



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS GELIFICADOS ÁCIDOS Y SU UTILIZACIÓN COMO MATRICES PROTECTORAS DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Instituto de Tecnología de Alimentos

Ing. Sánchez Carnero, María Agustina

Directora: Dra. María Julia Spotti

Codirectora: Dra. Silvana Fioramonti

Jurados:

Dra. María Luján CAPRA

Mg. Andrea PIAGENTINI

Dra. Patricia RISSO

INDICE

INDICE

Dedicatoria	1
Agradecimientos	1
Resumen	1
Abstract	1
1. INTRODUCCION	2
1.1. Alimentos Funcionales	2
1.1.1. Fibras Dietéticas	2
1.1.2. Bacterias Probióticas	7
1.2. Encapsulación	12
1.3. Proteínas de Suero	13
1.3.1. Geles de Proteínas de Suero	17
1.3.2. Gelificación en frio	18
2. OBJETIVOS	25
2.1. Generales	25
2.2. Específicos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Materiales	27
3.2. Caracterización de los arabinosilanos	28
3.2.1. Contenido de almidón	28
3.2.2. Peso Molecular Viscosimétrico	30
3.2.3. Peso molecular de AX por cromatografía de exclusión molecular.	33
3.2.4. Potencial Z y Tamaño de partícula de AX	33
3.3. Obtención y Caracterización de Geles Ácidos	35
3.3.1. Preparación de agregados proteicos	35
3.3.2. Preparación de geles ácidos con gdl	35
3.3.3. Preparación de Geles Ácidos con Bacterias Probióticas	35
3.3.4. Determinación del pH de geles	37
3.3.5. Glucosa consumida	37
3.3.6. Sinéresis	38
3.3.7. Capacidad de retención de agua	39
3.3.8. Análisis de propiedades mecánicas y texturales de geles ácidos	39

3.3.8.1. <i>Compresión Uniaxial</i>	40
3.3.8.2 <i>Análisis de perfil de textura por compresión (TPA)</i>	41
3.4. Estudio de la capacidad de las bacterias para utilizar los arabinosilanos como fuente de energía	44
3.5. Estudio del Efecto Protector del gel sobre las Bacterias Probióticas	45
3.6. Análisis estadístico	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1. Caracterización fisicoquímica de los arabinosilanos	49
4.1.1. Contenido de almidón	49
4.1.2. Peso Molecular Viscosimétrico	50
4.1.3. Potencial Z y Tamaño de partícula de AX	54
4.2. Obtención y Caracterización de Geles Ácidos de WPI	55
4.2.1. Preparación de Geles Ácidos con Bacterias Probióticas	55
4.2.2. Curvas de acidificación	58
4.2.3. Glucosa consumida	61
4.2.4. Sinéresis	63
4.2.5. Capacidad de retención de agua (CRA)	65
4.2.6. Análisis de propiedades mecánicas y texturales de geles ácidos	66
4.2.6.1. <i>Compresión Uniaxial</i>	67
4.2.6.2. <i>Análisis de perfil de textura por compresión (TPA)</i>	69
4.3. Estudio del Efecto Protector sobre las Bacterias Probióticas	72
4.4. Estudio de la capacidad de las bacterias para utilizar los arabinosilanos como fuente de energía	75
5. CONCLUSIONES	79
6. BIBLIOGRAFIA	82
7. ANEXO	94
7.1. Obtención de Arabinosilanos de Maíz	94
7.2. Fundamentos de la determinación de viscosidad intrínseca	95
7.3. Fundamentos de la medida de potencial Z	98
7.4. Fundamentos de la medida de tamaño por dispersión dinámica de luz	100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de arabinosilanos ferulados (Marquez-Escalante et al., 2018).....	4
Figura 2. Estructura química de arabinosilanos ferulados y las enzimas necesarias para su degradación (Marquez-Escalante et al., 2018).....	7
Figura 3. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 cultivadas durante 22 días a pH no controlado (a) o a un pH controlado de 5 (b) y 6.5 (c). Las flechas blancas indican una morfología típica de las células del género <i>Bifidobacterium</i> . (Vinderola et al., 2012).	9
Figura 4. A: viscosímetro capilar. B: baño viscosimétrico con control de temperatura.	31
Figura 5. Gráfica ideal de η_{sp}/c y $(\ln \eta_{red})/c$ vs. c (g/dL) para el cálculo de viscosidad intrínseca. Adaptada de (Harding, 1997).....	32
Figura 6. Celda capilar con electrodos a cada lado (Malvern Instruments Ltd. 2014).....	34
Figura 7. Soluciones coloreadas con distintas concentraciones de glucosa.	38
Figura 8. Curva de calibrado para la determinación del contenido de glucosa.	38
Figura 9. Ensayo de Compresión.....	41
Figura 10. Curva ideal de un análisis de perfil de textura TPA (Adaptada de (Hleap & Velasco, 2010)).	43
Figura 11. Curva de calibrado de contenido de almidón de maíz ($r^2=0,9994$).....	49
Figura 12. Curvas η_{sp}/c y $(\ln \eta_{red})/c$ vs. Concentración de AX.	50
Figura 13. Índice de refracción vs Tiempo para la determinación del peso molecular del AX...	53
Figura 14. Geles obtenidos con WPI 3%, 1×10^8 UFC/g y varias concentraciones iniciales de glucosa, de izquierda a derecha: 0,10; 0,25; 0,50 y 1,00%. A) vista frontal; B) vista superior...	57
Figura 15. Curvas de acidificación para los sistemas sin AX.	59
Figura 16. Compresión uniaxial de geles ácidos de WPI producidos por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1, con concentraciones iniciales de glucosa de 0,25 %, 0,5% y 1%....	67
Figura 17. Curvas del Análisis de Perfil de Textura (TPA) de los geles ácidos de WPI producidos por <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1, con concentraciones iniciales de glucosa de obtenidos con distintas concentraciones de glucosa (0.25, 0.5 y 1%).	70
Figura 18. Resultado de la disolución de los geles en buffer citrato-fosfato a distintos pH mediante agitación magnética.	73
Figura 19. Recuentos bacterianos en log UFC/ml luego de la fermentación y a lo largo de 4 semanas de almacenamiento a 4°C.....	74
Figura 20. Crecimiento de <i>Bifidobacterium animalis</i> sp. <i>lactis</i> (INL1) y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG) en Agar MRS al utilizar los arabinosilanos (AX) como fuente de carbono con respecto a glucosa. Control negativo: MRS base sin fuente de carbono.....	76
Figura 21. Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.....	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de pH de los geles al inicio (t_0 , 24 hs después de la fermentación) y al final del almacenamiento a 4°C (t_4 , 4 semanas).	60
Tabla 2. Glucosa consumida de los sistemas en estudio.	62
Tabla 3. Sinéresis inicial y sinéresis a las 4 semanas de los geles obtenidos.	64
Tabla 4. Capacidad de retención de agua de los geles firmes obtenidos.	65
Tabla 5. Parámetros mecánicos de los geles.	68
Tabla 6. Parámetros texturales obtenidos a partir de las curvas de TPA de los geles.	70

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que han sido parte de mi vida y que me han brindado su apoyo incondicional, especialmente a mis padres, quienes siempre me han motivado a seguir adelante en cada uno de mis proyectos y metas, y han sido una pieza clave en mi formación académica y personal.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras Juli y Sil, quienes dedicaron su tiempo y conocimientos para guiarme en este proceso y siempre estuvieron dispuestas a aclarar mis dudas y orientarme en el camino correcto.

Además, quiero expresar mi gratitud a aquellos amigos, familiares y pareja que estuvieron a mi lado durante todo este proceso, brindándome su apoyo emocional y alentándome a continuar cuando las cosas se ponían difíciles.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la formación y caracterización de geles ácidos de un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI) y arabinosilanos (AX) extraídos de salvado de maíz para encapsular bacterias probióticas mediante la fermentación ácido-láctica producida por la propia bacteria. Los AX fueron caracterizados en cuanto a su peso molecular y tamaño. La obtención de geles ácidos se realizó en dos pasos: i) primero formando agregados proteicos mediante tratamiento térmico de una solución WPI al 3%, y ii) incubando estas soluciones con glucosa y suspensiones de bacterias de la cepa *Bifidobacterium lactis* INL 1 (INL1) para llegar a concentraciones finales de glucosa del 0-1%, y UFC/g de 1×10^8 UFC/g. El efecto del agregado de AX (al 2%) sobre la fermentación se estudió en sistemas conteniendo 0% y 0,1% de glucosa, con la misma concentración de proteínas. La fermentación se dio lugar a 42°C por un lapso de 300 min o hasta alcanzar un pH de 5. Los geles fueron almacenados a 4°C por un periodo de 4 semanas. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que se lograron obtener geles ácidos de WPI con buenas propiedades texturales con concentraciones de glucosa de 0,25 al 1%, mientras que los sistemas con 0,1% de glucosa proporcionaron geles no autosostenibles. Las bacterias probióticas INL1 no lograron utilizar los AX como fuente de carbono, por lo que los sistemas sin glucosa con AX no presentaron descenso del pH, y por lo tanto no gelificaron. El agregado de glucosa al 0,1% a los sistemas con 2% de AX tampoco resultó en la formación del gel, ya que se vio que el pH no descendió de la misma forma que en el sistema 0,1% de glucosa sin AX, aunque las bacterias consumieron la totalidad de la glucosa en ambos sistemas. Esto estaría indicando que los AXs podrían tener un efecto buffer por el cual el pH no descendió lo suficiente como para

generar las interacciones necesarias para formar el entrecruzado de la red del gel. Se verificó si las bacterias INL1 eran capaces de utilizar los AXs como fuente de carbono, y se encontró que la utilización del mismo era casi nula, probablemente debido a su alto peso molecular y a su gran tamaño. En los geles que gelificaron, la cantidad de glucosa en el gel tuvo impacto significativo en todos los parámetros estudiados; a mayores concentraciones, se incrementó la velocidad de acidificación, disminuyó el pH final, disminuyó la sinéresis inicial, aumentó el esfuerzo a la fractura y la elasticidad de los geles, y disminuyó su rigidez. A su vez, los sistemas gelificados mostraron ser más protectores de las bacterias durante el almacenamiento que los sistemas que no formaron estructura de gel, llegando a las 4 semanas de almacenamiento con recuentos por arriba de 1×10^6 UFC/g, por lo que pueden catalogarse como alimentos con probióticos.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the formation and characterization of acid induced gels of whey protein isolate (WPI) and arabinoxylans (AX) extracted from corn bran, to encapsulate probiotic bacteria through lactic acid fermentation. The AXs were characterized in terms of their molecular weight and size. The acid induced gels were obtained by two steps process: i) firstly, the protein aggregates were formed by thermal treatment by heating a WPI solution at 3%, and ii) the, these solutions were incubated with glucose (final glucose concentrations of 0-1%), and bacterial suspensions of *Bifidobacterium lactis* subsp. INL 1 (INL1) to reach a final concentration of 1×10^8 CFU/g. The effect of adding AX (2%) on fermentation was studied in systems containing 0% and 0.1% glucose, with the same protein concentration. Fermentation took place at 42°C for a period of 300 min or until reaching pH 5. The gels were stored at 4°C for 4 weeks. The results obtained in this thesis show that acid induced WPI gels with good textural properties were obtained with glucose concentrations of 0.25 to 1%, while systems with 0.1% glucose provided non-self-supporting gels. The probiotic INL1 was unable to use the AX as a carbon source, so the systems without glucose but with AX did not show a decrease in pH, and therefore did not produce a gel. The addition of 0.1% glucose to the systems with 2% AX did not result in the formation of the gel neither, since the pH did not decrease in the same way as in the 0.1% glucose system without A, even though the bacteria consumed all of the glucose in both systems. This would indicate that the AX could have a buffer effect whereby the pH did not drop enough to screen the electrostatic charges of the aggregates to promote the cross-linking and form the gel network. It was verified that INL1 bacteria could not use AX as a carbon source,

probably due to their high molecular weight and large size. In those systems where a gel was produced, the amount of initial glucose had a significant impact on all the parameters studied; higher glucose concentrations increased the acidification rate, decreased the final pH, decreased initial syneresis, increased the fracture stress and elasticity of the gels, and decreased their rigidity. In turn, the gelled systems showed to be more protective of bacteria during storage than the systems that did not form a gel structure, reaching after 4 weeks of storage cell counts above of 1×10^6 CFU/g, so they can be classified as foods with probiotics.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

La creciente percepción sobre la relación entre la dieta y la salud ha llevado a los consumidores a estar más interesados en los alimentos funcionales (Dunand et al., 2019). En Argentina, la Agencia Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología (ANMAT, 2017) los definió como «alimentos capaces de demostrar que poseen un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, que mejoran el estado de salud y bienestar, reducen el riesgo de una enfermedad, o ambas» (Aguirre, 2019). Algunos ejemplos de alimentos funcionales son aquellos que poseen probióticos, prebióticos, fibras dietéticas, ácidos grasos saludables, como los ácidos grasos omega-3, vitaminas, entre otros.

1.1.1. FIBRAS DIETÉTICAS

La incorporación de fibra dietética en los alimentos ha recibido mucha atención en los últimos años debido a la observación de numerosos beneficios en su consumo. Una mayor ingesta de fibra dietética reduce el riesgo de desarrollar varias enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo 2 y algunos tipos de cáncer, y se han asociado con un peso corporal más bajo (Dahl & Stewart, 2015). Tradicionalmente, el concepto de fibra incluye a todos aquellos hidratos de carbono que no se digieren ni absorben en la parte alta del tubo intestinal, llegando intactos al colon (Almaraz et al., 2015).

La fibra se ha clasificado en función de su condición de solubilidad. Así, distinguimos entre fibra soluble y fibra insoluble. La fibra soluble incluye el almidón resistente, pectinas, gomas, algunas hemicelulosas y polisacáridos no amiláceos de reserva de la planta. La fibra insoluble incluye la celulosa, algunas hemicelulosas, lignina y otros polifenoles (Almaraz et al., 2015).

Según el código alimentario argentino (CAA), en el **Art 1386** - (Res. Conj. 95/2008 SPReI Y 358/2008 SAGPyA) se denomina alimentos modificados en fibra aquellos con una adición de fibra de 1% p/p para sólidos y 3% p/v para líquidos.

1.1.1.1. Arabinoxilanos

Los arabinoxilanos (AX) son parte de la hemicelulosa presente en los granos de cereales, y como tales, forman parte de la fibra dietética consumida por humanos y animales (Marquez-Escalante et al., 2018). Los AX constituyen el principal polisacárido no amiláceo en los cereales, constituyendo aproximadamente el 60% de la pared celular de las células de endospermo y la capa de aleurona (Mendis et al., 2016).

Como se puede observar en la Figura 1, estos polisacáridos están conformados por una cadena lineal de unidades de xilosa, unidas mediante enlaces $\beta(1-4)$ y ramificaciones con residuos de arabinosa unidos mediante enlaces glicosídicos $\alpha-(1\rightarrow3)$ o $\alpha-(1\rightarrow2)$, o ambos (Marquez-Escalante et al., 2018). La xilosa puede presentar dos grados de sustitución, de acuerdo con el número de residuos de arabinosa (monosustituído o disustituído). Además de las unidades de arabinosa es común encontrar otros sustituyentes minoritarios como ácido glucurónico y

galactosa. Los arabinoxilanos ferulados tienen la particularidad de presentar ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico) en su estructura, unido en la posición O-5 de arabinosa por medio de un enlace éster (Morales-Ortega et al., 2013).

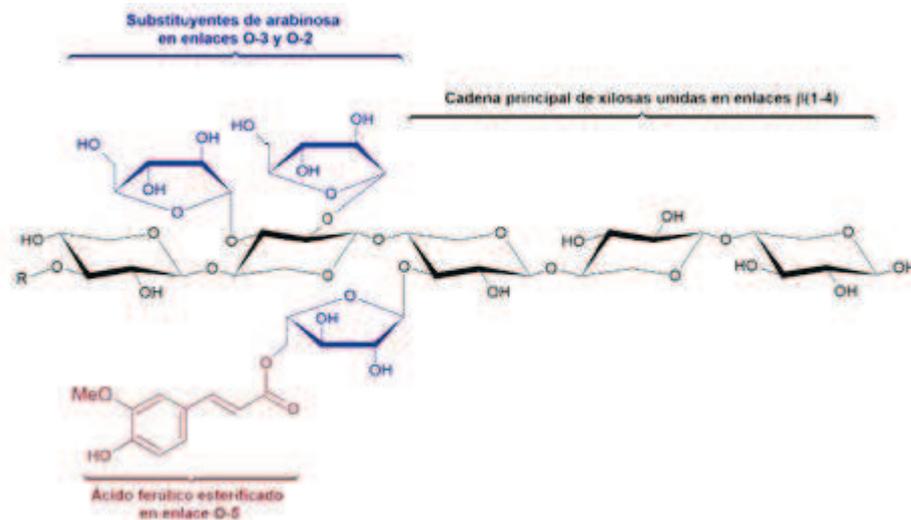


Figura 1. Estructura química de arabinoxilanos ferulados (Marquez-Escalante et al., 2018).

La estructura de los AX depende de su origen y método de extracción (Rose et al., 2010) y puede modificarse a fracciones más cortas mediante distintos métodos, principalmente enzimáticos (Maes & Delcour, 2002).

Debido a su estructura, estos polisacáridos presentan varias propiedades tecnológicas, por lo que son usados en la industria alimentaria como espesantes y gelificantes debido a su gran capacidad de retención de agua (Balandrano, 2019).

Además, los AX son fibra soluble, es decir, los humanos no tenemos las enzimas necesarias para que puedan ser degradados, por lo que pasan intactos por el tracto gastrointestinal. Por este motivo, el consumo de AX ha sido relacionado a numerosos beneficios para la salud humana. Entre los muchos beneficios para la

salud se encuentran su capacidad de regulación de la glucosa en sangre (Balandrano, 2019), reducción del colesterol en sangre y efectos anticancerígenos (Mendis et al., 2016). Al llegar al colon, algunas bacterias benéficas pueden utilizar los AX, por lo que son considerados además prebióticos (Marangon, 2020).

Los prebióticos son carbohidratos indigeribles que tienen efectos benéficos en el hospedero, debido a que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de un limitado número de especies microbianas en el colon y que confiere beneficios a la salud del hospedador (Artículo 1390-Resolución Con junta SPReI N° 229/2011 y SAGyP N° 731/2011) (CAA, 2013). Para ser un prebiótico efectivo, un ingrediente no debe hidrolizarse ni absorberse en la parte superior del tracto gastrointestinal, debe tener una fermentación selectiva de tal manera que la composición de la microbiota del intestino grueso se altere hacia una composición más saludable (Sarao & Arora, 2017).

Los prebióticos han demostrado mejorar la función intestinal, aumentar la absorción de minerales, modular el metabolismo energético, regular el sistema inmune, y reducir el riesgo de infecciones intestinales, diabetes tipo II, inflamación intestinal y cáncer de colon (Roberfroid, 2008). Los prebióticos pueden también influir en el crecimiento y la supervivencia de un probiótico al mejorar su crecimiento y metabolismo. La interacción entre probióticos y prebióticos *in vivo*, podría verse favorecida por una adaptación del probiótico al sustrato prebiótico en los alimentos antes de su consumo. Debido a la sinergia potencial entre los probióticos y los prebióticos, los alimentos que contienen una combinación de estos ingredientes a menudo se denominan simbióticos (Martínez-Villaluenga & Gómez, 2007).

Los AX son considerados prebióticos, ya que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano, y pueden ser fermentados total o parcialmente por la microbiota intestinal en el intestino grueso. Van Craeyveld y col. (2009), simuló *in vitro* las condiciones gástricas (pH 2,0; 37°C) comprobando la resistencia de los AX al pH ácido y a la hidrólisis enzimática. Los beneficios para la salud de los AX están relacionados con su fermentación colónica, el control glucémico, la reducción del colesterol, la reducción de la presión arterial y la laxación (Chutkan et al., 2012).

Una limitación de la mayoría de los prebióticos existentes es su rápida fermentación proximal (Kolida et al., 2002; Van den Abbeele et al., 2011). Dado que muchas enfermedades se originan en el colon distal (Jackson-Thompson et al., 2006), sería deseable una fermentación más distal de los prebióticos (Kolida et al., 2002). En este contexto, los arabinoxilanos (AX) de cadena larga son una nueva clase interesante de compuestos prebióticos potenciales (Grootaert et al., 2007; Pastell et al., 2009). Debido a que su estructura consiste en una estructura principal de xilosa sustituida con monómeros de arabinosa y potencialmente también ácido ferúlico (Izydorczyk & Biliaderis, 1995), se necesita un espectro de enzimas para su degradación (Pastell et al., 2009): xilosidasas (liberan xilosa desde los extremos no reductores), xilanasas (división de la columna vertebral de xilosa), arabinofuranosidasas (separan arabinosa) y feruloil esterases (liberan ácido ferúlico) (Figura 2). Por lo tanto, los AX pueden fermentarse más gradualmente a lo largo del colon.

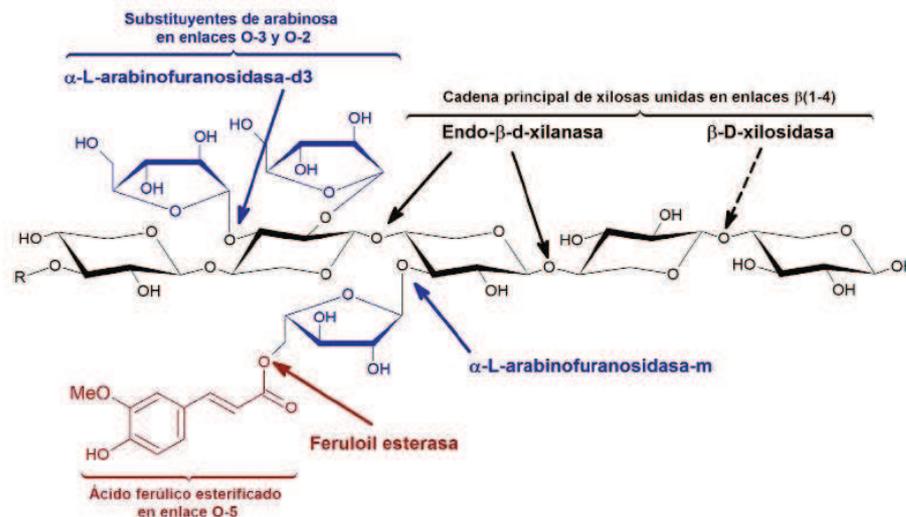


Figura 2. Estructura química de arabinoxilanos ferulados y las enzimas necesarias para su degradación (Marquez-Escalante et al., 2018).

Si bien la mayoría de sus efectos siguen siendo desconocidos, los primeros estudios indican que la estructura de AX afecta los patrones de fermentación (Hughes et al., 2007); (Pollet et al., 2012) y la modulación inmune, con mayor actividad para AX de cadena larga (Monobe, 2008).

Además, los AX poseen otras actividades biológicas, como por ejemplo pueden mejorar la inmunidad y presentar efectos antioxidantes, aliviar el estreñimiento y mejorar el metabolismo de los lípidos y la glucosa (Wang et al., 2020). Hay una estrecha correlación entre la estructura de los AX y las actividades antioxidantes, el potencial prebiótico y las propiedades inmunomoduladoras.

1.1.2. BACTERIAS PROBIÓTICAS

La Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) definieron en el año 2002 a los

probióticos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en dosis adecuadas producen un efecto benéfico en el consumidor más allá de la nutrición” (Joint FAO and WHO Working Group, 2002). Por este motivo, el consumo de probióticos aumentó exponencialmente en los últimos años (Loyeau, 2020).

Las especies de bacterias probióticas provienen todas de origen humano (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, o *Bifidobacterium infantis*). (Vinderola, Bailo, et al., 2000). Cada cepa que quiera utilizarse como probiótico para consumo humano, debe cumplir con una serie de requisitos de seguridad (inocuidad), fisiológicos, funcionales y tecnológicos. Adicionalmente, se requiere la determinación de las características tecnológicas de la cepa para su uso en alimentos. Esta caracterización, incluye: determinar su estabilidad genética, la conservación de sus propiedades funcionales y de su viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento (por ejemplo, en alimentos), que contenga al probiótico (Castillo-Escandón, 2019).

En cuanto a la seguridad, las cepas aisladas deben ser preferiblemente de origen humano (Rodríguez R. et al., 2016), no deben ser microorganismos patógenos, ni deben estar asociados a enfermedades o crear efectos indeseables en el intestino delgado, y no deben tener genes de resistencia a antibióticos transmisibles (Loyeau, 2020).

En segundo lugar, un probiótico debe ejercer un efecto benéfico demostrado en un estudio clínico de eficacia. Además, es deseable que sean tolerantes a ácidos y jugos gástricos estomacales humanos, y sales biliares, que puedan adherirse a células intestinales de origen humano y puedan colonizar temporalmente el

intestino, y presentar actividad antagonista frente a patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile* (Loyeau, 2020).

En la industria de los alimentos los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son los más utilizados (Rodríguez R. et al., 2016). En esta tesis se utilizó la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1. Esta cepa fue aislada de leche materna por investigadores del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-CONICET) (Zacarías et al., 2011).

La cepa probiótica INL1 pertenece al género de bacterias Gram-positivas (cuya envoltura celular comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano), presenta morfología de bastón de largo variable y sección relativamente constante. Se consideran bacterias no móviles y suelen presentar una estructura característica de “horqueta” o “Y” que permite reconocerla fácilmente al microscopio (Figura 3).

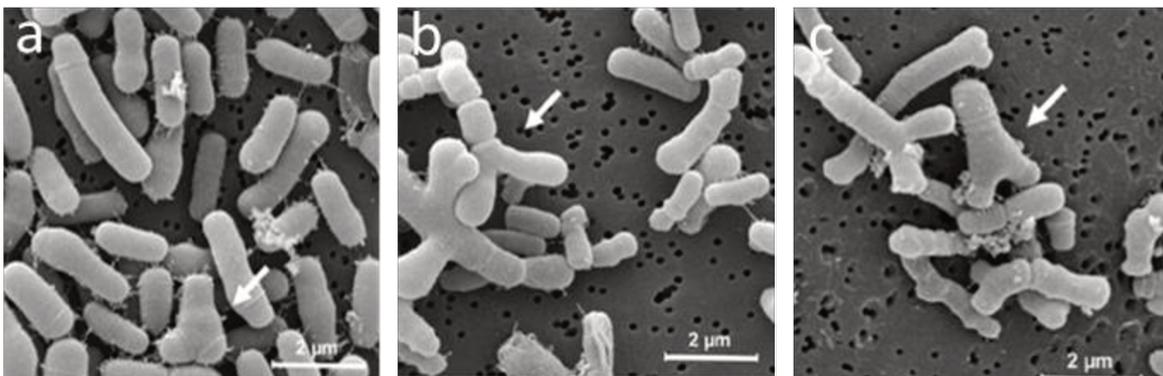


Figura 3. Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 cultivadas durante 22 días a pH no controlado (a) o a un pH controlado de 5 (b) y 6.5 (c). Las flechas blancas indican una morfología típica de las células del género *Bifidobacterium*. (Vinderola et al., 2012).

Los microorganismos probióticos se pueden agregar a los productos utilizando diferentes métodos. Pueden agregarse como microorganismos no fermentadores después de la fermentación y el enfriamiento con el único objetivo de ser administrados a través del tracto gastrointestinal (probióticos no iniciadores); o agregarse como cultivos iniciadores para fermentar el producto (probióticos iniciadores). Cuando los probióticos se utilizan como cultivo iniciador, hay que tener en cuenta la fermentabilidad (capacidad de acidificación) en el producto y el tiempo de fermentación relacionado con ella, viabilidad celular satisfactoria en el producto, capacidad de producción de sabor/textura adecuada y rentabilidad (Mohammadi et al., 2012). El uso de cepas probióticas como cultivos iniciadores en la fermentación de alimentos ha despertado interés en los tecnólogos alimentarios ya que la cepa podría presentar propiedades funcionales y tecnológicas, permitiendo reducir el tamaño del inóculo iniciador. Aunque las cepas de *Bifidobacterium* ya se utilizan en productos lácteos, tienen algunas características de comportamiento inferiores en comparación con las tradicionales bacterias acidolácticas (BAL) convencionales utilizadas en productos lácteos fermentados (Prasanna et al., 2012). Más específicamente, tienen un crecimiento y una producción de ácido más débiles en leche de vaca y requieren largos tiempos de fermentación que las BAL, condiciones anaeróbicas y un bajo potencial redox para su crecimiento. Por tanto, es muy importante seleccionar cepas adecuadas para incorporarlas a los productos lácteos probióticos. Estas incluyen cepas que crecen rápidamente, así como cepas que no producen sabores o texturas desagradables y que sean capaces de producir compuestos aromáticos y/o biopolímeros, que mejoran las propiedades organolépticas del producto (Prasanna et al., 2012). En el caso específico de *B. animalis* subsp. *lactis*, es una de las especies de *Bifidobacterium*

más utilizada en aplicaciones de probióticos (Mättö et al., 2006), ya que ha demostrado una buena supervivencia en el tracto gastrointestinal (GI) humano (Alander et al., 2001), y que ha mostrado mejor tolerancia a bajo pH y presencia de oxígeno (Matsumoto et al., 2004). Por lo tanto, *B. animalis* subsp. *lactis* es tecnológicamente más factible que otras bifidobacterias. Además, se sabe que metabólicamente, los miembros del género *Bifidobacterium* producen ácido acético y ácido láctico durante la fermentación de glucosa. Sin embargo, la temperatura de fermentación tiene un efecto directo sobre en la proporción de formación de estos ácidos. Østlie y col. (2003) atribuyeron una reducción significativa de la producción de ácido acético sobre el ácido láctico en *B. animalis* BB12 con un aumento de temperatura de hasta 45°C e informaron que, organolépticamente, es importante que el nivel de ácido acético no sea demasiado alto en productos lácteos fermentados. de Souza Oliveira y col. (2012) encontraron que una temperatura 42°C también disminuyó la tasa de formación de ácido acético.

Hay que tener en cuenta que todo alimento formulado con bacterias probióticas debe asegurar su viabilidad a lo largo de todo el procesamiento y almacenamiento. Para que las bacterias probióticas puedan ejercer su acción benéfica, éstas deben ser viables y estar presentes en un alto número al momento del consumo, y permanecer así hasta llegar a la parte final del tracto gastrointestinal. Es decir, que el producto debe contener al menos 10^6 UFC/ml de bacterias probióticas en el momento del consumo y deben ser consumidas regularmente (Vinderola, Prosello, et al., 2000). Un método para proteger a las bacterias probióticas y de esa forma que lleguen viables al tracto gastrointestinal humano es mediante técnicas de encapsulación.

1.2. ENCAPSULACIÓN

La encapsulación consiste en atrapar una sustancia o componente bioactivo en un material de soporte, con el fin de protegerlo del ambiente que lo rodea para conservar sus propiedades biológicas o fisicoquímicas. La sustancia encapsulada se denomina centro o núcleo activo, mientras que la matriz en la cual se dispersa este componente se conoce como material de recubrimiento o pared. En el caso de la industria alimentaria, todos los materiales empleados para la encapsulación de compuestos deben ser de grado alimenticio, es decir que los sistemas deben ser fabricados en su totalidad con ingredientes permitidos por el Código Alimentario Argentino (CAA), mediante operaciones y procesos de elaboración que se encuentren acreditados (Sarao & Arora, 2017).

La encapsulación es muy utilizada en la industria de alimentos, ya que puede emplearse con diversos propósitos, como el enmascaramiento de sabores, colores y olores, controlando las reacciones oxidativas, prolongando la vida útil, entre otras (Sarao & Arora, 2017). Se ha encontrado que la encapsulación mejoró la supervivencia de las bacterias probióticas cuando se las expuso a condiciones ácidas, sales biliares y tratamiento térmico suave (Sarao & Arora, 2017).

La elección del método adecuado de encapsulación depende del tipo de núcleo a encapsular, de la aplicación que tendrán los encapsulados, el tamaño de partículas requerido, las propiedades físicas y químicas del núcleo como del material de pared, el mecanismo de liberación, la escala de producción y el costo (Brignone et al., 2020). La efectividad de la encapsulación se ve afectada por los materiales utilizados. Los compuestos más comunes son carbohidratos y proteínas,

y sus combinaciones (Dianawati et al., 2016). En la presente tesis se utilizarán proteínas de suero lácteo, que serán descriptas en la siguiente sección.

1.3. PROTEÍNAS DE SUERO

Las proteínas de suero son obtenidas a partir del suero de quesería. Aproximadamente 85-90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como suero lácteo. Se estima que por cada kg de queso se producen 9 kg de suero el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Negrette Rodriguez, 2016). Las proteínas del suero de leche representan aproximadamente el 18-20 % de las proteínas totales de la leche. Están representadas principalmente por β -lactoglobulina (β -lg) (50%), α -lactoalbúmina (α -la) (20%), y en menor proporción por albúmina sérica bovina (ASB), inmunoglobulinas y proteínas menores (De Wit, 1998; Drioli & Giorno, 2016).

En Argentina el sector lácteo es uno de más importantes, teniendo un impacto muy grande en la economía regional y del país. Este sector destina la mayor parte de su volumen de producción a la industria quesera (Negrette Rodriguez, 2016). Por lo tanto, el volumen de suero lácteo generado es muy grande. Es importante resaltar que las proteínas del suero lácteo desempeñan un importante papel nutritivo por su alto valor biológico ya que contienen aminoácidos esenciales (leucina, triptófano, lisina y aminoácidos azufrados). Por lo tanto, constituyen una fuente proteica balanceada debido a que no presentan deficiencia en ningún aminoácido (Negrette Rodriguez, 2016).

Anteriormente, el suero era considerado como un producto de desecho de poco valor cuya disposición debía realizarse de la forma más económica posible (Arce-Méndez et al., 2015). Actualmente, sin embargo, el fraccionamiento del suero lácteo en sus componentes, principalmente lactosa y proteínas, ofrece una interesante posibilidad de empleo de estos constituyentes de gran importancia comercial en la elaboración de productos alimenticios de alta calidad (Posada et al., 2011). Por lo tanto, las proteínas del suero son recuperadas y utilizadas como ingredientes para muchas formulaciones en forma de concentrados o aislados proteicos.

Los concentrados de proteínas de suero (o WPC por sus siglas en inglés: Whey Protein Concentrate) tienen entre un 25 y un 80% de proteína (Agrarias, 2019). Se utilizan en productos de confitería, cereales y barras nutritivas, quesos procesados, productos horneados, bebidas deportivas y formulaciones para ganar masa muscular. Los polvos de WPC con contenido de proteínas en el rango del 35 al 80 % se pueden producir mediante ultrafiltración (UF), que elimina la lactosa, los minerales y el nitrógeno no proteico (NPN); luego, las proteínas del suero se secan por aspersión (Early, 2012).

Por otro lado, los aislados de proteína de suero, comúnmente conocidas como WPI (por sus siglas en inglés: Whey Protein Isolate) contienen $\geq 90\%$ de proteína y 4-6% de agua. El 4-6% restante del ingrediente es una combinación de grasa, lactosa y ceniza. Debido a su alta pureza proteica y claridad de solución, los WPI se utilizan ampliamente en suplementos nutricionales, bebidas deportivas y saludables, y bebidas fortificadas con proteínas. La cromatografía de intercambio iónico es uno de los métodos utilizados en la fabricación de WPI. Proporciona un nivel adicional

de selectividad por encima del procesamiento de membrana (Foegeding et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas de suero son ampliamente utilizadas en una variedad de alimentos gracias a sus propiedades tecnológicas y funcionales, entre las que se encuentran su capacidad gelificante y emulsionante, además de poseer un sabor neutro, y alta digestibilidad. Las propiedades funcionales definen el comportamiento de las proteínas en los alimentos y refleja la manera en la cual las proteínas interactúan con otros componentes, tales como lípidos, azúcares, sales y otras proteínas. El término funcionalidad, que es aplicado a ingredientes alimenticios, ha sido definido como “cualquier propiedad más allá de los atributos nutricionales que influencia la utilidad de un ingrediente en los alimentos” (Morales, 2017). Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas a sus propiedades físicas, químicas y conformacionales (Morales, 2017), como su carácter anfifílico, actividad superficial, peso molecular, carga neta, solubilidad y flexibilidad conformacional. Por lo tanto, dependen también de los cambios en su conformación, por lo que son muy importantes las condiciones del medio, así como las condiciones de procesamiento tales como pH, fuerza iónica, presión y temperatura, entre otras. El conocimiento de la relación entre las propiedades intrínsecas de las proteínas y los factores extrínsecos tales como temperatura, pH, sales, y concentración de proteína es muy importante para deducir y controlar las propiedades funcionales (Spotti, 2013).

Las funciones típicas de las proteínas en los alimentos incluyen: gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos, entre otras (Spotti, 2013; Loyeau, 2020). La

gelificación de las proteínas de suero lácteo es una de las propiedades funcionales más destacadas. Muchos alimentos populares como postres tipo gelatina, embutidos, análogos de pescados tipo surimi, son alimentos basados en geles (Spotti, 2013). La gelificación es una propiedad tecnológica de algunas proteínas y polisacáridos, y tiene un papel importante en la textura de muchos alimentos: productos lácteos, gelatinas, masa panaria, etc. Los geles comestibles son estructuras de hidrocoloides que forman dispersiones coloidales y bajo determinadas condiciones experimentales forman una red capaz de retener grandes cantidades de agua. Estos hidrocoloides son generalmente proteínas (gelatina, albúmina) o polisacáridos (pectina, almidones solubles) con capacidad gelificante (Gutiérrez, 2000).

Un gel puede ser considerado como algo intermedio entre sólido y líquido, es decir su organización permite mantener una cierta forma y resistir ciertas fuerzas o tensiones, pero pueden contener hasta un 99% de líquido (Gutiérrez, 2000). Es decir, es un sistema difásico constituido por una red macromolecular tridimensional sólida, que en su malla retiene una fase líquida. En la formación de un gel, los tipos de enlaces en juego marcan las principales características del gel. Generalmente cuando los enlaces son covalentes se forma un gel con retículo tridimensional bastante estable, incluso frente a la agitación. En cambio, cuando predominan los enlaces no covalentes, como los puentes hidrógeno, la estabilidad del gel producido es más escasa, y se puede llegar a destruir por acción mecánica (Gutiérrez, 2000). Los enlaces involucrados van a depender del tipo de molécula y condiciones de gelificación para su obtención.

1.3.1. GELES DE PROTEÍNAS DE SUERO

Para formar un gel, los materiales alimenticios deben contener moléculas capaces de formar uniones (cross-links) en tres dimensiones. Por su química, las proteínas tienen muchas ventajas para este propósito. Las propiedades de las proteínas importantes en la gelificación son la flexibilidad, incluyendo su habilidad para desnaturar y dar cadenas extendidas, y especialmente, su habilidad para formar redes extensas por entrecruzamiento. En el caso de las proteínas globulares, primero se debe lograr la desnaturación de las mismas (Spotti, 2013). Durante la desnaturación, las proteínas se someten a un desplegamiento de sus estructuras tridimensionales para dar cadenas extendidas, pero sin ruptura de uniones covalentes. La desnaturación puede ser llevada por calor, frío, alta presión, ultrasonido, luz UV, acción química, entre otros (Abbas Syed et al., 2021). Debido a esto, se altera el balance entre las diferentes fuerzas que mantienen a la proteína en su estado nativo, como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, interacción dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas, etc. (Spotti, 2013). La desnaturación expone los grupos hidrofóbicos que en estado nativo se encuentran en el interior de la molécula. Cuando los aminoácidos no polares son expuestos a través del desplegamiento o reacomodamiento de la estructura molecular, las interacciones intermoleculares toman lugar. Así, las regiones de la molécula originalmente involucradas en mantener la estructura de la proteína nativa, se vuelven disponibles para uniones intermoleculares (García Guerrero, 2019). Si la concentración de proteínas es suficiente (por encima de la concentración crítica), se forma el gel.

El aspecto y las propiedades de los geles de proteína de suero, como ser la capacidad de retención de agua, la permeabilidad, la textura y la apariencia, se ven afectados por una serie de factores, en particular la concentración de proteína, tiempo y temperatura de calentamiento, o aplicación de presión, el pH y la fuerza iónica, entre otros. Estos factores, a su vez influyen en los tipos de fuerzas que mantienen los componentes juntos (Henriques et al., 2020); (Negrette Rodriguez, 2016). A medida que aumenta la concentración de proteína, el número de posibles interacciones entre las moléculas es mayor, lo que resulta en un aumento de la fuerza de gel, un tiempo de gelificación reducido y una red de gel más fina (Negrette Rodriguez, 2016). El pH afecta a la conformación molecular y las interacciones intermoleculares, influyendo en la estructura de red de gel y sus propiedades funcionales y sensoriales. Las diferencias en las propiedades de los geles a diferentes pHs se atribuyen a las variaciones en las interacciones electrostáticas y formación o no de enlaces disulfuro (Negrette Rodriguez, 2016). Las sales tienen un efecto importante sobre las propiedades de los geles de proteína de suero, especialmente a valores de pH alejados del punto isoeléctrico (pI: pH en el cual la carga neta es cero), donde las proteínas se encuentran cargadas eléctricamente. La adición de NaCl o CaCl₂ a una solución de WPC o WPI dan como resultados un aumento en la resistencia del gel hasta alcanzar valores máximos, y luego la resistencia del gel disminuye a mayores concentraciones de sal (Negrette Rodriguez, 2016).

1.3.2. GELIFICACIÓN EN FRIO

En general, la gelificación de proteínas requiere una fuerza impulsora para desplegar la proteína nativa, seguida de un proceso de agregación ordenada que

forma una red tridimensional (gel) (Weng & Zheng, 2015). Los geles de proteínas de suero son comúnmente obtenidos través de dos mecanismos: geles inducidos por calor, llamados geles térmicos y geles inducidos por la adición de sales o ácidos, llamados geles fríos o en inglés, *cold set gels*. En los geles inducidos por calor, el sistema, que se encuentra a una concentración por encima de la concentración crítica (para WPI es aprox. 10%), es sometido a una temperatura generalmente mayor que la temperatura de desnaturalización de las proteínas, por lo que se produce la pérdida de la estructura secundaria de las mismas, desplegamiento de las cadenas, seguido de agregación y formación de la red del gel a través del desarrollo de enlaces covalentes y no covalentes; todo en un mismo paso. Por el contrario, en la formación de geles fríos estos pasos se producen de forma separada. Inicialmente, la solución de proteínas, que se encuentra por debajo de la concentración crítica (usualmente igual o por debajo de 9%), se calienta para causar desnaturalización y la formación de pequeños agregados solubles a un valor de pH alejado del pI y a baja fuerza iónica. Luego, la solución es llevada a temperatura ambiente y a continuación se agregan ácidos (hasta llegar cerca del pI) o sales (que apantallen las cargas) para lograr que los agregados tengan baja repulsión electrostática y así interaccionen entre ellos, lo que lleva a la formación del gel a temperatura ambiente (Chen et al., 2019).

Además de las proteínas de suero, otras proteínas globulares forman geles en frío, como ser las proteínas de soja, lactoferrina, proteína de clara de huevo, proteína de avena y la proteína miofibrilar porcina (Chen et al., 2019).

Los geles inducidos por ácido son comunes en la producción de una variedad de productos alimenticios como surimi, mayonesa y postres gelatinosos

(Henriques et al., 2020). En la elaboración de productos lácteos acidificados es importante mantener un control del proceso de acidificación para asegurar un adecuado descenso del pH que propicie los cambios sensoriales y estructurales que se buscan (Valerio, 2019). El descenso de pH puede ser llevado a cabo químicamente, aplicando lentamente ácidos, mediante la adición de glucono- δ -lactona (GDL), o mediante fermentación ácido láctica utilizando un cultivo iniciador (Henriques et al., 2020). Hay que tener en cuenta que la adición directa de ácidos orgánicos e inorgánicos fuertes puede generar un cambio brusco de pH que resulta en la formación de agregados sin buena cohesión, o redes tridimensionales frágiles (Vardhanabhuti et al., 2010).

La Gluco- δ -Lactona (GDL), es un ácido débil que es considerada sustancia GRAS (generalmente reconocida como segura) y que se hidroliza a ácido glucónico en agua, liberando lentamente iones hidrógeno con la consiguiente reducción del pH (Weng & Zheng, 2015). El pH final que se alcanza en geles inducidos por GDL es una función de la cantidad en la que se agrega inicialmente (Lucey & Singh, 1997). La adición de grandes cantidades de GDL al sistema provoca una acidificación rápida y, en consecuencia, una disminución rápida del pH, que podría alcanzar valores por debajo del pI, lo que da como resultado geles más débiles y frágiles. En cambio, los geles que se forman cerca del pI o se mantuvieron cerca de este pH por más tiempo, tienden a ser más fuertes y más deformables (Noir, 2019).

En el caso de la acidificación por bacterias el proceso es parecido a lo que ocurre en la producción de yogurt. Las bacterias ácido-lácticas producen ácido láctico a través de la fermentación de una fuente de carbono, lo que desciende el pH, hasta que se alcanza un pH muy bajo (en el caso del yogurt el pH es 4,6), el cual

comienza a inhibir la acción de la misma bacteria y se detiene su crecimiento (Lucey & Singh, 1997). Al descender el pH, se llega hasta el punto isoeléctrico del sistema, en donde los agregados proteicos formados mediante acción térmica no se repelen electrostáticamente, por lo que interactúan entre sí y forman la matriz del gel (Hazrati et al., 2021). En el caso del WPI, el punto isoeléctrico medido a través del potencial zeta = 0 mV en nuestro laboratorio fue de 4,7 para WPI nativo (Spotti et al., 2019a), lo cual fue un valor levemente menor que el obtenido por Lam y col. (2015), que obtuvieron un pH de 5 usando la misma técnica. Parris y Baginski (1991) informaron un valor de pI para WPI de 4,6, utilizando la técnica de precipitación isoeléctrica. Estas diferencias en los valores de pI informados pueden reflejar ligeras diferencias en el material y/o la técnica de medición.

La gelificación en frío ha recibido una creciente atención en los últimos años porque pueden ser utilizado como vehículo de compuestos bioactivos ya que forma geles a temperatura ambiente (Weng & Zheng, 2015). Este tipo de geles podrían servir como un dispositivo de liberación controlada de compuestos bioactivos sensibles al calor y, a la vez, podrían encapsular y proteger micronutrientes y probióticos dentro de su red (Chen et al., 2019). En el caso de bacterias probióticas puede estabilizar y mantener su viabilidad durante el almacenamiento, protegerlas durante su paso por el tracto gastrointestinal y proporcionar una liberación controlada en el colon (Léonard et al., 2016). Mabrouk y col. (2021), por ejemplo, estudiaron la viabilidad de tres cepas probióticas cuando fueron agregadas de forma libre o encapsuladas en coacervados de proteína, a geles de proteínas de suero con gelatina. Ellos observaron que los sistemas con *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus plantarum* NRC AM10, y *Lactobacillus acidophilus* CH-2 encapsuladas

presentaron más UFC/g que las bacterias libres luego de 2 meses de almacenamiento. Sin embargo, en este estudio, no se utilizó la acidificación bacteriana para producir el gel. En otro trabajo de Ainsley Reid y col. (2007), se investigó el efecto de un aislado de proteínas de suero en la microencapsulación de *Lactobacillus rhamnosus* R011 mediante gelificación con CaCl_2 en la producción y almacenamiento de galletitas, jugo de arándano y jugos vegetales. Durante la producción de galletitas y su almacenamiento por dos semanas se vio más estabilidad en aquellos sistemas donde se utilizaron bacterias encapsuladas en geles de WPI, mientras que en aquellos sistemas donde se utilizaron las bacterias suspendidas de solución de WPI no tuvieron la misma protección y se vio una caída en la viabilidad de las mismas, demostrando que los geles de WPI presentaron protección durante el procesamiento del producto. Las bacterias encapsuladas en geles también mostraron tener más viabilidad en los jugos almacenados a 4°C y los jugos de arándanos almacenados a -40°C , en comparación con las bacterias libres liofilizadas en WPI. En este trabajo tampoco se utilizaron las bacterias para generar la matriz del gel. Por el contrario, en el trabajo de Léonard y col. (2016) atraparon bacterias ácido lácticas (BAL) probióticas (*Lactobacillus plantarum* CNRZ1997 and *Lactococcus lactis*) en un sistema bifásico de alginato de sodio y caseinato de sodio. En este sistema se utilizó la acidificación bacteriana para liberar iones de calcio progresivamente del carbonato de calcio, lo que causó la gelificación de las fases coexistentes, creando un sistema de fases separadas de alginato-caseinato. También se utilizó GDL para producir el mismo efecto, y comparar las matrices en cuanto a microestructura y propiedades reológicas. La gelificación de los sistemas GDL/ CaCO_3 o BAL/ CaCO_3 produjo una amplia gama de estructuras, geles débiles y

fuertes, con módulos elásticos desde 10 a 1000 Pa. Sin embargo, en este trabajo no se estudió qué protección tuvo esta matriz sobre los probióticos.

Por lo tanto, teniendo como hipótesis que las proteínas de suero lácteo tienen la capacidad de formar geles ácidos mediante fermentación bacteriana, y que dichos geles presentarían además un efecto protector en la viabilidad de las mismas, en esta tesis se propuso la encapsulación de bacterias probióticas en geles ácidos producidos por ellas mismas con la adición de AX para mejorar su viabilidad en el tiempo y potenciar el efecto benéfico luego de ser consumidos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. GENERALES

Estudiar la formación de geles ácidos de proteínas de suero lácteo y arabinosilanos mediante fermentación por bacterias probióticas, y utilizar esa matriz para encapsular dichas bacterias y promover su viabilidad en el tiempo.

2.2. ESPECÍFICOS

- Estudiar la formación de geles de proteínas de suero lácteo/arabinosilanos mediante acidificación por bacterias probióticas, y caracterizar dichos geles en el momento de ser formados y a lo largo de su almacenamiento.
- Determinar la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento de los geles.
- Determinar la capacidad de las bacterias para utilizar los arabinosilanos como fuente de energía.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

El aislado de proteínas de suero lácteo (WPI, por sus siglas en inglés “Whey Protein Isolate”) fue generosamente facilitado por Davisco Foods Internacional Inc. (Minnesota, Estados Unidos). Su composición centesimal fue: 98,77% de proteínas en base seca (determinado mediante ensayo de Kjeldhal), $0,4 \pm 0,2\%$ de grasa, $2,0 \pm 0,2\%$ de cenizas, $4,6 \pm 0,2\%$ de humedad y menos del 0,5% de lactosa.

Se utilizaron arabinosilanos (AX) extraídos de salvado de maíz, que fueron producidos en el laboratorio de estudios fisicoquímicos del ITA mediante tratamiento alcalino. En el anexo 1 se encuentra la metodología de obtención. La composición de estos AX se determinó previamente por personal del laboratorio de fisicoquímica del ITA y consistió en 53,4% xilosa, 30,2% arabinosa, 5,6% galactosa, 3,4% glucosa, 5,9% de ácido glucurónico, 1,1% ácido galacturónico 0,3% fucosa, 0,1% ramnosa, mediante cromatografía gaseosa (según Pettolino et al., 2012).

Se utilizó una cepa autóctona de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, aisladas de leche materna por el Instituto de Lactología Industrial (CONICET, UNL), quienes amablemente nos proveyeron la cepa (Zacarías y col. 2011).

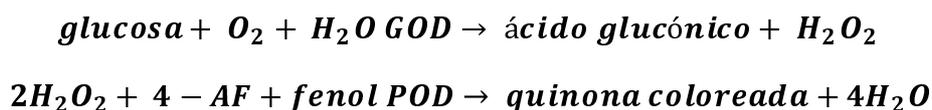
Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ARABINOXILANOS

3.2.1. CONTENIDO DE ALMIDÓN

Para determinar el contenido de almidón que poseen los arabinosilanos se utilizó una técnica enzimática-colorimétrica usando un kit enzimático de determinación de glucosa (Glicemia enzimática, Wiener Lab).

El proceso de hidrólisis del almidón a glucosa comprende varias etapas: (i) gelatinización del almidón, (ii) licuefacción y (iii) sacarificación. La licuefacción se produce cuando se emplea la enzima α -amilasa (durante o después de gelatinizar el almidón), cortando las cadenas de los polímeros amilosa y amilopectina en cadenas de tamaño regular, dando como resultado dextrinas, maltosa, maltotriosa y maltopentosa. Para la hidrólisis hasta glucosa, se requiere de una segunda etapa consecutiva a la licuefacción denominada sacarificación, adicionando la enzima amiloglucosidasa (AMG) (Cruz Ruiz, 2012). Finalmente, la concentración de glucosa se determina con un kit enzimático comercial, mediante las siguientes reacciones:



Donde AF es aminofenazona, GOD es glucosa oxidasa y POD es peroxidasa.

El compuesto coloreado formado al final de la reacción se determina espectrofotométricamente, por medición de la absorbancia a 505 nm.

Durante la puesta a punto de la técnica, se probaron distintas combinaciones de enzimas disponibles en el laboratorio para alcanzar la hidrólisis total del almidón: (i) α -amilasa + amiloglucosidasa y (ii) amiloglucosidasa. De estos

resultados preliminares, se observó que a través de los dos métodos se obtuvieron los mismos resultados por lo que se decidió continuar utilizando sólo la enzima amiloglucosidasa para hidrolizar completamente el almidón. También se pusieron a punto la dosis de enzima a utilizar (teniendo en cuenta la recomendación del fabricante), y el tiempo de hidrólisis.

En primer lugar, para realizar la curva de calibrado, se prepararon soluciones de almidón de maíz (Sigma Aldrich) en distintas concentraciones, que fueron tratadas térmicamente a 90°C durante 30 minutos con el objetivo de que el mismo se gelatinice y permitir de esta manera el posterior ataque de las enzimas, para producir la hidrólisis del polímero. Luego de cumplirse los 30 min en el baño térmico a 90°C, se bajó la temperatura del baño a 60°C, se agregó la enzima amiloglucosidasa (OPTIDEX) y se dejó incubar durante otros 20 min. Pasado este tiempo, a cada muestra se le determinó la concentración final de glucosa liberada mediante el kit de glucosa enzimática (Wiener lab), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron los reactivos con la muestra, la mezcla se dejó incubando en un baño térmico a 37°C durante 10 min, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Lambda 20 a una longitud de onda de $\lambda = 505$ nm.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron en función de la concentración de almidón de maíz, y se realizó una regresión lineal para obtener la pendiente de la curva de calibrado, según la ecuación:

$$Abs = pendiente \times Conc. Almidón \quad (Ec. 1)$$

Cálculo del contenido de almidón en AX:

Una vez conocida la pendiente de la curva de calibrado, se procedió a preparar una solución de buffer citrato-fosfato de pH=4,5 que contenía 1% de arabinosilano. Esta muestra se sometió al mismo tratamiento enzimático de las soluciones de almidón previamente descrito.

Con el valor de la absorbancia a 505 nm se ingresó a la curva de calibrado para obtener el contenido de almidón correspondiente a la muestra de AX. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3.2.2. PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO

Para determinar la viscosidad de soluciones diluidas de polímeros y relacionarla con el tamaño medio del polímero, se recurre a la viscosimetría capilar determinando el tiempo que tarda en fluir un volumen de solución de polímero a través de un tubo capilar y es comparado con el tiempo para un solvente puro (Harding, 1998). Los fundamentos de la técnica son explicados en el anexo, sección 7.2.

La viscosimetría capilar de soluciones poliméricas diluidas es muy útil porque además de ser extremadamente simple, permite estimar masas molares medias de copolímeros (de compleja determinación por dispersión de luz), dimensiones moleculares, e indirectamente grados de ramificación.

La determinación de la viscosidad intrínseca se realizó midiendo el tiempo de flujo (t) requerido para que un volumen determinado de solución de AX atravesara el tubo capilar por efecto de la gravedad en comparación con el tiempo requerido

por el solvente puro, que en este caso es agua (t_0). Para las determinaciones de viscosidad se utilizó un viscosímetro capilar Ubbelohde marca “Technico” (Constante Nominal: 0,01) en un baño termostático frío/calor “Precision” modelo 75943, para mediciones de viscosidad cinemática con temperatura controlada (Labtech International Ltd., Francia) (Figura 4 A y B).



Figura 4. A: viscosímetro capilar. B: baño viscosimétrico con control de temperatura.

Las soluciones de AX fueron preparadas en las siguientes concentraciones: 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1% y 0,15%, por duplicado. Luego, se procedió a la determinación de la viscosidad a temperatura controlada de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Para esto se realizaron al menos 4 mediciones de tiempo de pasaje entre aforos por cada dilución de cada una de las muestras, para tener una representatividad considerable de cada una de ellas.

Con las medidas de los tiempos para cada dilución de la muestra, se calcularon la viscosidad específica y la viscosidad relativa, η_{sp} y η_{rel} ,

respectivamente, de acuerdo las ecuaciones descritas en el punto 7.2 del anexo, y se graficaron de acuerdo a la Figura 5. Las ordenadas al origen de cada sistema se tomaron como valor de la viscosidad intrínseca $[\eta]$.

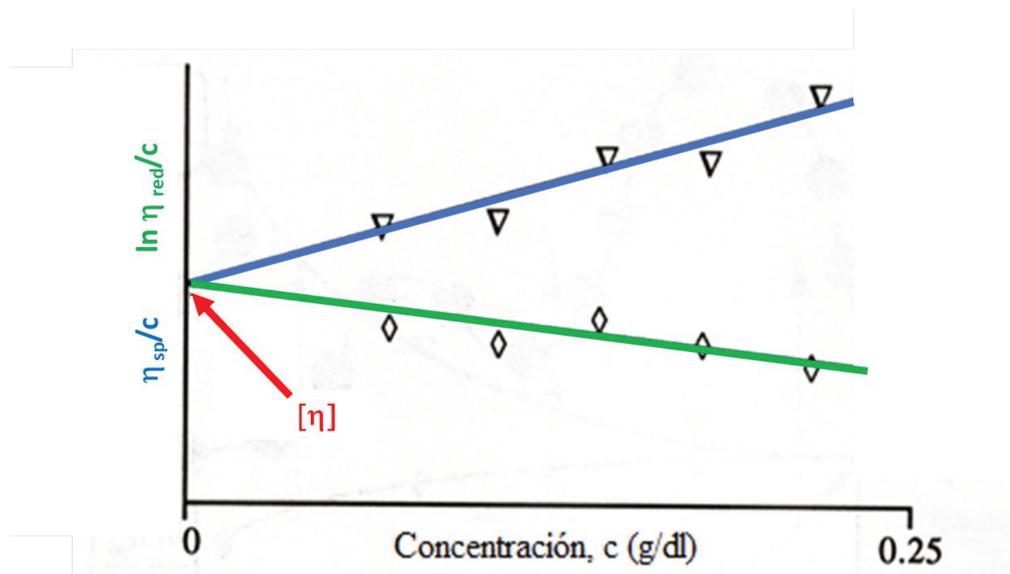


Figura 5. Gráfica ideal de η_{sp}/c y $(\ln \eta_{red})/c$ vs. c (g/dL) para el cálculo de viscosidad intrínseca. Adaptada de (Harding, 1997).

El peso molecular viscosimétrico fue calculado mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Ec. 2):

$$[\eta] = k * M_v^a \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde k (dL/g) y a son constantes tabuladas que dependen de la naturaleza del polímero, del disolvente y de la temperatura. Se utilizaron las constantes reportadas por Yadav y col. (2007) para fibra soluble aislada de salvado de maíz (arabinoxilanos).

3.2.3. PESO MOLECULAR DE AX POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

El peso molecular del AX se determinó también usando cromatografía de exclusión molecular. Las muestras se prepararon disolviendo los arabinosilanos en agua purificada. Las soluciones (200 μ l) se inyectaron en una columna Sephacryl HR-500 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). El eluyente fue azida de sodio al 0,02% en agua purificada, siendo el caudal de 1,3 mL/min. Se utilizó un detector de índice de refracción (Optilab rEx). La recopilación y el análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software ASTRA (versión 5.3.4.10) de Wyatt Technology. Se utilizaron estándares de pullulanos (Sigma Aldrich) para realizar la curva de calibrado ($r^2=0,993$).

3.2.4. POTENCIAL Z Y TAMAÑO DE PARTÍCULA DE AX

El potencial Z permite determinar el potencial superficial de una partícula, y de esa forma relacionarla con su estabilidad coloidal. Los fundamentos de esta técnica son explicados en el anexo, sección 7.3. Para esta determinación, se prepararon por duplicado soluciones de 1% de AX a pH 7 que luego fueron filtradas por membranas de 0,45 μ m (MilliporeMF, Millipore Corp., Billerica, MA). Las soluciones fueron inyectadas en una celda capilar provista de dos electrodos a cada lado para medición de movilidad electroforética (Figura 6). El potencial Z se determinó midiendo la dirección y velocidad de las partículas al aplicar un campo eléctrico a 25°C. Las mediciones de potencial Z se realizaron haciendo 10 determinaciones en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido).

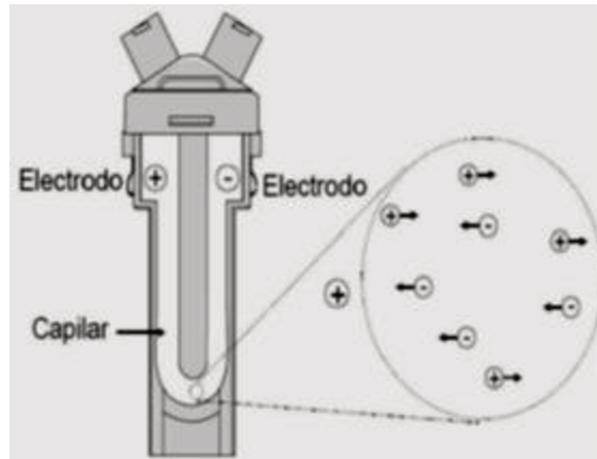


Figura 6. Celda capilar con electrodos a cada lado (Malvern Instruments Ltd. 2014).

El tamaño de las partículas de AX se estudió mediante dispersión dinámica de luz utilizando el mismo equipo (Zetasizer Nano ZS90) (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), que posee una fuente de luz láser He-Ne (632,8 nm). Los fundamentos de esta técnica son explicados en la sección 7.4.

Las dispersiones de AX 1% fueron colocadas en una celda rectangular con caras transparentes y las mediciones fueron realizadas a un ángulo fijo de 90°. El rango de medición del equipo varía entre 0,6-6000 nm. Para realizar las correspondientes diluciones de los sistemas a analizar, se empleó agua destilada filtrada libre de partículas, utilizando membranas de nitrocelulosa Merck Millipore (Cork, Irlanda) de 0,45 y 0,22 μm . El tamaño de partícula se reportó mediante el diámetro medio de la distribución de partículas basada en intensidad (Z-average). El Z-average se informó como el promedio y la desviación estándar de diez mediciones, que fueron realizadas a 25°C.

3.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES ÁCIDOS

3.3.1. PREPARACIÓN DE AGREGADOS PROTEICOS

Se prepararon soluciones de WPI al 3 y 6% y se dejaron en heladera por 24 h. Para lograr la desnaturalización de las proteínas y la consiguiente formación de los agregados proteicos, las soluciones preparadas previamente fueron tratadas térmicamente a 68,5°C durante 2 h. Luego, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Estas condiciones fueron estudiadas en trabajos previos del Laboratorio de Análisis Físicoquímicos del ITA (Spotti et al., 2019).

3.3.2. PREPARACIÓN DE GELES ÁCIDOS CON GDL

Las suspensiones de agregados proteicos producidas en el ítem anterior por calentamiento, fueron diluidas al 3% de proteínas, y se les agregó glucono- δ -lactona (GDL) (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) al 0,23% p/p para que el pH de los sistemas baje hasta su pI. La concentración necesaria de GDL para que el pH final de los geles fuera el adecuado para lograr la gelificación fue determinada previamente por personal del Laboratorio de Análisis Físicoquímicos de Alimentos del ITA.

Estos geles fueron utilizados para ensayar y poner a punto la mayoría de las técnicas realizadas en esta tesis.

3.3.3. PREPARACIÓN DE GELES ÁCIDOS CON BACTERIAS PROBIÓTICAS

Se utilizaron las mismas suspensiones de agregados proteicos que en ítem 3.3.1, a 3 y 6%. Luego, se prepararon soluciones de glucosa (Glu) en las siguientes

concentraciones (0,2; 0,50; 1,0 y 2,0% p/p), que fueron esterilizadas en un autoclave (Senova Biotech ZXD-AV75-VII, Shanghai) durante 15 min a 121°C.

Por otro lado, se preparó un cultivo de la cepa *Bifidobacterium lactis* INL 1 (INL1). Previo a su utilización las cepas se reactivaron a partir de su stock congelado a -70°C (MRS + glicerol 17% v/v) y se realizaron dos repiques en caldo MRS. Los cultivos frescos (18 h) de las cepas se centrifugaron (6000 rpm, 10 min), se lavaron con buffer PBS y se resuspendieron en el mismo buffer. Los sistemas WPI a 3 y 6% se mezclaron con las soluciones de glucosa para lograr concentraciones finales de 0,1, 0,25, 0,5 y 1,0% de glucosa, y se inocularon con las suspensiones de bacterias para llegar a un recuento inicial de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC/g. Estas mezclas se incubaron a $42 \pm 1^\circ\text{C}$, para promover la acidificación y gelificación de los sistemas. Durante todo el proceso de preparación de los geles se trabajó entre mecheros en un ambiente esterilizado con alcohol y se utilizaron recipientes estériles. Una vez formados, los geles fueron almacenados a 4°C hasta su análisis.

De este estudio, se pudo observar que la concentración óptima proteínas fue del 3% p/p, la cantidad óptima de bacterias probióticas para lograr una buena estructura de gel y un tiempo de fermentación razonable fue de 1×10^8 UFC/g, y que la concentración mínima de glucosa para lograr un gel autosostenible fue de 0,25% p/p. Por lo tanto, se estudió el efecto del agregado de AX en sistemas con 0; 0,1 y 0,25 % p/p. La cantidad adicionada de AX fue del 2%, para que sea compatible con un producto enriquecido en fibra (como se mencionó en el punto 1.1.1, según el CAA). Para esto, se mezclaron las cantidades adecuadas de WPI, bacterias, glucosa y solución de AX (previamente hidratada por 24 h), y se procedió a la incubación de

los sistemas como se mencionó previamente. Luego de la incubación, los sistemas fueron almacenados a 4°C hasta su análisis.

3.3.4. DETERMINACIÓN DEL PH DE GELES

El descenso de pH durante la fermentación se midió con un pHmetro Sartorius PY-E50-2S, Lab Instruments (Alemania), y con estos datos se construyeron las curvas de acidificación.

Los sistemas se dejaron en baño a 42°C hasta que el pH final estuviera cercano a 5, o hasta alcanzar los 300 min (lo que sucedía primero). Finalizada la fermentación los geles se almacenaron durante un mes a 4°C. A estos geles también se les realizaron dos medidas puntuales de pH: (i) Luego de 24 hs de finalizada la fermentación y (ii) A los 30 días de almacenamiento.

3.3.5. GLUCOSA CONSUMIDA

Para conocer la cantidad de glucosa consumida por las bacterias durante la incubación, para acidificar el medio y promover la formación de los geles, se determinó el contenido de glucosa remanente en el agua de sinéresis expulsada por el gel. Para ello se utilizó el kit de glucosa enzimático mencionado en el apartado 3.2.1, siguiendo las especificaciones del fabricante, y midiendo la absorbancia de las muestras a 505 nm.

La curva de calibrado se realizó con distintas diluciones de una solución patrón de glucosa (Figura 7), con la que se obtuvo la curva de la Figura 8.

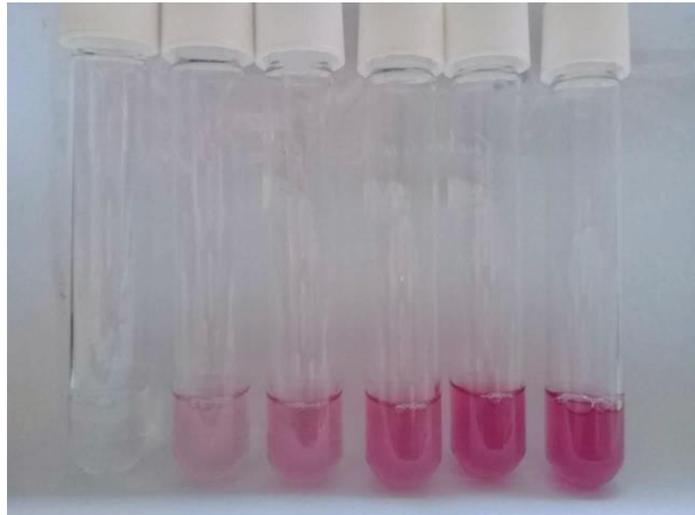


Figura 7. Soluciones coloreadas con distintas concentraciones de glucosa.

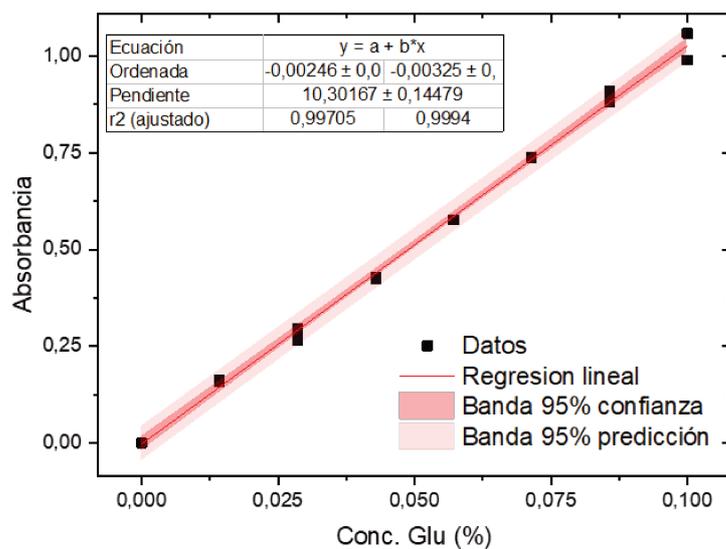


Figura 8. Curva de calibrado para la determinación del contenido de glucosa.

3.3.6. SINÉRESIS

Sinéresis es la expulsión de líquido de un gel, que puede ocurrir luego de formarse el gel o bien cuando transcurre algún tiempo luego de la gelificación debido a reacomodamientos en el interior de la red. Este parámetro es importante ya que determina la calidad organoléptica del producto en el almacenamiento.

A todos los geles, una vez formados, se les determinó la sinéresis mediante la determinación del peso del líquido expulsado con respecto al peso del gel utilizando la ecuación 3, luego de i) 24 hs, y ii) a las 4 semanas de almacenamiento a 4°C,

$$\text{Sinéresis (\%)} = \frac{\text{Peso gel inicial (gr)}}{\text{Peso agua expulsada (gr)}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

3.3.7. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

Se refiere a la capacidad de retención de agua (CRA) por parte de la red del gel cuando se aplica una presión externa (gravedad, calentamiento, centrifugación, presión, etc.). Luego de 24 h de almacenamiento, se cortaron porciones de gel de aproximadamente 2 gramos, se colocaron en tubos de centrífuga de 15 ml, y se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm (Heal Force, modelo Neofuge 18R). Luego, se registró el peso del gel antes y después de la centrifugación, excluyendo el líquido que liberó cada gel luego de ser centrifugado (Kuhn et al., 2010). Por último, se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{CRA (\%)} = \left[\frac{(\text{Peso Agua Total} - \text{Peso Agua exhudada})}{\text{Peso Agua Total}} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

3.3.8. ANÁLISIS DE PROPIEDADES MECÁNICAS Y TEXTURALES DE GELES ÁCIDOS

El estudio de las propiedades mecánicas de los geles se llevó a cabo mediante el estudio de compresión uniaxial y el análisis de perfil de textura por compresión en una máquina universal de ensayos Instron (modelo 3344, INSTRON Corp., Norwood, EEUU) a las 24 h (a 4°C) de la formación de los geles.

3.3.8.1. Compresión Uniaxial

Las propiedades mecánicas se determinaron con una máquina universal de ensayos INSTRON con un disco de teflón de 50 mm de diámetro. Este disco fue previamente lubricado con aceite siliconado para minimizar la fricción al realizar los ensayos. Las muestras de gel fueron cilindros de 2 cm de altura y 2 cm de diámetro. Los ensayos se realizaron a 25°C, comprimiendo los geles hasta ruptura, a una velocidad de 1 mm/s (Figura 9). Los datos obtenidos fueron fuerza ($F(t)$) y altura ($H(t)$) en función del tiempo. Con ellos se calcularon el esfuerzo de Hencky (σ_H), que puede ser definido como:

$$\sigma_H = F(t) \cdot \frac{H(t)}{(H_0 \cdot A_0)} \quad (\text{Ec. 5})$$

Similarmente, se calculó la deformación de Henky (ε_H) en función del tiempo como:

$$\varepsilon_H = -\ln \left(\frac{H(t)}{H_0} \right) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde $F(t)$ y $H(t)$ son la fuerza y la altura a un determinado tiempo; A_0 y H_0 el área y altura inicial del gel, respectivamente.

Los parámetros calculados a partir de los datos de compresión fueron:

- Esfuerzo máximo a la fractura (σ_M): máximo valor durante el ensayo.
- Deformación máxima (ε_M) máximo valor de deformación correspondiente al máximo esfuerzo (σ_M).
- W_f : trabajo de fractura asociado a la dureza; es calculado como el área bajo la curva (σ_H vs. ε_H) entre 0 y ε_M .
- Módulo de Young (E): calculado como la pendiente de la región lineal e inicial de la curva σ_H vs. ε_H (5% de deformación).

- Deformación a la ruptura (Def. Rupt.) (%): es la deformación en el punto de fractura y se calcula como:

$$\text{Def. Rupt. (\%)} = \frac{(H_F - H_0)}{H_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde H_F es la altura final y H_0 es la altura inicial del gel, respectivamente (Spotti et al., 2012).

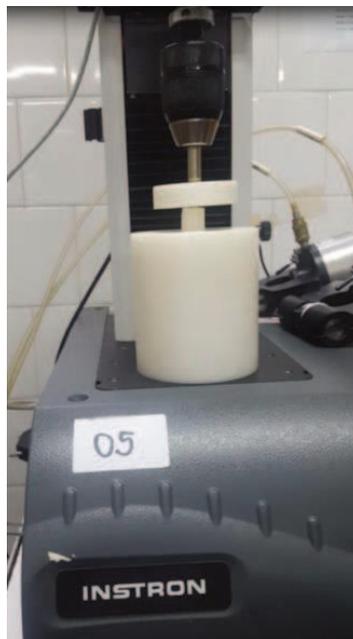


Figura 9. Ensayo de Compresión.

3.3.8.2 Análisis de perfil de textura por compresión (TPA)

En la actualidad, el método instrumental comúnmente utilizado para medir textura de alimentos es el análisis del perfil de textura (TPA). En el ensayo TPA, un émbolo comprime de forma uniaxial y durante dos veces consecutivas una muestra para simular el movimiento de la mandíbula durante la masticación. Hay que tener en cuenta que, si bien es un buen procedimiento instrumental para medir,

cuantificar y desarrollar nuevos parámetros relacionados con la textura, la magnitud de estos parámetros es influenciada por las variables introducidas en las mediciones como la deformación aplicada; la velocidad con la que se hace el ensayo, el tamaño de la muestra, etc. (Torres Gonzalez et al., 2015). Por lo tanto, no se puede comparar los valores obtenidos con distintas condiciones de ensayo. Como resultado del TPA, se obtiene una curva de fuerza en función del tiempo (Figura 10), a partir de la cual pueden determinarse distintos parámetros relacionados con la textura de la muestra analizada, tales como:

1. *Fracturabilidad (N)*: fuerza del primer pico antes del máximo (puede que no esté presente). Está relacionada con la cohesión y con la fuerza necesaria para romper la estructura de la muestra. Depende del tipo de muestra y del porcentaje de deformación usado en el ensayo.

2. *Dureza (N)*: fuerza máxima en el primer ciclo de compresión. Relativa a la fuerza necesaria para deformar la muestra o hacer penetrar un objeto en él.

3. *Cohesividad*: es la relación del área positiva del segundo ciclo de compresión sobre el área positiva del primer ciclo. Representa el trabajo necesario para comprimir la muestra por segunda vez respecto al que ha sido necesario para comprimirla la primera vez. Relativa al grado de deformación.

4. *Adhesividad (J)*: área negativa luego del primer ciclo de compresión. Representa el trabajo necesario para separar el émbolo de compresión de la muestra.

5. *Elasticidad*: Se calcula como el cociente de la distancia recuperada por el gel durante la descompresión del primer ciclo sobre la distancia comprimida.

Relativa a la rapidez de recuperación de la deformación después de la aplicación de una fuerza y al grado de dicha recuperación.

6. *Gomosidad (N)*: La gomosidad (GU) se define como el producto de la dureza y la cohesividad.

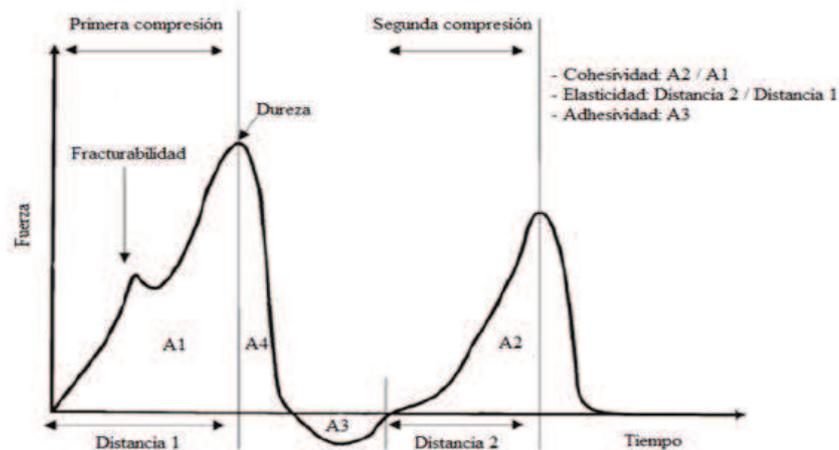


Figura 10. Curva ideal de un análisis de perfil de textura TPA (Adaptada de (Hleap & Velasco, 2010)).

La masticabilidad es la energía para masticar la comida hasta que esté lista para tragar, y se define como el producto de la gomosidad y la elasticidad (dureza \times cohesividad \times elasticidad). La gomosidad, por su parte, es una medida de la fuerza para desintegrar las partículas listas para tragar, por lo tanto, cuanto mayor sea la dureza, mayor será la gomosidad y se define como el producto de la dureza y la cohesividad. La gomosidad se refiere a alimentos semisólidos y la masticabilidad a alimentos sólidos, por lo tanto, en este caso solo se informa la gomosidad (Rahman et al., 2021).

Para el análisis del perfil de textura de los geles se utilizó un disco de teflón de 50 mm de diámetro previamente lubricado con aceite siliconado para minimizar

la fricción al realizar los ensayos. Las muestras de gel fueron cilindros de 2 cm de altura y 2 cm de diámetro. Los ensayos se realizaron a 25°C, comprimiendo los geles un 20% a una velocidad de 1 mm/s, con un tiempo de espera de 5 s entre el primer y el segundo ciclo de compresión. Los datos obtenidos fueron fuerza ($F(t)$) y altura ($H(t)$) en función del tiempo (Spotti et al., 2012). Los resultados analizados fueron fracturabilidad (N), dureza (N), elasticidad (adimensional), cohesividad (adimensional), adhesividad (N.m) y gomosidad (Hleap & Velasco, 2010).

3.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA UTILIZAR LOS ARABINOXILANOS COMO FUENTE DE ENERGÍA

Se estudió la capacidad de las bacterias INL1, utilizada en la presente tesis, y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), que es una cepa probiótica comercial muy usada por la industria alimentaria, de utilizar a los AX de salvado de maíz como fuente de energía. Previo a su utilización las cepas se reactivaron a partir de su stock congelado a -70°C (MRS + glicerol 17% v/v) y se realizaron dos repiques en caldo MRS.

Para evaluar el potencial prebiótico de los AX se preparó un medio MRS base (sin fuente de carbono) al que se adicionó glucosa 2% p/v (como control) o una solución estéril de AX, en la misma concentración. Los cultivos frescos (18 h) de las cepas se centrifugaron (6000 rpm, 10 min), se lavaron con buffer PBS y se resuspendieron en el mismo buffer. Los medios de cultivo (adicionados de L-cisteína para INL1) se inocularon (2% v/v) con estas suspensiones y se incubaron a 37°C durante 18 h en aerobiosis para LGG, y en anaerobiosis para INL1.

Para el recuento de células viables se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona 0,1% (p/v) y se las sembró en agar MRS (agar MRS-c para INL1). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en anaerobiosis (INL1) o en aerobiosis (LGG). Para comparar el rendimiento del crecimiento en los distintos medios, se calculó el crecimiento relativo en el medio suplementado con AX respecto al crecimiento en glucosa, utilizándose la siguiente fórmula:

$$\text{Crecimiento relativo (\%)} = \frac{(X_{AX} - X_b)}{(X_G - X_b)} \times 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde X_b , X_{AX} , y X_G son los crecimientos (expresados en log UFC/ml) en MRS base sin suplementar (X_b) o suplementado con AX (X_{AX}) o glucosa (X_G), respectivamente.

3.5. ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DEL GEL SOBRE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS

Se realizó el recuento de células viables semanalmente desde la formación de los geles ácidos con probióticos, almacenados a 4°C. Para ello, los geles debieron ser primeramente solubilizados para que pudieran liberarse las bacterias contenidas en el entramado del gel.

La puesta a punto de la disolución de los geles se llevó a cabo utilizando los geles preparados con GDL. En primer lugar, se eligió el pH del buffer que promoviera la óptima disolución. Para ello, se disolvieron geles con concentración de glucosa igual a 1% (que fueron los que más cohesivos, y por lo tanto más difíciles de

disolver) en buffers citrato-fosfato de distintos pHs (3, 4, 5, 6, 7) en relación 1:1 y se dejó en agitación magnética durante 1 hora.

Una vez elegido el pH del buffer de solubilización, se procedió a elegir un método de ruptura mecánico para acelerar la disolución de los geles. Y esta puesta a punto se realizó utilizando geles ácidos conteniendo los probióticos, ya que se pretendía evaluar también la supervivencia de las bacterias durante la solubilización de los geles. Primero se probó utilizando un homogeneizador de alimentos tipo Stomacher con distintas relaciones entre cantidad de gel y cantidad de buffer (1:1, 1:2 y 1:10). Debido a que no se produjo la ruptura de los geles mediante este proceso, se probó otro método de ruptura mecánica utilizando un Ultraturrax modelo T25 (Ika, Japón) a distintas velocidades (5000 y 8000 rpm) y tiempos (1 y 2 min).

Luego de realizar estas pruebas, se concluyó que el mejor método de ruptura es utilizar la proporción 1:10 de gel y buffer citrato fosfato pH 7 y luego aplicación de Ultraturrax por 2 min a 5000 rpm, ya que en estas condiciones se mantuvo intacta la supervivencia de las bacterias. Estas pruebas de supervivencia se realizaron determinando las UFC en alícuotas de gel disuelto, y realizando diluciones seriadas en agua de peptona 0,1% (p/v) que luego fueron sembradas en agar MRS-cisteína. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en anaerobiosis y luego se realizaron los recuentos correspondientes. Este mismo procedimiento se llevó a cabo al finalizar la fermentación, y luego de 1, 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 4°C.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las determinaciones se hicieron al menos por duplicado y los resultados se presentan como valor medio \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statgraphics Centurion XV. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA), y test LSD para ver las diferencias entre muestras utilizando un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS ARABINOXILANOS

4.1.1. CONTENIDO DE ALMIDÓN

La determinación de almidón es importante debido a que es un polisacárido que las bacterias pueden utilizar en la fermentación como fuente de carbono. Por lo que en este tipo de estudios es preferible un valor bajo, para que el almidón no interfiera en el uso de AX por parte de las bacterias. En la Figura 11 se muestran las curvas de calibrado para la determinación de almidón en la muestra de AX, las cuales fueron promediadas mediante el software Statgraphics, de donde se obtuvo la ecuación de la regresión lineal.

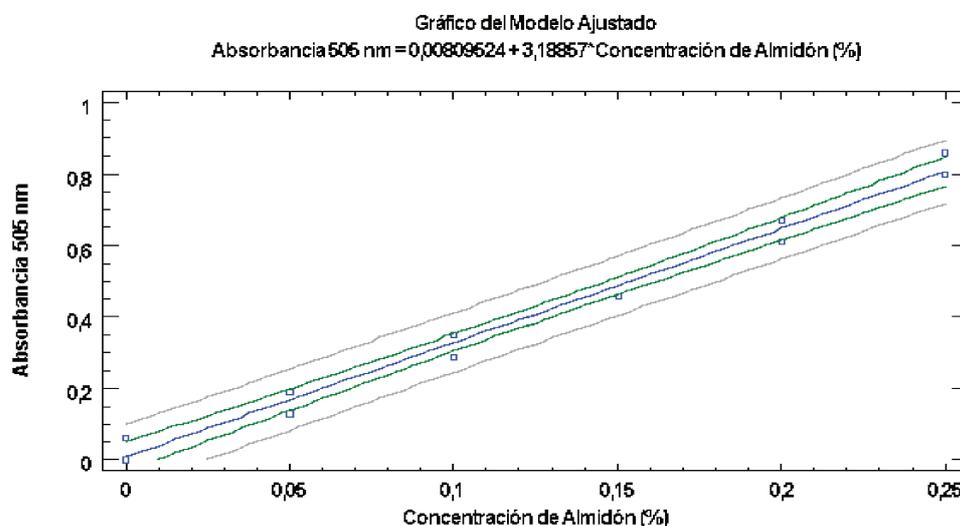


Figura 11. Curva de calibrado de contenido de almidón de maíz ($r^2=0,9994$).

De la curva se obtuvo que la concentración de almidón en la muestra de AX fue de $0,0157 \pm 0,0008$ %. De esta manera, se comprobó que el contenido de almidón en la muestra de AX fue prácticamente despreciable. La muestra tampoco contenía

cantidades significativas de proteínas ni lípidos (estudios realizados anteriormente, (Spotti et al., 2016)).

4.1.2. PESO MOLECULAR VISCOSIMÉTRICO

Los valores de viscosidad relativa, viscosidad específica y viscosidad reducida fueron determinados para las concentraciones mencionadas en el punto 3.2.2. A partir de estos valores de viscosidades se graficaron $\frac{\eta_{sp}}{c}$ y $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ vs concentración de AX para cada serie obteniéndose las gráficas que se muestran en la Figura 12.

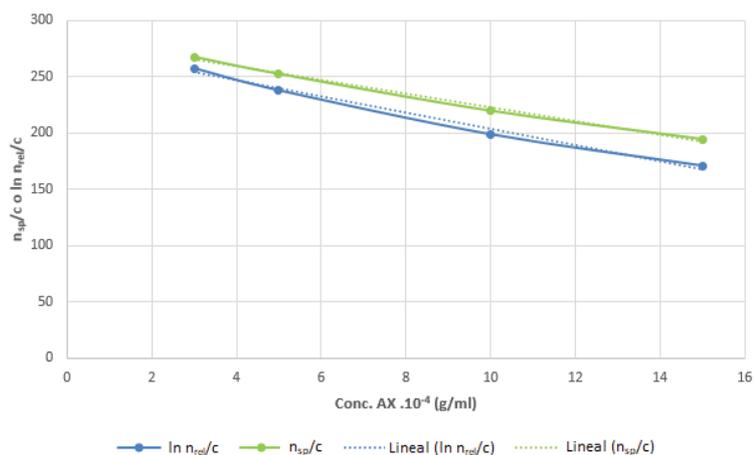


Figura 12. Curvas $\frac{\eta_{sp}}{c}$ y $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ vs. Concentración de AX.

En la figura anterior puede notarse que, en ambas curvas, tanto $\frac{\eta_{sp}}{c}$ como $\frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ vs concentración de AX, se obtuvieron rectas con pendientes negativas, a diferencia de lo que se hubiese esperado según la metodología descrita en la sección 3.2.2. Según Vardhanabhuti y Foegeding (1999) este comportamiento podría estar relacionado con las cargas negativas presentes en el polisacárido (debida a los grupos

carboxilo de los ácidos glucurónicos) que se comporta como un polielectrolito. En este sentido, la dilución de la muestra promovería una mayor expansión de las moléculas de AX, como resultado de las fuerzas repulsivas entre los grupos carboxilo y del mayor espacio que tendría el polisacárido para desplegarse. Así, aumentaría la viscosidad reducida con la disminución de la concentración AX.

La ordenada al origen corresponde al valor de viscosidad intrínseca (valor de las curvas cuando las concentraciones tienden a cero). El promedio de los valores obtenidos es $[\eta] = 288,2 \pm 4,0$ ml/g. Este valor es más alto al encontrado por Zhang y col. (2003) para AX extraídos de salvado de maíz con NaOH desoxigenado (174 ml/g), pero más bajo que el reportado por M. Zhang y col. (2011) para AX de salvado de cebada (416 ml/g).

Una vez calculada la Viscosidad Intrínseca, se determinó el Peso Molecular Viscosimétrico (M_v) del polímero utilizando la ecuación de Mark-Houwink y las constantes k y a obtenidas de bibliografía (Yadav et al., 2007). A partir de los estudios publicados por Yadav y col. (2007) en donde caracterizaron distintas fracciones de fibras extraídas de granos de maíz, pudieron obtenerse los parámetros de k y a teóricos para despejar de la ecuación de Mark-Houwink el peso molecular viscosimétrico (M_v) del AX utilizado en el presente trabajo. Estos parámetros son $a = 0,62$ y $k = 0,07$ mL/g. Usualmente, el exponente a de polímeros flexibles en buenos solventes está en el rango de 0,5-0,8, y para cadenas rígidas es mayor a 1 (P. Zhang et al., 2003). El valor reportado aquí sugiere que el AX existe como cadenas libres (en inglés: *wormlike chains*). Con estos valores y el de viscosidad intrínseca (288 ± 4 mL/g) determinado previamente en esta sección, se obtuvo un valor $M_v = 715.642$ Da.

El peso molecular promedio de la muestra de AX también fue determinado por cromatografía de exclusión molecular, encontrándose un valor de 620.493 ± 3000 Da. En la Figura 13 se puede observar que la muestra solo exhibió un pico (con un pequeño hombro), y que la distribución de pesos moleculares de la muestra es bastante amplia. Fishman y col. (2000) también caracterizaron hemicelulosas extraídas de maíz (principalmente AX), utilizando NaOH 2 meq/g de salvado, a través de cromatografía de exclusión molecular con detector de dispersión de luz multiángulo. En este estudio obtuvieron una curva cromatográfica similar a la presentada aquí, y observaron que la muestra era bimodal. Si bien del análisis de la Figura 13 no se puede asegurar que tenemos dos poblaciones bien definidas, se puede observar una distribución de pesos moleculares bastante amplia. Frecuentemente, hay una incertidumbre en la determinación del peso y la conformación molecular debido a que pueda darse agregación en las moléculas de polisacáridos (L. Zhang et al., 1997). Los arabinoxilanos de varias plantas muestran agregación en solución acuosa (Blake & Richards, 1971); (Roger et al., 1996). En algunos estudios se ha observado que cadenas laterales de arabinofuranos han participado en la formulación de agregados con cambios de conformación en las macromoléculas, como es el caso de Zhang y col. (2003) que trabajaron con AX de cascara de maíz extraídos con 5% de hidróxido de sodio desoxigenado. En este trabajo encontraron que el PM de estos AX fue de 506.000 Da, el cual es bastante similar al encontrado en nuestro trabajo (18% más bajo al encontrado en esta tesis).

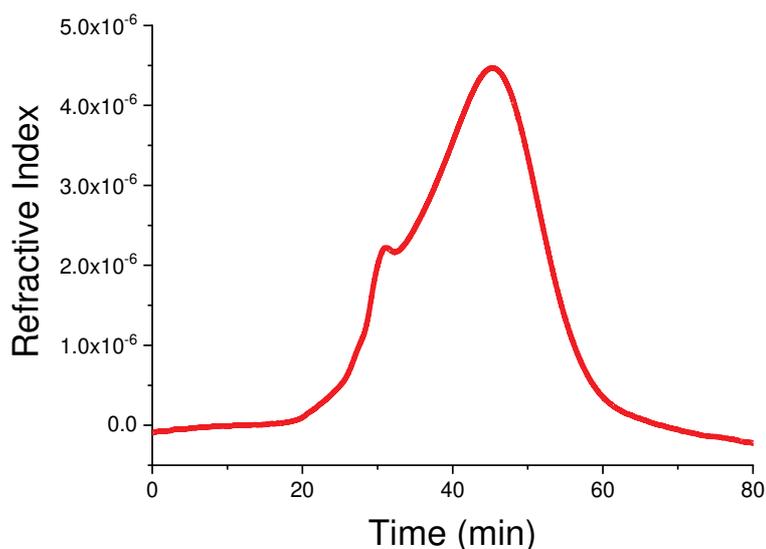


Figura 13. Índice de refracción vs Tiempo para la determinación del peso molecular del AX.

Fishman y col. (2000), encontraron que las discrepancias en la determinación del peso molecular promedio (M_w) de las hemicelulosas por cromatografía de exclusión molecular utilizando un detector de viscosidad intrínseca o un detector de dispersión de luz multi-ángulo (Multiángulo Laser Light Scattering, MALS), estuvieron en un rango entre 1,3% y 20%. En mediciones del peso molecular de fracciones de hemicelulosas extraídas con distintas combinaciones de solventes (NaOH, CaOH, H_2O_2) observaron que, en 4 de 6 mediciones, el mismo M_w fue mayor por viscosimetría que por dispersión de luz multiángulo.

En otros trabajos, como el de Saulniet y col. (1995), se encontraron valores de 270.000 y 370.000 Da para AX de maíz, de fracciones extraídas secuencialmente con 0,5 M NaOH y 1,5 M KOH, siendo las viscosidades intrínsecas de 159 y 181 ml/g, respectivamente.

4.1.3. POTENCIAL Z Y TAMAÑO DE PARTÍCULA DE AX

Se midió el potencial Z de soluciones al 1% de AX a pH= 7, obteniéndose un valor de $\zeta_{\text{pot}} = -14,1 \pm 0,5$ mV. Como se propuso anteriormente, se puede demostrar con el valor de Potencial Z obtenido que las partículas de AX poseen cargas negativas, permitiendo que las mismas puedan comportarse como polielectrolitos, como se mencionó en el punto anterior. Estas cargas negativas son consecuencia del contenido de ácidos glucurónicos, que poseen grupos carboxilo capaz de ionizarse a valores de pH superiores a su pKa.

Uno de los usos más populares de los datos de Potencial Zeta es relacionarlos con la estabilidad coloidal. Existen ciertas pautas o guías que clasifican la estabilidad de las dispersiones coloidales de acuerdo a los valores de potencial zeta. Estos rangos comprenden $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV, $\pm 20-30$ mV y $> \pm 30$ mV, y se relacionan con sistemas altamente inestables, relativamente estables, moderadamente estables y altamente estables, respectivamente (Bhattacharjee, 2016a). Teniendo en cuenta esta clasificación y el valor de potencial Z previamente obtenido, podría clasificarse a la dispersión de AX como "relativamente estable".

Por otro lado, el tamaño de partícula promedio obtenido por dispersión de luz dinámica fue de 1060 ± 50 nm. Basándonos en este tamaño de partícula encontrado, podríamos decir que las partículas de AX utilizadas en nuestras muestras son significativamente más grandes a las encontradas por (Zheng et al., 2011), quien también utilizó el método de Dispersión de Luz Dinámica para medir el tamaño moléculas de AX de salvado proveniente de cebada extraídos con NaOH 0,5 N, y obtuvo valores que representan la mitad del valor obtenido para nuestras muestras (456 nm). El peso molecular de estos AX de salvado de cebada fue de 369000 Da, que

es casi la mitad del PM de los AX de salvado de maíz utilizados en esta tesis, demostrando así que el tamaño de las macromoléculas de AX es proporcional al peso molecular de las mismas, y depende no solamente de la fuente de la cual se extraen los arabinosilanos, sino también de los métodos empleados para su extracción.

4.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELES ÁCIDOS DE WPI

4.2.1. PREPARACIÓN DE GELES ÁCIDOS CON BACTERIAS PROBIÓTICAS

La primera prueba se realizó utilizando una concentración de 1.10^7 UFC/ml de bacterias en una dispersión de 6% WPI y 2% de glucosa. Esta muestra gelificó y no presentó sinéresis, pero la gelificación fue muy lenta (aproximadamente 8 h), probablemente debido a que el número inicial de bacterias era bajo. Por lo tanto, se decidió mantener la concentración al WPI 6%, pero se duplicó la concentración de bacterias (2.10^7 UFC/ml) utilizando concentraciones de glucosa de 0,1 y 2%. Como se esperaba, el sistema con 0% de Glu no cambió su pH durante toda la incubación, ya que al no tener una fuente de carbono disponible para que las bacterias pudieran fermentar, el pH se mantuvo en 7 y por lo tanto el sistema se mantuvo líquido (no gelificó). Las soluciones que contenían 1 y 2% de glucosa, gelificaron, pero el tiempo de incubación para lograr el descenso seguía siendo largo (aprox. 7 h). También se observó que los geles formados con 6% de WPI presentaron una dureza excesiva, por lo que se decidió reducir el contenido de WPI a 3% para continuar con el diseño de los sistemas gelificados.

Una tercera prueba se realizó utilizando 3% de WPI, 1% de glucosa y se aumentó en dos órdenes logarítmicos la concentración de bacterias con respecto a la

primera prueba (1.10^9 UFC/ml), para evaluar si era posible formar los geles en un tiempo más corto. No obstante, en este caso se produjo una acidificación excesivamente rápida (los sistemas comenzaron a opacarse mientras eran mezclados, incluso antes de ponerlos a incubar a 42°C) y se obtuvo un gel con una estructura poco estable y mucha sinéresis.

Finalmente, se decidió probar una concentración intermedia de bacterias de 1.10^8 UFC/ml manteniendo 3% de WPI y 1% de glucosa. En este caso se obtuvieron resultados aceptables en cuanto a la dureza del gel, la velocidad de acidificación y sinéresis.

Del comportamiento observado en estas pruebas preliminares, se definieron las concentraciones de proteína (WPI 3%) y de bacterias (1.10^8 UFC/ml) para trabajar, variando la concentración de glucosa en 0,10; 0,25; 0,50 y 1,00%, definiendo como punto final de incubación un tiempo de 300 min o un pH final de 5,00 (lo que sucedía primero). Los geles que se obtuvieron para cada uno de estos sistemas se muestran en la Figura 14.

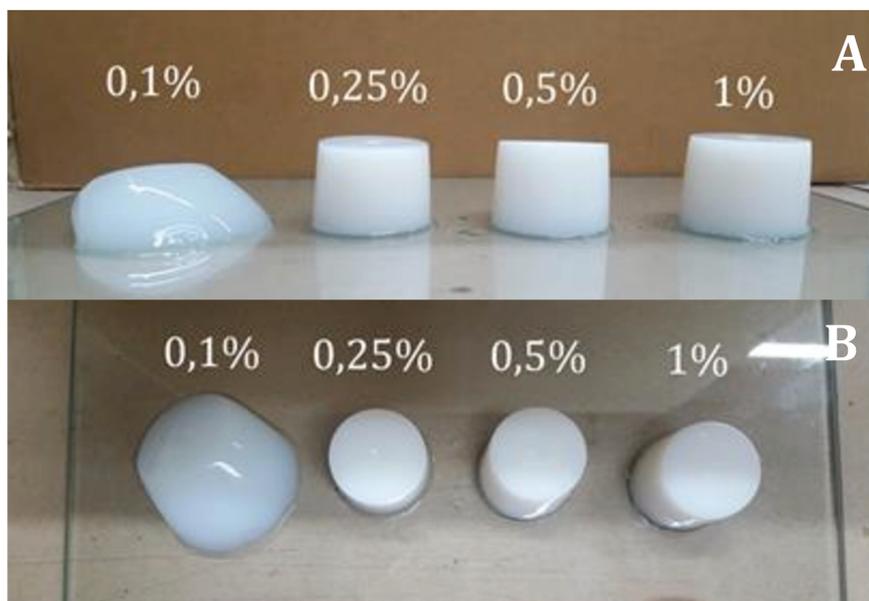


Figura 14. Geles obtenidos con WPI 3%, 1×10^8 UFC/g y varias concentraciones iniciales de glucosa, de izquierda a derecha: 0,10; 0,25; 0,50 y 1,00%. A) vista frontal; B) vista superior.

También se estudió el efecto de AX (al 2%) sobre la fermentación, en sistemas conteniendo 0% y 0,1% de glucosa, con la misma concentración de proteínas y bacterias utilizada en los sistemas anteriores (3% WPI, 1.10^8 UFC/g); sin embargo, estos sistemas no gelificaron. En el caso de la muestra de 2% AX y 0% glucosa, el pH no disminuyó durante la incubación, lo que estaría indicando que las bacterias no lograron cortar las macromoléculas de AX para utilizarlas como fuente de carbono. Por su parte, en los sistemas con 2% AX y 0,1% de glucosa, el pH disminuyó levemente durante el tiempo de incubación hasta alcanzar un valor de $6,26 \pm 0,06$. Sin embargo, este valor de pH alcanzado no fue suficiente para promover la gelificación del WPI ya que no llegaron a un valor cercano a su punto isoeléctrico. En este último caso, la leve acidificación podría deberse al consumo de la glucosa 0,1%, que fue transformada en ácido láctico. En este caso, la no gelificación podría deberse a un posible impedimento

estérico por parte del AX, lo que podría haber dificultado que las bacterias utilicen la glucosa como alimento para bajar el pH hasta los valores alcanzados en los correspondientes sistemas de Glu 0,1% sin AX (pH=5.58) que, si bien gelificaron, no produjeron un gel autosostenible.

La no gelificación de los sistemas conteniendo AX podría estar relacionada con el alto peso molecular y el gran tamaño que poseen las partículas de AX, tal y como se demostró en la sección 4.1.3. Hughes y col. (2007) investigaron la fermentación *in vitro* de tres fracciones de arabinoxilano (AX) de trigo por microflora fecal humana. Se utilizaron tres fracciones de AX, con masas moleculares promedio de 354, 278 y 66 kDa, y encontraron que el efecto prebiótico, es decir, la selectividad de AX por los grupos de bifidobacterias y lactobacilos, aumentó a medida que disminuyó la masa molecular de AX. Esto sugiere que la masa molecular influye en la fermentación de AX. De igual manera, Vardakou y col. (2008), encontraron que el pretratamiento de AX con endo- β -1,4-xilanasas proporcionó oligómeros que las bacterias intestinales utilizaron mejor que los AX sin tratamiento enzimático, aunque en ese estudio no se determinaron los pesos moleculares de las distintas fracciones.

4.2.2. CURVAS DE ACIDIFICACIÓN

A todos los sistemas que gelificaron se les hizo un seguimiento del pH en función del tiempo de fermentación. Las curvas se pueden observar en la Figura 15.

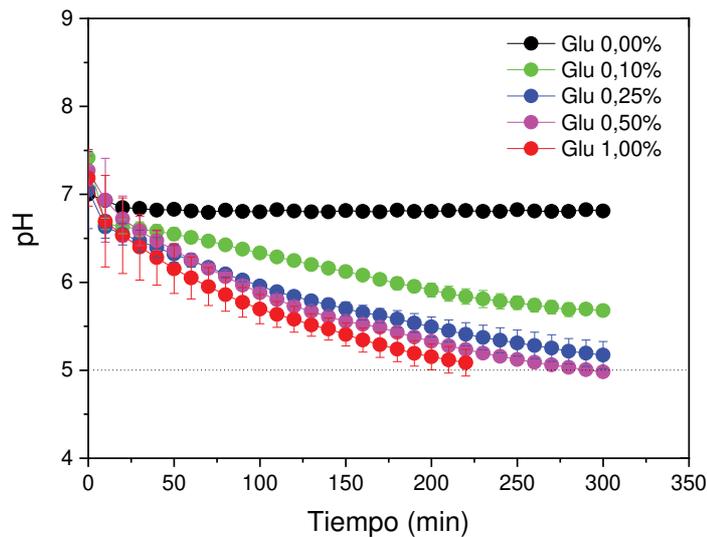


Figura 15. Curvas de acidificación para los sistemas con 3% WPI, 1×10^8 UFC/ml, sin AX y concentración de Glu variable.

En la Figura 15 se puede observar que, en todos los sistemas, excepto en el control (glucosa 0%), el pH fue disminuyendo gradualmente durante la fermentación desde un valor inicial aproximado de 7. En la muestra control, el pH no varió en función del tiempo y se comprobó que no hubo fermentación, ya que las bacterias no disponían de una fuente de carbono para metabolizarla.

Con respecto a los demás sistemas, se puede observar que a medida que aumentó el contenido de glucosa, se alcanzaron menores valores de pH al final de la fermentación. Por un lado, en el sistema con 0,1% de glucosa, la fermentación fue más lenta y alcanzó un valor de pH final alrededor de 5,58. Si bien este valor aún es lejano al pI de las proteínas del WPI, se alcanzó a formar un gel no autosostenible. Estos resultados son consistentes con lo observado en la Figura 14. Por otro lado, la velocidad de fermentación en los sistemas restantes se fue incrementando al incrementarse el contenido de glucosa y todos alcanzaron un valor de pH final

próximo a 5, que es cercano al pI del WPI. El sistema Glu 1% fue el que alcanzó más rápidamente este valor de pH a los 220 min.

Una vez finalizado el proceso de fermentación, los geles se almacenaron a 4°C por 4 semanas. Se determinó el pH al día siguiente y a las 4 semanas para evaluar si las bacterias continuaban fermentando la glucosa residual durante el almacenamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de pH de los geles al inicio (t_0 , 24 hs después de la fermentación) y al final del almacenamiento a 4°C (t_4 , 4 semanas).

Sistema	pH	
	t_0	t_4
Glu 0,00%	7,19 ± 0,03 ^g	7,23 ± 0,08 ^g
Glu 0,10%	5,58 ± 0,07 ^e	5,23 ± 0,01 ^d
Glu 0,25%	4,99 ± 0,11 ^c	4,65 ± 0,09 ^{ab}
Glu 0,50%	4,70 ± 0,24 ^{ab}	4,60 ± 0,13 ^a
Glu 1,00%	4,82 ± 0,05 ^{bc}	4,82 ± 0,06 ^{bc}
Glu 0,00% AX 2%	7,18 ± 0,04 ^g	7,23 ± 0,08 ^g
Glu 0,10% AX 2%	6,33 ± 0,16 ^f	6,26 ± 0,06 ^f

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. Letras distintas significa diferencias significativas al aplicar el test LSD ($p \leq 0,05$).

Como puede observarse, el pH no varió significativamente durante el almacenamiento de los geles, a excepción de los sistemas con Glu 0,1% y Glu 0,25%, donde se observó un leve descenso del pH. Esto podría estar indicando que las bacterias continuaron consumiendo la glucosa restante y acidificaron un poco más el sistema. Probablemente, al ser más laxa la estructura de estos geles no autosostenibles, las bifidobacterias podrían haber tenido mayor movilidad para continuar metabolizando la glucosa remanente.

Los valores de pH de los sistemas que no gelificaron (Glu 0%, Glu 0% AX 2%, Glu 0,1% AX 2%) no variaron durante el tiempo de almacenamiento. En estos

sistemas sin glucosa, el pH se mantuvo alrededor de 7, ya que las bacterias no disponían de un sustrato fermentable en el medio de reacción. Por su parte, el sistema Glu 0,1% AX 2% alcanzó un pH de $6,33 \pm 0,16$ al final de la fermentación que fue significativamente diferente al alcanzado por el sistema que contenía sólo Glu 0.1% ($5,58 \pm 0,16$). Tal y como se discutió anteriormente, esto podría confirmar la existencia de un posible impedimento estérico ejercido por las macromoléculas de AX en el medio de reacción, dificultando la utilización de glucosa como fuente de energía por parte de las bifidobacterias. Otra de las suposiciones podría ser que la presencia de AX estuviera ejerciendo algún efecto buffer durante la fermentación de la glucosa en estos sistemas que ralentizara la disminución del pH.

El fenómeno de estabilización del pH de las muestras al final del almacenamiento se debe probablemente a la inhibición de la actividad enzimática de los cultivos debido a las bajas temperaturas durante el enfriamiento posterior a la fermentación, y también debido a que el pH bajo inhibe el crecimiento y los procesos enzimáticos de las bacterias. Según Cardona-Arengas & López-Marín (2019), el pH óptimo para el crecimiento de las bifidobacterias está entre 6,0 y 7,0, y prácticamente ninguna puede crecer por debajo de pH 4,5 o por encima de 8,5.

4.2.3. *GLUCOSA CONSUMIDA*

Se determinó la cantidad de glucosa que consumieron las bacterias durante la incubación de los sistemas, para lograr acidificar el medio y poder formar el gel. Para ello se utilizó el agua de sinéresis expulsada durante la formación de los geles. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Glucosa consumida de los sistemas en estudio.

Sistema	Glucosa Consumida (% p/p)	
	Inicial	4 semanas
Glu 0,10%	0,092 ± 0,001 ^a	0,103 ± 0,001 ^b
Glu 0,25%	0,147 ± 0,030 ^c	0,129 ± 0,021 ^{b,c,d}
Glu 0,50%	0,220 ± 0,011 ^d	0,183 ± 0,018 ^d
Glu 1,00%	0,281 ± 0,020 ^e	0,258 ± 0,041 ^{d,e}
Glu 0,10% AX 2%	0,103 ± 0,001 ^b	0,104 ± 0,001 ^b

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. Letras distintas significa diferencias significativas al aplicar el test LSD ($p \leq 0,05$).

En primer lugar, se observa que el consumo de glucosa se incrementó con el aumento de la concentración inicial de glucosa. El mayor consumo de glucosa se observó en los sistemas Glu 1%, donde las bifidobacterias utilizaron una concentración aproximada de 0,28% de glucosa.

Por otro lado, se observó que en general no hubo un aumento en el consumo de glucosa durante el almacenamiento a 4°C, ya que no se observaron diferencias significativas entre los valores de glucosa consumida al tiempo inicial y a las 4 semanas, a excepción del sistema que contenía 0,1% Glu donde se vio un leve incremento de la glucosa consumida al mes de almacenamiento. Estos resultados son consistentes con los observados anteriormente en los valores de pH al inicio y al final del almacenamiento, donde observamos que la actividad metabólica de los microorganismos se vio considerablemente reducida debido a las bajas temperaturas durante el enfriamiento posterior a la fermentación, por la inhibición de la actividad enzimática de los cultivos.

Los sistemas con un contenido inicial de Glu 0,1% (con y sin arabinoxilanos), las bacterias consumieron la totalidad del azúcar. Sin embargo, en el sistema Glu 0,1% que no contenían AX formaron geles no autosostenibles al final de la fermentación,

mientras que los que contenían 2% de AX no gelificaron. La presencia de los arabinosilanos en el medio de reacción dificultó el descenso de pH en estos sistemas, aun habiéndose consumido la totalidad de la glucosa inicial. Tal y como se mencionó anteriormente, los arabinosilanos podrían estar ejerciendo algún efecto buffer en el medio de reacción durante la fermentación de estos sistemas.

4.2.4. SINÉRESIS

La sinéresis o separación del suero es un defecto tecnológico importante en productos como yogurt o queso crema, que se observa como líquido en la superficie, y que conlleva a características sensoriales indeseables, que no son atractivas para el consumidor (El Bouchikhi et al., 2019). Además de la menor aceptabilidad por parte del consumidor por sus características indeseables de textura y sabor, los productos con sinéresis pueden tener un menor valor nutricional, principalmente debido a la pérdida de nutrientes solubles en agua.

La sinéresis se considera la expulsión espontánea del suero (es decir cuando el producto se encuentra en reposo) de la red continua del gel. La sinéresis es causada por el contraste de dos grupos principales de factores: i) factores físicos y químicos que influyen en la retención de agua dentro del gel, como lo son densidad, formación y estabilidad de la red, e inactivación química del agua, y ii) factores que facilitan la eliminación de agua de las redes de gel, incluidas las tensiones dentro de la red (reorganización de la red, enfriamiento rápido y acidificación) y tensiones extra de la red (agitación y corte del gel) (Nguyen et al., 2015; Sohrabvandi et al., 2013).

La sinéresis se determinó a las 24 hs de finalizada la fermentación, y a las 4 semanas de almacenamiento a 4°C. Estos resultados se muestran en la Tabla 3. Es importante aclarar que al sistema formulado con glucosa 0,1%, no presentó una estructura de gel autosostenible, por lo que la sinéresis no pudo ser determinada.

Tabla 3. Sinéresis inicial y sinéresis a las 4 semanas de los geles obtenidos.

Sistema	Sinéresis (%)	
	Inicial	4 semanas
Glu 0,10%	ND	
Glu 0,25%	2,01 ± 0,69 ^{b,c}	2,17 ± 0,85 ^{b,c}
Glu 0,50%	1,10 ± 0,49 ^{a,b}	3,20 ± 0,53 ^c
Glu 1,00%	0,83 ± 0,02 ^a	1,72 ± 0,18 ^b

ND= no se pudo determinar. Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. Letras distintas significa diferencias significativas al aplicar el test LSD ($p \leq 0,05$).

Los valores iniciales de sinéresis fueron menores a mayor contenido de glucosa, lo que indicaría que un mayor contenido de glucosa inicial favorecería una estructura con una mejor retención de agua en el gel. Por otro lado, durante el tiempo de almacenamiento, los valores de sinéresis aumentaron para todos los sistemas, siendo significativo en los sistemas Glu 0,5% y Glu 1%. Los resultados obtenidos concuerdan con los publicados por Machado y col. (2017), que observaron que al final del período de almacenamiento evaluado de 28 días a 4°C, todas las formulaciones de yogur presentaron mayor sinéresis en comparación con el primer día de almacenamiento. El aumento de sinéresis con el tiempo es debido a una reorganización de la red del gel, por la creación de enlaces covalentes y no covalentes entre los agregados proteicos. Alting y col. (2000) estudiaron formación de enlaces durante la gelificación inducida por ácido (con GDL) de agregados de WPI, y encontraron que la formación inicial de la red se da por interacciones no covalentes, seguida posteriormente por el refuerzo mediante la formación de puentes disulfuro;

a mayor concentración de proteínas, mayor cantidad de puentes disulfuro entre los agregados.

Por otro lado, es notable resaltar que en los sistemas que inicialmente contenían 0,25% Glu, los valores de sinéresis no incrementaron significativamente durante el almacenamiento. Este comportamiento podría estar relacionado con las velocidades de acidificación de los distintos sistemas. Según Lucey & Singh, (1997), la rápida acidificación puede ser una de las principales causas de la separación del suero en geles ácidos como el yogur. En este caso, el proceso de acidificación en los sistemas Glu 0,25% durante la fermentación fue más lento que en los sistemas Glu 0,5% y Glu 1%, tal y como se observó anteriormente en la Figura 15.

4.2.5. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

La CRA es una característica clave del gel implicada en la calidad sensorial de los alimentos; los geles con alta CRA son necesarios para mantener la textura de distintas matrices alimentarias (Chen et al., 2019). Los resultados de los ensayos de capacidad de retención de agua de los geles sometidos a una fuerza centrífuga se muestran en la Tabla 4. Al no tener una estructura de gel, el sistema Glu 0,1% no pudo ser evaluado.

Tabla 4. Capacidad de retención de agua de los geles firmes obtenidos.

	CRA (%)
Sistema	
Glu 0,10%	ND
Glu 0,25%	81 ± 3 ^a
Glu 0,50%	85 ± 2 ^{ab}
Glu 1,00%	85 ± 3 ^b

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. Letras distintas significa diferencias significativas al aplicar el test LSD ($p \leq 0,05$).

De la Tabla 4 se puede observar que a medida que aumentó la concentración de glucosa, se incrementó gradualmente la capacidad de retención de agua de los geles. Estos resultados son consistentes con los que se observaron anteriormente en sinéresis. Geles con estructura más compacta y con menor porosidad presentan una mayor capacidad de retención de agua (Silva & O'Mahony, 2018). La retención de agua de los geles está relacionada con su estructura, el tamaño de poro de la red de gel y las características de los polímeros. El agua se mantiene firmemente dentro de las redes de gel con pequeños poros por fuerzas capilares (Vardhanabhuti et al., 2001). Por otro lado, la presencia de grupos de ácido carboxílico sin reaccionar en la estructura de las proteínas entrecruzadas también podría aumentar la CRA en geles ácidos de WPI (Hazrati et al., 2021). Farjami y col. (2015) también encontraron que el entrecruzamiento con ácido cítrico de las proteínas del suero aumentó el CRA de los hidrogeles de proteína y atribuyeron el resultado a la inclusión de los grupos de ácido carboxílico que no reaccionaron en la estructura de los microgeles. En este sentido, los geles con 0,5 y 1,0% de glucosa serían los que probablemente más contenido de ácidos orgánicos contengan en su estructura, ya que el consumo de glucosa fue mayor en estos sistemas (Tabla 2).

4.2.6. ANÁLISIS DE PROPIEDADES MECÁNICAS Y TEXTURALES DE GELES ÁCIDOS

A los sistemas que formaron geles autosostenibles se les estudiaron las propiedades mecánicas mediante el estudio de compresión uniaxial y el análisis de perfil de textura por compresión.

4.2.6.1. Compresión Uniaxial

Ejemplos de las curvas de compresión uniaxial llevadas a cabo en el INSTRON, se muestran en la Figura 16.

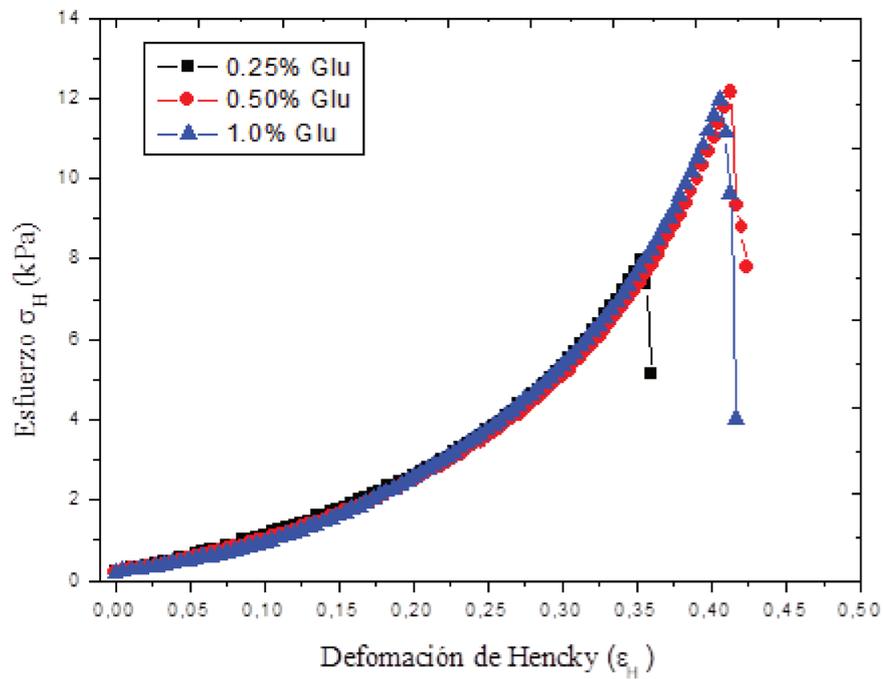


Figura 16. Compresión uniaxial de geles ácidos de WPI producidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, con concentraciones iniciales de glucosa de 0,25 %, 0,5% y 1%.

Como se puede observar en la Figura 16, el esfuerzo (σ_H) aumenta con la deformación de Hencky (ϵ_H) hasta que se produce fractura, momento en el cual el esfuerzo disminuye abruptamente. El aumento en la concentración de glucosa incrementa el esfuerzo del gel en el punto de fractura. Este parámetro, que es el esfuerzo máximo a la fractura (σ_M), se encuentra en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros mecánicos de los geles.

Sistema	σ_M (kPa)	ϵ_M	W_F (kPa)	E	Def. Rupt. (%)
Glu 0,25%	8,1 ± 0,5 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	1,26 ± 0,03 ^a	8,4 ± 0,5 ^b	43 ± 1 ^a
Glu 0,50%	10,7 ± 1,3 ^b	0,42 ± 0,01 ^b	1,60 ± 0,15 ^b	6,9 ± 0,3 ^a	52 ± 2 ^b
Glu 1,00%	11,7 ± 1,3 ^b	0,43 ± 0,01 ^b	1,74 ± 0,02 ^b	6,4 ± 0,2 ^a	53 ± 1 ^b

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. Letras distintas significa diferencias significativas al aplicar el test LSD ($p \leq 0,05$).

Todos los parámetros, a excepción del Módulo de Young (E), aumentan a medida que aumenta la concentración de Glu de 0,25% a 0,5%, pero un aumento adicional a 1% de glucosa no tiene efectos significativos sobre estos parámetros. El aumento del esfuerzo máximo a la fractura (σ_M) y el trabajo a la fractura (W_F), con la concentración de glucosa podría estar relacionado a una estructura de red más compacta debido a la mayor producción de ácido láctico y al mayor descenso del pH. Además, la adición de monosacárido podría causar un acercamiento de las moléculas de proteína entre sí, probablemente actuando como material de relleno (Tavares & Lopes Da Silva, 2003).

Un aumento en la concentración de glucosa también produjo un aumento en la deformabilidad, como lo indican los parámetros de deformación de Hencky (ϵ_M) y deformación máxima a la ruptura. De acuerdo con Alting y col. (2003), los geles formados cerca del pI de las proteínas, o mantenidos a este pH por tiempos largos tienden a ser más fuertes y deformables ya que en estas condiciones las interacciones electrostáticas que son repulsivas se minimizan, intensificando el contacto entre agregados de proteínas, lo que puede promover el contacto de grupos sulfhidrilos libres en la superficie de los mismos, y así aumentar la formación de puentes disulfuro en los geles (Alting et al., 2000, 2002, 2003). En este sentido, los geles obtenidos a partir de Glu 0,5 y 1% fueron los que mostraron mayores velocidades de acidificación

(Figura 15) y alcanzaron valores de pH más cercanos al pI de las proteínas del lactosuero en menores tiempos, en relación a los sistemas con Glu 0,25%. Esto podría haber favorecido las interacciones entre los agregados proteicos, mejorando las propiedades mecánicas de los geles. (Cavallieri & da Cunha, 2008) también observaron un aumento en el esfuerzo máximo con la disminución de pH de 5,2 a 4,9 en geles de WPI con agregado de GDL.

Con respecto al módulo de Young, que es una medida de firmeza (Mao et al., 2000), el aumento en la concentración de glucosa produjo una disminución de este parámetro. Esto podría estar relacionado a que en los geles con Glu 0,25% la velocidad de acidificación fue menor. De acuerdo a Cavallieri & da Cunha (2008), quienes estudiaron la gelificación de agregados de WPI después de la adición de diferentes cantidades de GDL, la tasa de acidificación influyó en la rigidez de los geles a un pH dado, siendo que una acidificación más lenta permitió que los geles tuvieran más tiempo para desarrollarse y que fueran más rígidos.

4.2.6.2. Análisis de perfil de textura por compresión (TPA)

Ejemplos de las curvas obtenidas en el ensayo de análisis del perfil de textura, se observan en la Figura 17.

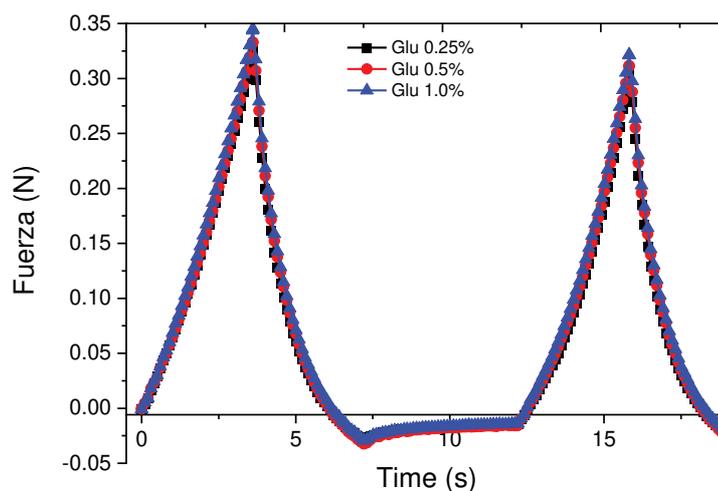


Figura 17. Curvas del Análisis de Perfil de Textura (TPA) de los geles ácidos de WPI producidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, con concentraciones iniciales de glucosa de obtenidos con distintas concentraciones de glucosa (0.25, 0.5 y 1%).

El análisis de las curvas de TPA nos permitió obtener los cinco parámetros texturales para cada muestra de gel (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros texturales obtenidos a partir de las curvas de TPA de los geles.

Sistema	Dureza (N)	Cohesividad	Adhesividad (J)	Elasticidad	Gomosidad (N)
Glu 0,25%	0,33 ± 0,04 ^a	0,807 ± 0,011 ^a	0,112 ± 0,026 ^a	0,905 ± 0,008 ^a	0,27 ± 0,04 ^a
Glu 0,50%	0,34 ± 0,05 ^a	0,828 ± 0,008 ^b	0,123 ± 0,011 ^a	0,919 ± 0,014 ^{ab}	0,28 ± 0,05 ^a
Glu 1,00%	0,35 ± 0,02 ^a	0,840 ± 0,006 ^b	0,113 ± 0,008 ^a	0,928 ± 0,007 ^b	0,29 ± 0,02 ^a

Los valores se presentan como promedio ± desviación estándar. Letras distintas significa diferencias significativas al aplicar el test LSD ($p \leq 0,05$).

Según la Figura 17, con respecto a la Fracturabilidad, ninguna de las muestras analizadas mostró un pico de ruptura, lo que indica que soportan 20% de deformación.

Analizando los datos de la Tabla 6, se puede observar que, con respecto a los parámetros de Dureza, Adhesividad y Gomosidad, no se observaron diferencias significativas entre las distintas muestras al aumentar la concentración de Glu. En cuanto al parámetro de Adhesividad, es importante resaltar que todos los sistemas presentaron valores negativos, lo cual indica que los geles son adhesivos. Con respecto a la cohesividad, los geles presentaron bajos valores, todos ellos menores a 1, lo que indica que el área de la segunda compresión es menor al área de la primera compresión, esto significa una destrucción de la muestra luego de la primera compresión. Este parámetro se puede relacionar con la fragilidad de los geles, y la incapacidad de recuperar su estructura una vez sufrida la primera compresión. La cohesividad está relacionada a la fuerza de los enlaces internos que forman la muestra. Es uno de los atributos complejos ya que no corresponde a una sola sensación, como dureza. Las muestras que son muy cohesivas (valores altos) se perciben como duras y difíciles de romper en la boca (Rahman et al., 2021). A medida que aumentamos la concentración de glucosa, se puede observar que los geles presentan un leve aumento en los valores de cohesividad.

Los valores de Elasticidad aumentan a medida que aumenta la concentración de glucosa en las muestras. La elasticidad es una medida de la recuperación después de la primera compresión, e indica cuánto se rompió la estructura original de la muestra por la compresión inicial (Rahman et al., 2021). Para las tres concentraciones de glucosa, las muestras mostraron un alto grado de elasticidad, ya que este parámetro en todos los casos dio valores muy cercanos a 1.

Un parámetro que ayuda a entender la estabilidad del gel es la relación entre la elasticidad y cohesividad. Siempre va a ser menor la cohesividad, sin embargo,

cuanto menor sea la diferencia entre ambas más probabilidades hay de que el gel después de un tratamiento mecánico pueda regresar a su forma original sin sufrir algún daño que se vea reflejado en forma física (del Rosario et al., 2016).

4.3. ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR SOBRE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS

Para poder realizar los recuentos de bacterias probióticas existentes en los geles ya formados, se debió lograr antes la solubilización de estos geles para que liberaran las bacterias que contenían y fuera factible su contabilización. Para ello se procedió a poner a punto una técnica de ruptura que asegure la correcta solubilización sin perjudicar la viabilidad de las bacterias.

En primer lugar, se estudió el efecto del pH en la solubilización de geles de Glu 1% obtenidos por acidificación con GDL. El resultado se muestra en la Figura 18, donde se observó que el buffer que mejor disolvió el gel fue el de pH 7. Sin embargo, todavía había partículas sin disolver que se podían observar a simple vista. Por lo tanto, se decidió agregar otro método mecánico de ruptura complementario. Primeramente, se utilizó un homogeneizador de alimentos tipo Stomacher. Se probaron distintas relaciones gel: buffer (1:1, 1:2 y 1:10) sin llegar a una completa disolución de los geles.

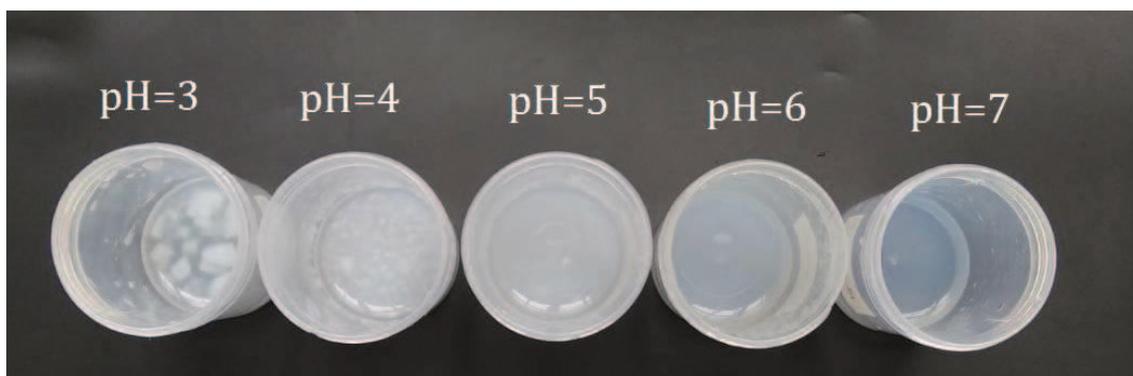


Figura 18. Resultado de la disolución de los geles en buffer citrato-fosfato a distintos pH mediante agitación magnética.

Otro método mecánico de ruptura que se evaluó fue mezclando el gel con buffer fosfato pH 7 en relación 1:10 y se procesó en el Ultraturax, durante 2 min a 5000 y 8000 rpm. En este caso, se obtuvieron geles completamente solubles en todas las combinaciones tiempo-velocidad. Por lo tanto, se decidió adoptar como método de disolución de los geles el tratamiento de ruptura con Ultraturax durante 2 minutos a una velocidad de 5000 rpm en un buffer fosfato pH 7 en una relación de 1:10.

Luego de la puesta a punto del método de ruptura de los geles, se procedió a realizar los recuentos bacterianos semanales de todos los sistemas durante el almacenamiento a 4°C. Los resultados se pueden observar en la Figura 19.

Todos los sistemas se prepararon con una concentración inicial de bacterias de 10^8 UFC/ml, previa a la fermentación.

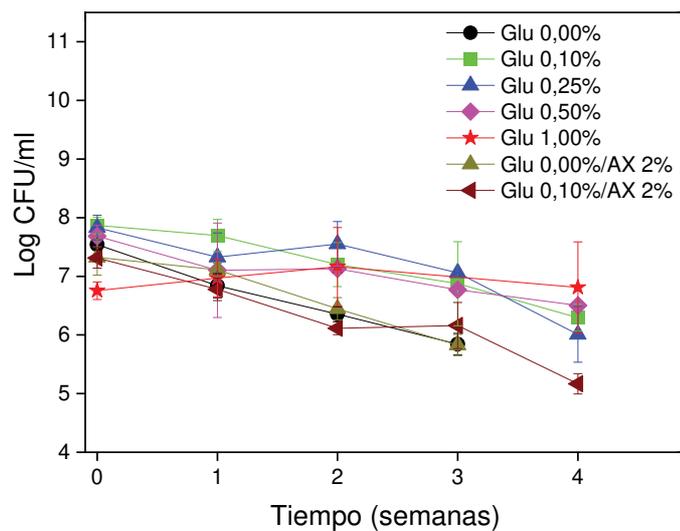


Figura 19. Recuentos bacterianos en log UFC/ml luego de la fermentación y a lo largo de 4 semanas de almacenamiento a 4°C.

Como puede observarse en la figura anterior, la concentración de bacterias disminuye en todos los casos a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, excepto en la muestra que contiene Glu 1%. La disminución de organismos viables podría atribuirse a las condiciones de almacenamiento, ya que una temperatura de 4°C no es apta para el desarrollo de estos microorganismos, por lo que su número baja en función del tiempo (Caro Henao, 2002). Sin embargo, podemos observar que en los sistemas que han gelificado, la protección de las bacterias es mejor que en los sistemas que no formaron geles (Glu 0,00%, Glu 0,00%/AX 2% y Glu 0,10%/AX 2%).

Según el CAA (*Código Alimentario Argentino*, 2006) las leches fermentadas y los yogures que mencionen el uso de bifidobacterias el recuento mínimo será de 10^6 UFC de bifidobacterias/g durante su período de validez. Por esto, en aquellos sistemas que no formaron geles y cuyos recuentos a las 3 semanas ya estaban llegando a las 10^6 UFC, no se siguieron haciendo los recuentos a la semana 4 (sistemas Glu 0,00% y Glu

0,00%/2% AX). Los geles (Glu 0,1; 0,25; 0,5; 1%) parecen ser una buena matriz protectora para las bacterias, ya que mostraron recuentos superiores a 10^6 UFC después de 4 semanas de almacenamiento. Para utilizar la denominación de “alimento con probióticos”, el alimento debe contar con una carga de células viables comprendida entre 10^6 y 10^9 UFC/g durante su período de duración mínima, por lo que todos los sistemas gelificados podrían clasificarse de acuerdo con esta denominación.

Por otro lado, la presencia de AX no promovió una mayor protección a las bifidobacterias, tal vez porque estos sistemas no gelificaron, lo que pudo haber contribuido al mayor descenso en los recuentos bacterianos una vez transcurrido el mes de almacenamiento.

4.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA UTILIZAR LOS ARABINOXILANOS COMO FUENTE DE ENERGÍA

En la Figura 20 se encuentra la gráfica con el crecimiento de dos cepas de probióticos, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1, que fue la cepa utilizada para realizar los geles, y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), que es una cepa probiótica muy utilizada en la industria alimentaria, con respecto a AX y glucosa como fuente de carbono.

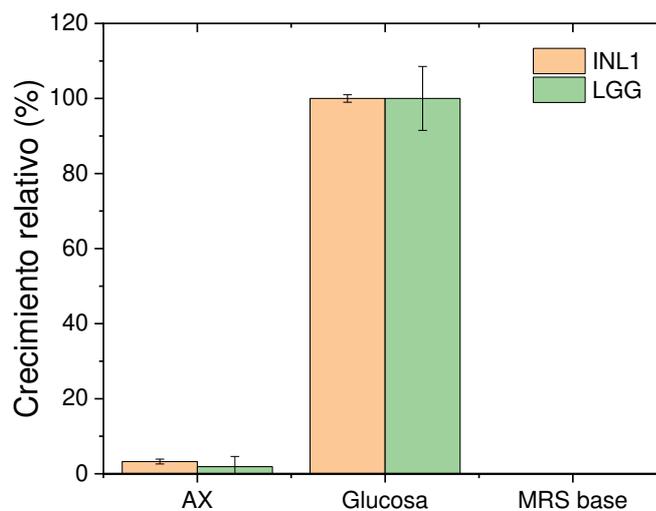


Figura 20. Crecimiento de *Bifidobacterium animalis* sp. *lactis* (INL1) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) en Agar MRS al utilizar los arabinoxilanos (AX) como fuente de carbono con respecto a glucosa. Control negativo: MRS base sin fuente de carbono.

Como podemos observar, los AXs no pudieron ser utilizados como fuente de carbono por INL1 y LGG. Las características de fermentación de los AX de cereales dependen en gran medida de sus propiedades estructurales (Knudsen & Lærke, 2010). Algunos estudios han demostrado que los AX de trigo que son fermentados lentamente, contienen estructuras ramificadas complejas, confirmando que los patrones de ramificación están correlacionados con la tasa de fermentación (Rumpagaporn et al., 2015). Damen y col. (2011) mostraron que la fermentación de AX con un alto grado de polimerización y de sustitución de arabinosa fue solo parcialmente completa en el colon. Sin embargo, los xilooligosacáridos, oligosacáridos derivados de AX, fueron casi completamente fermentados en el ciego (primera porción del intestino grueso). Hughes y col. (2007) estudiaron tres fracciones de AX de trigo, con PM de 354, 278 y 66 kDa, que fueron fermentadas *in vitro* de manera diferente por la microflora fecal humana, y encontraron que la

selectividad de AX para bifidobacterias y grupos de lactobacilos, aumentó a medida que disminuyó la masa molecular de AX corroborando que el PM influye en la fermentación en el colon. Igualmente, Vardakou y col. (2008) observaron un aumento en los índices prebióticos de los AX tratados con xilanasas, en los que había disminuido el PM en comparación con los AX no tratados. Sin embargo, Abbeele y col. (2013) han encontrado, mediante el estudio de diferentes modelos *in vitro*, que un AX de cadena larga proveniente de trigo estimuló el crecimiento de *Bifidobacterium longum* en comparación con inulina, un compuesto prebiótico bien establecido de bajo PM. Estos autores demostraron también que el AX de cadena larga de trigo aumentó específicamente el propionato, que es un metabolito promotor de la salud. Debido a que el PM de los AX utilizados en esta tesis son superiores a 260 kDa es posible que el alto PM de estos AX sea la causa de que las bacterias probióticas no lo hayan podido utilizar como fuente de carbono.

Cabe destacar que, si bien los AXs de maíz utilizados en este estudio no pudieron ser utilizados por estos dos microorganismos, no excluye que puedan ser utilizados por la microbiota intestinal. Para llevar a cabo estos estudios habría que realizar fermentaciones *in vitro* con heces (para así tener un amplio espectro de microorganismos involucrados). De todas formas, el consumo de estos AX aportaría al consumidor todos los beneficios de las fibras solubles.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Se lograron obtener geles ácidos de proteínas de suero con buenas propiedades texturales a partir de soluciones al 3% de proteínas, utilizando una bifidobacteria probiótica como cultivo iniciador en una concentración de 1×10^8 UFC/ml de bacterias, utilizando como fuente de carbono glucosa al 0,10; 0,25; 0,50 y 1,00%. Concentraciones más altas de proteínas generaron geles muy duros, debido a los entrecruzamientos entre agregados proteicos. Con respecto a la concentración de bacterias, una concentración menor alargó mucho los tiempos de gelificación, mientras que una concentración mayor aceleró la acidificación a tal punto que se produjeron geles particulados sin cohesión en su estructura. De esta forma, se puede concluir que tanto la concentración de la matriz, así como la concentración del cultivo iniciador son cruciales en la formación de la estructura del gel y sus propiedades texturales. Con respecto a la concentración de glucosa, también afectó las propiedades estructurales de los geles dentro del rango estudiado. A medida que aumentó el contenido de glucosa en los sistemas, se alcanzaron mayores velocidades de acidificación durante la fermentación de los sistemas, y la glucosa fue convertida más rápidamente en ácidos orgánicos. Sin embargo, la sinéresis a lo largo del tiempo, fue significativa para aquellos geles con mayor concentración de glucosa, lo que podría indicar que la velocidad de acidificación y por lo tanto de formación del gel son importantes para controlar la magnitud de este parámetro.

La concentración de glucosa influyó también en las propiedades estructurales de los geles; aquellos con mayor concentración de glucosa tuvieron un mayor esfuerzo a la fractura, indicando una estructura más compacta y con menor

porosidad. Éstos además presentaron una mayor capacidad de retención de agua, probablemente debido a una mayor interacción entre agregados de proteínas, lo que puede promover el contacto de grupos sulfhidrilos libres y aumentar la formación de puentes disulfuro en los geles.

Los sistemas con arabinoxilanos (AX) no gelificaron. En el caso del sistema con 2% AX y 0% glucosa, el pH no disminuyó durante la incubación, probablemente porque el gran peso molecular y tamaño de los AXs imposibilitó que las bacterias puedan utilizarlo como fuente de carbono. En el caso del sistema con 2% AX y 0,1% glucosa, si bien el pH disminuyó levemente hasta 6,33, este valor de pH no fue suficiente para la formación del gel, porque no llegó al pI de las proteínas del suero. Como las bacterias fueron capaces de consumir casi la totalidad de glucosa en presencia de los AX pero aun así el pH no disminuyó como se esperaba, se puede concluir que los AX podrían tener algún efecto buffer en el sistema.

Los sistemas gelificados mostraron ser más protectores de las bacterias durante el almacenamiento que los sistemas que no formaron estructura de gel. Si bien las UFC disminuyeron en todos los casos a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, las muestras que formaron geles (Glu 0,1; 0,25; 0,5; 1%) mostraron recuentos superiores a 10^6 UFC después de 4 semanas de almacenamiento, cumpliendo con la denominación del CAA de “alimento con probióticos” (CAA, 2013).

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas Syed, Q., Hassan, A., Sharif, S., Ishaq, A., Saeed, F., Afzaal, M., Hussain, M., & Anjum, F. M. (2021). Structural and functional properties of milk proteins as affected by heating, high pressure, Gamma and ultraviolet irradiation: a review. In *International Journal of Food Properties* (Vol. 24, Issue 1, pp. 871–884). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1937209>
- Abbeele, P. Van Den, Venema, K., Wiele, T. Van De, Verstraete, W., & Possemiers, S. (2013). *Different Human Gut Models Reveal the Distinct Fermentation Patterns of Arabinoxylan versus Inulin*. <https://doi.org/10.1021/jf4021784>
- Agrarias, C. (2019). *Evaluación del proceso de Diafiltración para la concentración de la proteína en el suero dulce de quesería*.
- Aguirre, P. (2019). Functional Foods, Between the New and Old Corporalities. *Aibr-Revista De Antropología Iberoamericana*, 14(1), 95–120. <https://doi.org/10.11156/aibr.140106>
- Ainsley Reid, A., Champagne, C. P., Gardner, N., Fustier, P., & Vuilleumard, J. C. (2007). Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *Journal of Food Science*, 72(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00222.x>
- Alander, M., Kneifel, W., Johansson, M., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2001). Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. In *International Dairy Journal* (Vol. 11).
- Almaraz, R. S., Fuentes, M. M., Milla, S. P., Plaza, B. L., Bermejo López, L. M., & Candela, C. G. (2015). Indicaciones de diferentes tipos de fibra en distintas patologías. *Nutrición Hospitalaria*, 31(6), 2372–2383. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.9023>
- Alting, A. C., De Jongh, H. H. J., Visschers, R. W., & Simons, J. W. F. A. (2002). Physical and chemical interactions in cold gelation of food proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4682–4689. <https://doi.org/10.1021/jf011657m>
- Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G., Paques, M., & Visschers, R. W. (2003). Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 469–479. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00023-7)
- Alting, A. C., Hamer, R. J., De Kruif, C. G., & Visschers, R. W. (2000). Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5001–5007.
<https://doi.org/10.1021/jf000474h>
- Arce-Méndez, J. R., Thompson-Vicente, E., & Calderón-Villaplana, S. (2015). Incorporación de la proteína del suero lácteo en un queso fresco. *Agronomía Mesoamericana*, 27(1), 61. <https://doi.org/10.15517/am.v27i1.21878>
- Balandrano, D. D. H. (2019). Evaluación funcional y antioxidante de arabinosilanos ferulados extraídos de pericarpio de maíz (*zea mays* l.) obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción alcalina. In *Society*.
- Bhattacharjee, S. (2016a). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhattacharjee, S. (2016b). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? In *Journal of Controlled Release* (Vol. 235, pp. 337–351). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Blake, J. D., & Richards, G. N. (1971). CARBOHYDRATE RESEARCH EVIDENCE FOR MOLECULAR AGGREGATION IN HEMICELLULOSES. In *Curimhyd. Kes* (Vol. 18).
- Brignone, S. G., Ravetti, S., & Palma, S. D. (2020). *Microencapsulación/ recubrimiento de sistemas particulados de uso farmacéutico*. <https://unitefa.conicet.unc.edu.ar/>
- CAA, C. A. A. (2013). Capítulo VIII: Alimentos Lácteos. *Código Alimentario Argentino*, 44–45.
- Cardona-Arengas, M. A., & López-Marín, B. E. (2019). Los probióticos: alimentos funcionales para lactantes. *Revista Médicas UIS*, 32(2), 31–39.
<https://doi.org/10.18273/revmed.v32n2-2019004>
- Caro Henao, P. (2002). *DISEÑO Y DESARROLLO DE UNA BEBIDA LÁCTEA, TIPO YOGURT, CON SABOR A CAFÉ*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Castillo-Escandón, V. (2019). *Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados*. 1–17.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173>
- Cavallieri, A. L. F., & da Cunha, R. L. (2008). The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.01.001>
- Chen, X. min, Yuan, J. lan, Li, R. xia, & Kang, X. (2019). Characterization and embedding potential of bovine serum albumin cold-set gel induced by glucono- δ -lactone and sodium chloride. *Food Hydrocolloids*, 95(March), 273–282.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.050>

- Chutkan, R., Fahey, G., Wright, W. L., & Mcrorie, J. (2012). Viscous versus nonviscous soluble fiber supplements: Mechanisms and evidence for fiber-specific health benefits. In *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* (Vol. 24, Issue 8, pp. 476–487). <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2012.00758.x>
- Código Alimentario Argentino*. (2006).
- Cruz Ruiz, K. A. (2012). Modelado del proceso de hidrólisis enzimática en almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano. *Universidad Nacional de Colombia*, 1–78.
- Dahl, W. J., & Stewart, M. L. (2015). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Health Implications of Dietary Fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(11), 1861–1870. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2015.09.003>
- Damen, B., Verspreet, J., Pollet, A., Broekaert, W. F., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2011). Prebiotic effects and intestinal fermentation of cereal arabinoxylans and arabinoxylan oligosaccharides in rats depend strongly on their structural properties and joint presence. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(12), 1862–1874.
- de Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The inulin effect. In *Food research international* (1st ed., Vol. 48, pp. 21–27).
- De Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597–608. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75613-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9)
- del Rosario, M., Rojas-cruz, M., & Ernesto, L. (2016). Análisis de perfil de textura y caracterización de carrageninas para uso en productos cárnicos. In *Revista Ciencias de la Salud Junio* (Vol. 3, Issue 7). www.ecorfan.org/bolivia
- Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2016). Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1685–1716. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.798779>
- Doner, L. W., & Johnston, D. B. (2001). Isolation and characterization of cellulose/arabinoxylan residual mixtures from corn fiber gum processes. *Cereal Chemistry*, 78(2), 200–204.
- Dunand, E., Burns, P., Binetti, A., Bergamini, C., Peralta, G. H., Forzani, L., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2019). Postbiotics produced at laboratory and industrial level as potential functional food ingredients with the capacity to protect mice against

- Salmonella infection. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 219–229.
<https://doi.org/10.1111/jam.14276>
- E. Drioli, & L. Giorno. (2016). Encyclopedia of Membranes. In *Encyclopedia of Membranes*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8>
- Early, R. (2012). Dairy products and milk-based food ingredients. In *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* (pp. 417–445). Elsevier.
<https://doi.org/10.1533/9780857095725.2.417>
- El Bouchikhi, S., Pagès, P., El Alaoui, Y., Ibrahimi, A., & Bensouda, Y. (2019). Syneresis investigations of lacto-fermented sodium caseinate in a mixed model system. *BMC Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0539-1>
- Farjami, T., Madadlou, A., & Labbafi, M. (2015). Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. *Food Hydrocolloids*, 50, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.011>
- Fishman, M. L., Doner, L. W., Chau, H. K., & Hoagland, P. D. (2000). Characterization of Hemicellulose B from Corn Fiber by High-Performance Size Exclusion Chromatography with On-Line Molar Mass and Viscometric Detection. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 5(4–6), 359–379.
<https://doi.org/10.1080/10236660008034633>
- Foegeding, E. A., Luck, P., & Vardhanabhuti, B. (2011). Milk Protein Products | Whey Protein Products. In John W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, Academic Press (2nd ed., Vol. 2, pp. 873–878).
- García Guerrero, M. (2019). *Impact of microstructure on protein hydrolysis and acid uptake during in vitro gastric digestion of egg white protein gels*.
- Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 64–71.
- Gutiérrez, J. B. (2000). *Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos*.
- Harding, S. E. (1997). The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. In *Progress in biophysics and molecular biology* (2nd ed., Vol. 68, pp. 207–262).
- Harding, S. E. (1998). I Dilute solution viscometry of food biopolymers. *FUNCTIONAL PROPERTIES OF FOOD MACROMOLECULES*.

- Hazrati, Z., & Madadlou, A. (2021). Gelation by bioactives: Characteristics of the cold-set whey protein gels made using gallic acid. *International Dairy Journal*, *117*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104952>
- Henriques, M. H. F., Gomes, D. M. G. S., Borges, A. R., & Pereira, C. J. D. (2020). Liquid whey protein concentrates as primary raw material for acid dairy gels. *Food Science and Technology*, *40*(2), 361–369. <https://doi.org/10.1590/fst.43218>
- Hleap, J. H., & Velasco, V. A. (2010). ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES DE TEXTURA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE SALCHICHAS ELABORADAS A PARTIR DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis* sp.). *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*, 46–56. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:93772437>
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Li, L., Gibson, G. R., Sanz, M. L., & Rastall, R. A. (2007). In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(11), 4589–4595.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, *28*(1), 33–48. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00077-1)
- Jackson-Thompson, J., Ahmed, F., German, R. R., Lai, S., & Friedman, C. (2006). Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998–2001. *Cancer*, *107*(S5), 1103–1111.
- Joint FAO and WHO Working Group. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. 1–11.
- Knudsen, K. E. B., & Lærke, H. N. (2010). Rye arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties and physiological effects in the gastrointestinal tract. *Cereal Chemistry*, *87*(4), 353–362.
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, *87*(S2), S193–S197.
- Kuhn, K. R., Cavallieri, Â. L. F., & da Cunha, R. L. (2010). Cold-set whey protein gels induced by calcium or sodium salt addition. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*(2), 348–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02145.x>
- Léonard, L., Husson, F., Langella, P., Châtel, J. M., & Saurel, R. (2016). Aqueous two-phase system cold-set gelation using natural and recombinant probiotic lactic acid bacteria as a gelling agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *141*, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.057>

- Loyeau, P. (2020). *Microencapsulación de microorganismos probióticos con productos de la reacción de maillard (prm) de proteínas de suero lácteo y dextranos*. Universidad Nacional del Litoral.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, *30*(7), 529–542.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5)
- Mabrouk, A. M. M., El-Sayed, H. S., El-Sayed, S. M., Nawwar, G. A., & Youssef, A. M. (2021). Development of Eco-friendly Probiotic Edible Coatings Based on Chitosan, Alginate and Carboxymethyl Cellulose for Improving the Shelf Life of UF Soft Cheese. *Journal of Polymers and the Environment*, *29*(6), 1941–1953.
<https://doi.org/10.1007/s10924-020-02003-3>
- Machado, T. A. D. G., de Oliveira, M. E. G., Campos, M. I. F., de Assis, P. O. A., de Souza, E. L., Madruga, M. S., Pacheco, M. T. B., Pintado, M. M. E., & Queiroga, R. de C. R. do E. (2017). Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *LWT*, *80*, 221–229.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.013>
- Maes, C., & Delcour, J. A. (2002). Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science*, *35*(3), 315–326.
- Mao, R., Tang, J., & Swanson, B. G. (2000). *Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels*. www.elsevier.com/locate/carbpol
- Marangon, A. (2020). *Aprovechamiento de subproductos de cereales para la obtención de prebióticos de alto valor agregado*. Universidad Nacional del Litoral.
- Marquez-Escalante, J., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y. L., Valenzuela-Soto, E. M., Rascón-Chu, A., & Escalante, J. M. (2018). Prebiotic effect of Arabinoxylans and Arabinoxylan-Oligosaccharides and the relationship with good health promotion Efecto prebiótico de los Arabinoxilanos y los Arabinoxilo-Oligosacáridos y su relación con la promoción de la buena salud. *CienciaUAT*, *146*(1), 146–164.
<https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.922>
- Martínez-Villaluenga, C., & Gómez, R. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal*, *17*(2), 116–122.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.003>
- Matsumoto, M., Ohishi, H., & Benno, Y. (2004). H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, *93*(1), 109–113.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.009>

- Mättö, J., Alakomi, H. L., Vaari, A., Virkajärvi, I., & Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16(9), 1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.014>
- Mendis, M., Leclerc, E., & Simsek, S. (2016). Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydrate Polymers*, 139, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.068>
- Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., & Mohammad Mortazavian, A. (2012). The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 12, Issue 4, pp. 399–409). <https://doi.org/10.1002/elsc.201100125>
- Monobe, M. (2008). Immunostimulating activity and molecular weight dependence of an arabinoxylan derived from wheat bran. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 55, 245–249.
- Morales, R. (2017). *Propiedades funcionales del péptido bioactivo caseinoglicomacropéptido (CMP) y el impacto de su interacción con componentes de la matriz alimentaria*.
- Morales-Ortega, A., Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Gardea-Béjar, A., Torres-Chávez, P., López-Franco, Y., Rascón-Chu, A., & Lizardi-Mendoza, J. (2013). Los arabinoxilanos ferulados de cereales. Una revisión de sus características fisicoquímicas y capacidad gelificante. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 439–446.
- Negrette Rodriguez, A. C. (2016). *Desarrollo y caracterización de un alimento tipo snack por secado de geles mixtos de proteínas de lactosuero y miel*.
- Nguyen, H. T. H., Ong, L., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2015). Homogenisation improves the microstructure, syneresis and rheological properties of buffalo yoghurt. *International Dairy Journal*, 46, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.003>
- Noir, H. M. (2019). *Productos de la reacción de Maillard (PRM) de proteínas de suero lácteo y dextranos como materiales encapsulantes de compuestos lipofílicos a través del proceso de gelificación en frío*. Universidad Nacional del Litoral.
- Østlie, H. M., Helland, M. H., & Narvhus, J. A. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 17–27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00044-8)
- Pastell, H., Westermann, P., Meyer, A. S., Tuomainen, P., & Tenkanen, M. (2009). In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and

- mixed fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8598–8606.
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., & Bacic, A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, 7(9), 1590–1607. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.081>
- Pollet, A., Van Craeyveld, V., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2012). In vitro fermentation of arabinoxylan oligosaccharides and low molecular mass arabinoxylans with different structural properties from wheat (*Triticum aestivum* L.) bran and psyllium (*Plantago ovata* Forsk) seed husk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 946–954.
- Posada, K., Terán, D. M., & Ramírez-Navas, J. S. (2011). Empleo de lactosuero y sus componentes en la elaboración de postres y productos de confitería. *La Alimentación Latinoamericana*, 292(1), 66–76.
- Prasanna, P. H. P., Grandison, A. S., & Charalampopoulos, D. (2012). Screening human intestinal Bifidobacterium strains for growth, acidification, EPS production and viscosity potential in low-fat milk. *International Dairy Journal*, 23(1), 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.09.008>
- Rahman, M., Al Attabi, Z., Al-Habsi, N., & Al-Khusaibi, M. (2021). *Measurement of Instrumental Texture Profile Analysis (TPA) of Foods* (pp. 427–465). https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_17
- Roberfroid, M. B. (2008). Prebiotics: Concept, Definition, Criteria, Methodologies, and Products. In *Handbook of prebiotics* (pp. 57–86). CRC Press.
- Rodríguez R., Y. A., Rojas G., A. F., & Rodríguez B., S. (2016). Encapsulación De Probióticos Para Aplicaciones Alimenticias. *Biosalud*, 15(2), 106–115. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>
- Roger, P., Saulnier, L., & Thibault, J. (1996). Static and dynamic light scattering studies of heteroxylans from maize bran in aqueous solution. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 31).
- Rose, D. J., Patterson, J. A., & Hamaker, B. R. (2010). Structural differences among alkali-soluble arabinoxylans from maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), and wheat (*Triticum aestivum*) brans influence human fecal fermentation profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 493–499.
- Rumpagaporn, P., Reuhs, B. L., Kaur, A., Patterson, J. A., Keshavarzian, A., & Hamaker, B. R. (2015). Structural features of soluble cereal arabinoxylan fibers associated with a slow rate of in vitro fermentation by human fecal microbiota. *Carbohydrate Polymers*, 130, 191–197.

- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 344–371.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Saulniet, L., Marot, C., Chanliaud, E., & Thibault, J.-F. (1995). Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 26).
- Silva, J. V. C., & O'Mahony, J. A. (2018). Microparticulated whey protein addition modulates rheological and microstructural properties of high-protein acid milk gels. *International Dairy Journal*, 78, 145–151.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.013>
- Sohrabvandi, S., Nematollahi, A., Mortazavian, A. M., & Vafaei, R. (2013). Effects of homogenization pressure and sequence on textural and microstructural properties of milk-based creamy dessert. In *Journal of Paramedical Sciences (JPS) Winter* (Vol. 4, Issue 1).
- Spotti, M. J. (2013). *Estudio de propiedades y estructura de geles mixtos proteína-polisacárido. Influencia de la reacción de glicosilación.*
- Spotti, M. J., Loyeau, P. A., Marangón, A., Noir, H., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2019a). Influence of Maillard reaction extent on acid induced gels of whey proteins and dextrans. *Food Hydrocolloids*, 91, 224–231.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.020>
- Spotti, M. J., Loyeau, P. A., Marangón, A., Noir, H., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2019b). Influence of Maillard reaction extent on acid induced gels of whey proteins and dextrans. *Food Hydrocolloids*, 91(January), 224–231.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.020>
- Spotti, M. J., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C., & Carrara, C. R. (2012). Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels. *LWT*, 48(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.023>
- Spotti, M.J., Jones, O.G., Reuhs, B., Hamaker, B., & Campanella, O.C. (2016). Extraction, Characterization, and Physical and Enzymatic Treatment of Alkali-Extractable Corn Arabinoxylans. *IFT 2017 Annual Meeting & Expo. Chicago, Estados Unidos.*
- Tavares, C., & Lopes Da Silva, J. A. (2003). Rheology of galactomannan-whey protein mixed systems. *International Dairy Journal*, 13(8), 699–706.
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00095-5)
- Torres Gonzalez, J. D., Gonzalez Morelo, K. J., & Acevedo Correa, D. (2015). Análisis Del Perfil De Textura En Frutas, Productos Cárnicos Y Quesos. *Revista ReCiTeIA*.
<http://revistareciteia.es.tl/>

- Valerio, D. K. (2019). "Efecto del tiempo de sonicación de leche cruda sobre parámetros de inocuidad, calidad y control de proceso en la elaboración de yogurt griego."
- Van Craeyveld, V. (2009). *Production and functional characterisation of arabinoxylan-oligosaccharides from wheat (Triticum aestivum L.) bran and psyllium (Plantago ovata Forsk) seed husk*.
- Van den Abbeele, P., Gérard, P., Rabot, S., Bruneau, A., El Aidy, S., Derrien, M., Kleerebezem, M., Zoetendal, E. G., Smidt, H., & Verstraete, W. (2011). Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2667–2680.
- Vardakou, M., Nueno, C., Christakopoulos, P., Faulds, C. B., Gasson, M. A., & Narbad, A. (2008). *Evaluation of the prebiotic properties of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity in gut microflora*. 123, 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.007>
- Vardhanabhuti, B., & Foegeding, E. A. (1999). Rheological properties and characterization of polymerized whey protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3649–3655. <https://doi.org/10.1021/jf981376n>
- Vardhanabhuti, B., Foegeding, E. A., MCGuffey, M. K., Daubert, C. R., & Swaisgood, H. E. (2001). *Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey protein isolate*. www.elsevier.com/locate/foodhyd
- Vardhanabhuti, B., Kelly, M. A., Luck, P. J., Drake, M. A., & Foegeding, E. A. (2010). Roles of charge interactions on astringency of whey proteins at low pH. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1890–1899. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2780>
- Vinderola, C. G., Bailo, N., & Reinheimer, J. A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33(2), 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00011-9)
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905–1911. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75065-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75065-X)
- Vinderola, G., Zacarías, M. F., Bockelmann, W., Neve, H., Reinheimer, J., & Heller, K. J. (2012). Preservation of functionality of Bifidobacterium animalis subsp. lactis INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology*, 30(1), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.004>
- Wang, Bai, J., Fan, M., Li, T., Li, Y., Qian, H., & Wang, L. (2020). Trends in Food Science & Technology Cereal-derived arabinoxylans: Structural features and structure –

- activity correlations. *Trends in Food Science & Technology*, 96(May 2019), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.016>
- Weng, W., & Zheng, W. (2015). Effect of setting temperature on glucono- δ -lactone-induced gelation of silver carp surimi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1528–1534. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6857>
- Yadav, M. P., Fishman, M. L., Chau, H. K., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. (2007). Molecular characteristics of corn fiber gum and their influence on CFG emulsifying properties. *Cereal Chemistry*, 84(2), 175–180. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-84-2-0175>
- Zacarías, M. F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2011). Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, 21(8), 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.03.007>
- Zhang, L., Ding, Q., Zhang, P., Zhu, R., & Zhou, Y. (1997). Molecular weight and aggregation behaviour in solution of /3-o-glucan from *Poria cocos sclerotium*. In *Carbohydrate Research* (Vol. 303).
- Zhang, M., Bai, X., & Zhang, Z. (2011). Extrusion process improves the functionality of soluble dietary fiber in oat bran. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.04.001>
- Zhang, P., Zhang, Q., & Whistler, R. L. (2003). L-arabinose release from arabinoxylan and arabinogalactan under potential gastric acidities. *Cereal Chemistry*, 80(3), 252–254. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2003.80.3.252>
- Zheng, X., Li, L., & Wang, X. (2011). Molecular characterization of arabinoxylans from hull-less barley milling fractions. *Molecules*, 16(4), 2743–2753. <https://doi.org/10.3390/molecules16042743>

7. ANEXO

7. ANEXO

7.1. OBTENCIÓN DE ARABINOXILANOS DE MAÍZ

Se procedió a desgrasar las muestras de maíz mediante dos lavados con hexano en relación 1:5 (salvado: hexano). Luego, se separó el salvado del solvente mediante filtración por papel (Whatman 1, retiene hasta 11 μm) y se dejó 24 h bajo campana para asegurar evaporación total del hexano.

Posteriormente, se removió el almidón del salvado desgrasado. Para ello se suspendieron 100 g de muestra en 1 litro de agua destilada, se neutralizó la muestra y se calentó a 95°C por 30 min para gelatinizar el almidón. Posteriormente, se enfrió, filtró (papel Whatman 1) y se dispersó la muestra en buffer citrato-fosfato pH 4,5 y se realizó un tratamiento enzimático para hidrólisis del almidón mediante la adición de una enzima glucoamilasa (Optidex®, Genencor International) (2 μL por cada 5 mL de muestra) y se llevó a un baño a 60°C por 30min. El salvado se recuperó mediante filtración, y se realizaron varios lavados para eliminar restos de almidón hidrolizado.

Luego, se realizó un tratamiento enzimático con una enzima proteasa a fin de eliminar el contenido de proteína del salvado. Para esto se llevó la muestra a pH 6 con NaOH 1N, se adicionó un volumen específico de enzima proteasa (7,5 mL por cada 1 litro de agua destilada) (Neutrase 0.8L Novozymes) y se llevó a un baño de 50°C por 6 h. Luego, se llevó la muestra a 100°C por 5 min para inactivar las enzimas. Después, el salvado fue enjuagado varias veces con agua destilada y se dejó en estufa a 45°C con convección por 48 h para asegurar la evaporación total del agua de

lavado, asegurando que la muestra no tuviera agua que pueda diluir el NaOH que se usará para la extracción de los AX.

La extracción de AX se llevó a cabo según (Doner & Johnston, 2001), con algunas modificaciones. Para ello, 100 g de salvado de maíz previamente desgrasado, y sin lípidos ni proteínas fue suspendido en 1000 ml de NaOH 1N, y se mantuvo bajo agitación constante a 60°C durante 4 h, y se les agregó 16 ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% v/v cada 1 litro de NaOH.

Luego, las muestras se centrifugaron a 10.000 g por 30 min (Heal Force, Neofuge 18R, China). Se recuperaron los sobrenadantes, y lo recolectado se llevó a pH 7 con HCl 6N. Los arabinosilanos solubles en el mismo se obtuvieron mediante precipitación alcohólica con etanol 95% (relación etanol:agua 4:1). Una vez adicionado el alcohol, la muestra se colocó a 4°C durante 24 h para asegurar la precipitación completa de los AX. Pasado dicho tiempo, se centrifugó la muestra a 2000 rpm por 10 min (Giumelli Z-29, Argentina). Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se disolvió en agua destilada (relación precipitado:agua 1:3). Para eliminar los restos de alcohol que quedaron en el precipitado de AX, la solución se destiló en un evaporador rotatorio a 50°C (Büchi modelo R-124, Suiza). Los AX disueltos en agua se congelaron y luego se liofilizaron obteniéndose un polvo que se almacenó a -18°C hasta futuras determinaciones.

7.2. FUNDAMENTOS DE LA DETERMINACIÓN DE VISCOSIDAD INTRÍNSECA

Para el cálculo de la viscosidad intrínseca se determina el tiempo que transcurre en fluir un volumen de solución de polímero (en concentraciones muy

bajas en determinado solvente) a través de un tubo capilar (viscosímetro capilar) y es comparado con el tiempo para el solvente puro (Harding, 1998). Para ello se adoptan las siguientes hipótesis: a) fluido newtoniano (aunque las soluciones de macromoléculas como proteínas y polisacáridos no son newtonianas, se consideran así por estar muy diluidas); b) energía cinética de salida despreciable; y c) pérdidas de energía por efectos de entrada y salida despreciables. En tal caso, el caudal Q que fluye por un capilar de radio r y longitud l responde a la ley de Hagen-Poiseuille:

$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \eta l} \quad (\text{Ec. 9})$$

donde η es la viscosidad de la solución.

Supondremos que:

$$Q(t) = \frac{dV(t)}{dt} = \frac{V}{t} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi \Delta P r^4}{8 \eta l} \quad (\text{con } V \text{ independiente de } t) \quad (\text{Ec. 11})$$

Reemplazando $\Delta P = \delta g h$, resulta:

$$dt = \frac{8 \eta l}{\pi \delta g r^4} \frac{dV}{h} \quad t = \frac{8 \eta l}{\pi \delta g r^4} \int_{h_2}^{h_1} \frac{dV}{dh} \quad (\text{Ec. 12})$$

Pero: $\int_{h_2}^{h_1} \frac{dV}{dh}$ = área del capilar, es constante; y $\frac{8 \eta l}{\pi \delta g r^4}$ también es constante.

Por lo tanto, el tiempo entre enrrases:

$$t \cong \frac{\eta}{A \delta} \quad (A = \text{cte.}) \quad (\text{Ec. 13})$$

donde $\frac{\eta}{\delta}$ es la viscosidad dinámica (o cinemática).

Aplicando la ecuación anterior con y sin soluto, resulta:

- Solución polimérica:

$$\eta = A\delta t \quad (\text{Ec. 14})$$

- Solvente puro:

$$\eta_0 = A\delta_0 t_0 \quad (\text{Ec. 15})$$

Mientras que la viscosidad se ve muy afectada por la presencia del polímero, la densidad de la solución prácticamente no se modifica con respecto a la del solvente puro. En tal caso, suponemos $\delta \cong \delta_0$, y estimamos viscosidad relativa (adimensional) como:

- Viscosidad relativa:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \cong \frac{t}{t_0} \quad (\text{Ec. 16})$$

A partir de esta última se definen las siguientes “viscosidades”:

- Viscosidad específica:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1 \cong \frac{t}{t_0} - 1 \quad (\text{Ec. 17})$$

Para eliminar el efecto de la concentración sobre la viscosidad de la solución y quedarnos sólo con el efecto de la masa molar, definimos las siguientes variables reducidas:

- Viscosidad reducida:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{\eta_{rel} - 1}{c} \quad (\text{Ec. 18})$$

- Viscosidad inherente:

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{c} = \frac{\ln(\eta_{sp}+1)}{c} \quad (\text{Ec. 19})$$

Definimos entonces:

- Viscosidad intrínseca:

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{sp}}{c}\right) = \left(\frac{\ln \eta_{red}}{c}\right) \quad (\text{Ec. 20})$$

Del punto de vista práctico, la viscosidad intrínseca $[\eta]$ se determina extrapolando a 0 las mediciones de $\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$ y $\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ a varias concentraciones.

7.3. FUNDAMENTOS DE LA MEDIDA DE POTENCIAL Z

Cuando se aplica un campo eléctrico a la muestra diluida contenida en una celda de potencial, las partículas cargadas migrarán hacia el electrodo con carga opuesta. Durante este movimiento, la resistencia viscosa del medio se opone a la fuerza del campo eléctrico que actúa sobre las partículas cargadas. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante. Esta velocidad se denomina movilidad electroforética (UE), la que está relacionada con el potencial zeta, mediante la ecuación de Henry:

$$UE = \frac{2 \varepsilon Z f(\kappa a)}{3 \eta} \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde ϵ es la constante dieléctrica, Z es el potencial Z , $f_{(ka)}$ es la función de Henry y η es la viscosidad. En medio acuoso y con baja concentración de electrolitos, se usa una aproximación de $f_{(ka)} = 1,5$ (aproximación de Smoluchowsky).

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula.

La capa de líquido que rodea a la partícula está comprendida por dos partes: una región interna (capa de Stern) donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa (capa difusa) donde los iones están ligados más débilmente. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula forman una entidad estable (doble capa eléctrica).

Cuando una partícula se mueve, lo hace con los iones que conforman la capa de Stern y la difusa, pero los iones que se encuentran fuera del límite no se mueven con la partícula. El potencial correspondiente a este límite (superficie de cizallamiento hidrodinámico) se conoce como potencial Z (Figura 21).

Las medidas de potencial zeta dan información acerca de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las partículas coloidales en solución debido a la doble capa eléctrica (Bhattacharjee, 2016b).

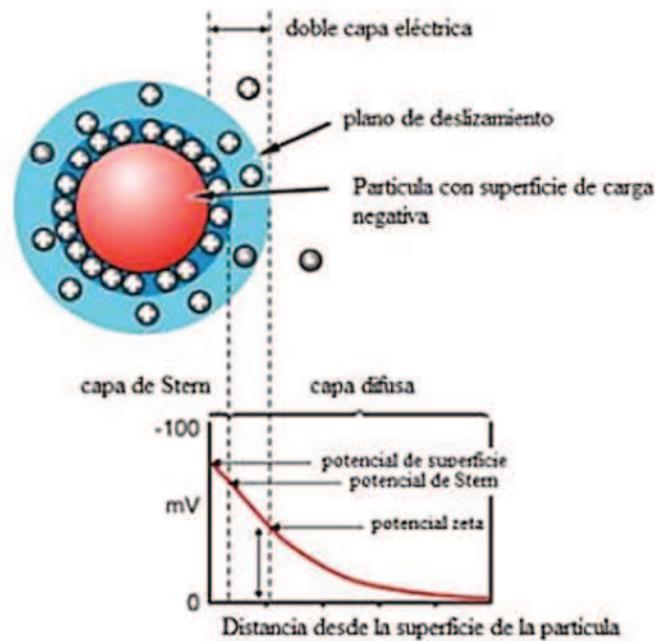


Figura 21. Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.

7.4. FUNDAMENTOS DE LA MEDIDA DE TAMAÑO POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

El fundamento de la medición se basa en el movimiento browniano aleatorio de las partículas suspendidas en un fluido debido a la colisión con las moléculas del líquido que las rodea. Las partículas pequeñas se mueven más rápido y las grandes lo hacen más lentamente. En DLS, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas fluctúa a una velocidad que depende del tamaño de las partículas. Al analizar la intensidad de estas fluctuaciones, se puede determinar el coeficiente de difusión y correlacionarlo con el tamaño de la partícula. La relación entre el tamaño de la partícula y el coeficiente de difusión se define por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_{(H)} = \frac{K_b T}{3 \pi \eta D} \quad (\text{Ec. 22})$$

Donde $d_{(H)}$ es el diámetro hidrodinámico, K_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, η es la viscosidad del solvente y D es el coeficiente de difusión traslacional (Bhattacharjee, 2016b).