cruz A, and Faria J., 2010. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety* **Vol. 9**: 292-302.
- Gupta S., Cox S., Abu-Ghannan, N. 2010. Process Optimization for the Development of a Functional Beverage Based on Lactic Acid Fermentation of Oats. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 52:199-204.
- Jaskari J., Kontual P., Siitonen A., Jousimies-Somer H., Mattila-Sandholm T., Poutanen K. 1998. Oat B-glucan and Xylan Hydrolysates as Selective Substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 175-181.
- Johansson M. L., Molin G., Jeppsson B., Nobaek S., Ahrné S., and 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*. Vol. 59:15-20.
- Liew S.L., Ariff A.B., Raha A.R., Ho Y.W. 2005. Optimization of Medium Composition for the Production of a Probiotic Microorganism, *Lactobacillus rahmnosus*, using response surface methology. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. **102**: 137-142.
- Martensson O, Oste R, and Holst O. 2000. Lactic Acid Bacteria in an Oat-based Non-dairy Milk Substitute: Fermentation Characteristics and Exopolysaccharide Formation. *Food science and Technology/LWT* **33**: 525-530
- Martensson O., Oste R., and 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.
- Massod Sadiq B, Muhammad T, Muhammad Kashif I, Rabia S, Mehmood S. Butt. 2008 Oat: Unique Among The Cerals. *European Journal of Nutrition*. Vol. **47**: 60-79.
- Prado F., Parada J., Pandey A., Soccol C. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International* **41**: 111-123.
- Prat Bartes A., Tort-Martorell Llabrés X., Grima Cintas P., Pozuela Fernández L., Solé Vidal I. 2004. Métodos estadísticos: control y mejora de la calidad. Barcelona. Ediciones UPC.
- Quincazán M., Mancera J., Mendoza D.
- Rivera-Espinoza Yadira, Gallardo-Navarro Yoja (2010). Non- dairy Probiotic Products. *Food Microbiology* **27**: 1-11.
- Sanders Mary Ellen and Marco Maria L. 2010. Food Formats For Effective Delivery of Probiotics. *The Annual Review of Food Science and Technology*. 1:65-85.
- Sendra-Nadal E., Sayas-Barberá E., Fernández-López J., Pérez-Alvarez J. "Food Formulation to Increase Probiotic Bacteria Action or Population." [en línea]. *Departamento de Tecnología Alimentaria. Universidad Miguel Hernández de Elche*. Dirección URL: <<http://www.sciencedirect.com/>>. [Consulta: 20 de May. 2011].

- Sharareh H.; Hoda S. Gregor R, 2009. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as a functional food. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **10**: 293-296.
- Sumangala G., Lanwei Z., Ming-Kuei H., Xin Z., Mingruo G. 2005. Oat-based Symbiotic Beverage Fermented by *Lactobacillus planetarium*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei*, and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*. Vol. **70**, Nr. 4: 216-223
- Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Riet K.(1990) Modeling of Bacterial Growth Curve. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 56:18875-1881.