

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
Máster Universitario en Tecnología y Calidad Agroalimentaria



**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE
FERMENTACIÓN EN LA VIABILIDAD
DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* Y
BIFIDOBACTERIUM LONGUM EN
BEBIDAS DE QUINOA ROJA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Junio – 2019

AUTORA: Débora Cerdá Bernad

DIRECTOR/ES: María José Frutos Fernández

Estefanía Valero Cases



MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

VISTO BUENO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2018/2019

Director/es del trabajo
<p>María José Frutos Fernández Estefanía Valero Cases</p>

Dan su visto bueno al Trabajo Fin de Máster

Título del Trabajo
<p>Influencia del tiempo de fermentación en la viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Bifidobacterium longum</i> en bebidas de quinoa roja</p>
Alumno
<p>Débora Cerdá Bernad</p>

Orihuela, a 4 de Julio de 2019

Firma/s tutores trabajo



MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Título: Influencia del tiempo de fermentación en la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en bebidas de quinoa roja

Title: Influence of fermentation time on the viability of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in red quinoa beverages

Modalidad (proyecto/experimental): Experimental

Type (project/research): Research

Autor/Author: Débora Cerdá Bernad

Director/es/Advisor: María José Frutos Fernández, Estefanía Valero Cases

Convocatoria: Junio 2019

Month and year: June 2019

Número de referencias bibliográficas/number of references: 57

Número de tablas/Number of tables: 11

Número de figuras/Number of figures: 3

Número de planos/Number of maps: 0

Palabras clave (5 palabras): probiótico, *Chenopodium quinoa*, alimento funcional, fermentación, bacterias ácido lácticas

Key words (5 words): probiotic, *Chenopodium quinoa*, functional food, fermentation, lactic acid bacteria



MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

RESUMEN:

Actualmente, los consumidores son más conscientes de la relación entre la dieta y la salud, buscando alimentos más saludables como los alimentos probióticos. Sin embargo, la mayoría de estos productos comerciales son productos lácteos fermentados. Este trabajo tiene como objetivo evaluar la viabilidad de los probióticos *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en una bebida de quinoa roja (*Chenopodium quinoa*, L.) tras diferentes tiempos de fermentación en esta matriz. Para ello, se determinó el número de células viables, las propiedades antioxidantes y la concentración de polifenoles totales en diferentes tiempos de fermentación, así como tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, junto con parámetros físico-químicos y la resistencia microbiológica a distintos antibióticos. Los resultados mostraron que el tiempo de fermentación influyó positivamente sobre la viabilidad de los probióticos, siendo ésta superior en la bebida con *B. longum* después de 24 horas de fermentación. Tras la digestión *in vitro* de las bebidas de quinoa roja, la viabilidad de ambos probióticos fue muy elevada. Por lo tanto, las bebidas a base de este pseudocereal son un buen vehículo para mantener la viabilidad de *L. plantarum* y *B. longum* por encima del mínimo recomendado (10^6 - 10^7 UFC/mL) de modo que puedan ejercer sus efectos beneficiosos a nivel intestinal.

ABSTRACT:

Currently, consumers are more aware of the relationship between diet and health and are looking for healthier foods such as probiotic foods. However, most of these commercial products are fermented dairy foods. The objective of this work is to evaluate the viability of the probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in a red quinoa (*Chenopodium quinoa*, L.) beverage at different fermentation times in this matrix. Thus, the number of viable cells, the antioxidant properties and the concentration of total polyphenols at different fermentation times were determined, as well as after the *in vitro* gastrointestinal digestion, together with physico-chemical parameters and the microbial resistance to different antibiotics. In conclusion, the results showed that the fermentation time had a positive influence in the probiotic viability being higher in the beverage with *B. longum* after 24 hours of fermentation. The viability of both probiotics was very high in the red quinoa beverages after *in vitro* digestion. Therefore this pseudocereal is a good carrier to maintain the viability of *L. plantarum* and *B. longum* above the minimum recommended (10^6 - 10^7 CFU/mL) so that they could exert their beneficial effects in the gut.

ÍNDICE DE MATERIAS

1.- INTRODUCCIÓN.....	7
1.1.- Alimentos funcionales.....	7
1.2.- Probióticos.....	7
1.2.1.- Géneros bacterianos más utilizados.....	8
1.2.2.- Funciones y mecanismos de acción.....	10
1.2.3.- Viabilidad.....	12
1.3.- Matrices alimentarias como portadoras de probióticos.....	12
2.- OBJETIVOS.....	14
2.1.- Objetivo principal.....	14
2.2.- Objetivos específicos.....	14
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	15
3.2.- Preparación y fermentación de la bebida.....	15
3.3.- Determinación de la viabilidad de los probióticos.....	15
3.4.- Digestión <i>in vitro</i>	16
3.5.- Resistencia a antibióticos.....	16
3.6.- Extracción de compuestos bioactivos.....	16
3.7.- Extracción de ácidos orgánicos y azúcares.....	17
3.8.- Determinaciones analíticas.....	17
3.8.1.- Propiedades antioxidantes.....	17
3.8.1.1.- Capacidad antioxidante: Método DPPH.....	17
3.8.1.2.- Capacidad antioxidante: Método ABTS.....	17
3.8.2.- Parámetros físico-químicos.....	18
3.8.2.1.- Ácidos orgánicos y azúcares.....	18
3.8.2.2.- Sólidos solubles totales.....	18
3.8.2.3.- pH y acidez.....	18
3.8.2.4.- Color.....	18
3.8.2.5.- Polifenoles totales.....	19
3.9.- Análisis estadístico.....	19
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1.- Viabilidad de <i>L. plantarum</i> y <i>B. longum</i> durante la fermentación a diferentes tiempos.....	20
4.2.- Metabolismo de azúcares.....	20
4.3.- Metabolismo de ácidos orgánicos.....	22
4.4.- Parámetros físico-químicos.....	23
4.5.- Resistencia a antibióticos.....	26
4.6.- Capacidad antioxidante.....	28
4.7.- Digestión <i>in vitro</i>	29
4.7.1.- Viabilidad de <i>L. plantarum</i> y <i>B. longum</i> tras la digestión <i>in vitro</i>	29

4.7.2.- Polifenoles totales	30
4.7.3.- Capacidad antioxidante	31
5.- CONCLUSIONES.....	33
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Formas de transformar un alimento en funcional o de incrementar su funcionalidad.....	8
Figura 2.- Reacciones de fermentación láctica.....	10
Figura 3.- Efectos de las bacterias probióticas sobre la función de la barrera epitelial intestinal.....	12

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Microorganismos potencialmente probióticos de uso en alimentos y suplementos alimenticios.....	9
Tabla 2.- Viabilidad (Log UFC/mL) de <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Bifidobacterium longum</i> en bebidas de quinoa fermentadas en diferentes tiempos de fermentación a 37 °C	20
Tabla 3.- Contenido de azúcares en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos	21
Tabla 4.- Contenido de ácidos orgánicos en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos	22
Tabla 5.- Parámetros físico-químicos (pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, color L*, a*, b*, C*, H*, polifenoles totales) en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos.....	24
Tabla 6.- Resistencia a antibióticos del probiótico <i>L. plantarum</i> en las bebidas de quinoa a cada tiempo de fermentación.....	26
Tabla 7.- Resistencia a antibióticos del probiótico <i>B. longum</i> en las bebidas de quinoa a cada tiempo de fermentación	27
Tabla 8.- Capacidad antioxidante en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos	28
Tabla 9.- Viabilidad (Log UFC/mL) de <i>L. plantarum</i> y <i>B. longum</i> en bebidas de quinoa fermentadas 24 h tras la digestión <i>in vitro</i>	30
Tabla 10.- Concentración de polifenoles totales en las bebidas de quinoa fermentadas 24 h tras la digestión <i>in vitro</i>	30
Tabla 11.- Capacidad antioxidante en las bebidas de quinoa fermentadas 24 h tras la digestión <i>in vitro</i>	31



1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Alimentos funcionales

La evolución en la demanda del consumidor ha hecho cambiar el concepto de alimento. El siglo pasado la preocupación era encontrar alimentos suficientes y posteriormente alimentos seguros, libres de gérmenes y de tóxicos. Sin embargo, en los últimos años, los consumidores son más conscientes de la relación entre la dieta y salud y buscan alimentos más saludables, como los alimentos funcionales que mejoran la calidad nutricional y previenen o reducen el riesgo de determinadas enfermedades (Kumar et al., 2015).

Además del creciente interés en alcanzar el bienestar a través de la dieta, los rápidos avances en ciencia y tecnología, el aumento de los costos de atención médica, los cambios en las legislaciones alimentarias que afectan al etiquetado, y el envejecimiento de la población, son algunos de los factores que impulsan el interés en los alimentos funcionales (Siró, Kápolna, Kápolna, & Lugasi, 2008).

No hay unanimidad en la definición de alimento funcional, pero la más aceptada es la del documento de consenso Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFOSE) elaborado por el Instituto Internacional de Ciencias de la vida (Internacional Life Science Institute, ILSI): “Un alimento se denomina funcional cuando, más allá de su valor nutricional, ha demostrado satisfactoriamente que tiene un efecto beneficioso sobre una o más funciones del organismo humano, de forma tal que es relevante para mejorar la salud humana o la calidad de vida, o para reducir los riesgos de enfermedades” (Diplock et al., 1999).

El término de alimentos funcionales nace en Japón por primera vez en la década de los años 80, debido a que el gobierno se planteó la necesidad de fomentar programas de desarrollo de productos alimentarios que pudieran ejercer un efecto positivo sobre la salud y reducir a largo plazo los costosos gastos del sistema de salud (Saito, 2007).

Son cinco las posibilidades para que un alimento sea transformado en funcional o se incremente su funcionalidad (Figura 1):

1. Adición o suplementación de un alimento con sustancias o ingredientes con efectos beneficiosos, como prebióticos o probióticos.
2. Sustitución de las sustancias con efectos negativos por otras con efectos positivos, como la grasa animal por la grasa vegetal.
3. Eliminación de componentes que pueden tener efectos negativos en la salud de los consumidores, como las proteínas alergénicas.
4. Incrementación de la concentración de un componente naturalmente presente y que tiene efectos beneficiosos en la salud, por ejemplo, la fibra alimentaria.
5. Aumento de la biodisponibilidad o estabilidad de un componente para producir efectos funcionales-beneficiosos.

1.2.- Probióticos

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. La definición según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es simple y se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (FAO, 2002). Por tanto, probiótico hace referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como

para alterar positivamente la microbiota intestinal del huésped por implantación o colonización produciendo efectos beneficiosos en dicho huésped (Fuster & González-Molero, 2007).

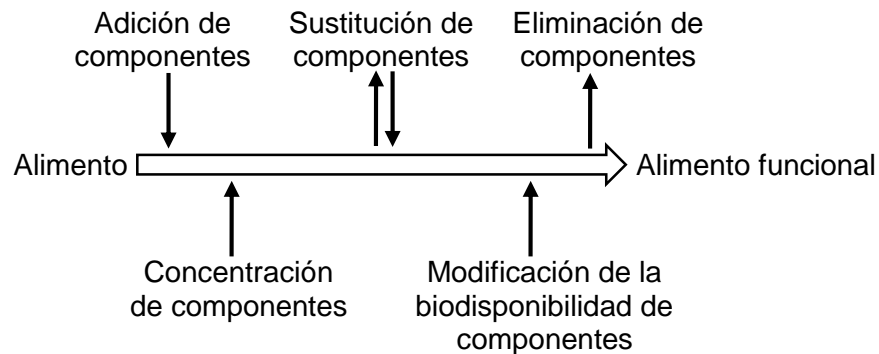


Figura 1.- Formas de transformar un alimento en funcional o de incrementar su funcionalidad.

El microbiólogo ruso Eli Metchnikoff, galardonado con el premio Nobel en 1908, fue el primer científico en observar la función positiva desempeñada por algunas bacterias, al atribuir la longevidad de ciertas poblaciones balcánicas al consumo habitual de lácteos fermentados, que contenían lactobacilos que “reducirían las toxinas producidas por las bacterias intestinales, promoviendo la salud y prolongando la vida”. Y afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la microbiota de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (Cavaillon & Legout, 2016).

1.2.1.- Géneros bacterianos más utilizados

Las bacterias más utilizadas como probióticos en los alimentos son los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, otros géneros como *Streptococcus* y *Enterococcus* su producción mayoritaria es en polvos o cápsulas, en lugar de utilizarse para la producción de alimentos (Tabla 1) (Butel, 2014).

Lactobacillus es un género bacteriano de bacilos largos, rectos o curvados, gram-positivos, no formadores de endosporas, catalasa negativos, en general inmóviles y tienen un contenido en G+C inferior al 50%. Son anaeróbicos facultativos y generalmente mesófilos (30-40 °C), aunque también pueden crecer en un amplio rango de temperaturas (2-53 °C). Las condiciones de pH óptimo para su crecimiento se encuentran en el rango de 5,5 – 6,2, aunque también pueden crecer a pH 3 y pH 8 (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Este género incluye un gran número de especies consideradas como seguras según los criterios de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS), y muchas de las cepas se encuentran entre las bacterias más importantes en la microbiología de los alimentos y la nutrición humana, debido a su contribución a la producción de alimentos fermentados o su uso como probióticos (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Tabla 1.- Microorganismos potencialmente probióticos de uso en alimentos y suplementos alimenticios. Modificado de Sendra, E, Sayas-Barberá, Fernández-López, & Pérez-Alvarez (2016).

Género	Especie
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i> <i>paracasei</i> <i>casei</i> <i>plantarum</i> <i>delbrueckii</i> <i>reuteri</i> <i>fermentum</i> <i>rhamnosus</i> <i>gasseri</i> <i>salivarius</i> <i>johnsonii</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i> <i>infantis</i> <i>bifidum</i> <i>lactis</i> <i>breve</i> <i>longum</i> <i>essensis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>faecalis</i> <i>faecium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>thermophilus</i>

Además, fermentan azúcares formando ácido láctico, por lo que se integran en el grupo denominado bacterias ácido lácticas (BAL). La clasificación de las BAL se realiza en función de la vía de fermentación de hexosas utilizada (Gaspar, Carvalho, Vinga, Santos, & Neves, 2013):

- Las BAL homofermentativas en condiciones de exceso de glucosa y un limitado uso de oxígeno, transforman glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para producir ácido láctico (Figura 2A).
- Las BAL heterofermentativas utilizan la ruta de la pentosa fosfato, para producir además de ácido láctico, otros productos como dióxido de carbono, etanol o ácido acético (Figura 2B).

Los complejos requerimientos nutritivos reflejan sus nichos ecológicos ricos en carbohidratos: plantas y residuos vegetales, alimentos fermentados y como componentes de la microbiota de compartimentos del cuerpo de animales, especialmente el intestino (Tannock, 2004).

Bifidobacterium es un género bacteriano de bacilos gram-positivos, anaeróbicos, no esporulados, no móviles, predominantemente catalasa negativos, con una peculiar morfología bacilar que suele ramificarse en los extremos y con alto contenido en G+C. Las bifidobacterias son uno de los mayores géneros de bacterias saprófitas de la flora intestinal, las bacterias que residen en el colon (Schell et al., 2002). Estas bacterias utilizan únicamente la vía fructosa-6-fosfato fosfocetolasa para fermentar una variedad de carbohidratos, monosacáridos o disacáridos, y producir ácido, pero no gas (Cronin, Ventura, Fitzgerald, & van Sinderen, 2011).

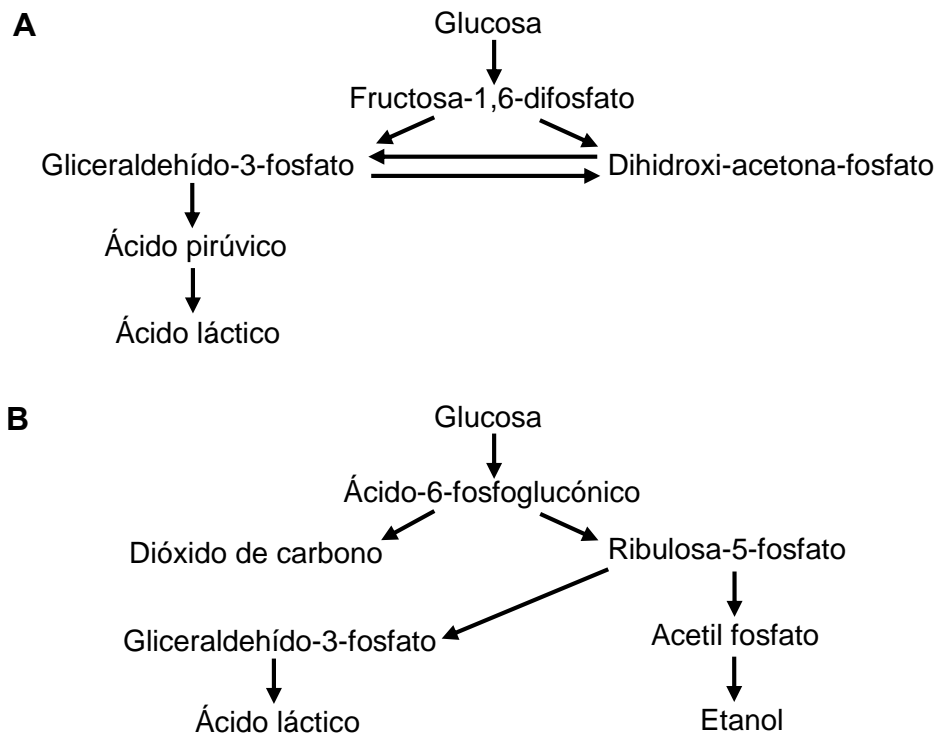


Figura 2.- Reacciones de fermentación láctica. A) Fermentación láctica homofermentativa. B) Fermentación láctica heterofermentativa.

1.2.2.- Funciones y mecanismos de acción

El tracto gastrointestinal alberga una comunidad microbiana específica para cada individuo que es muy compleja y dinámica, y depende tanto de factores genéticos como del ambiente. Cada persona alberga aproximadamente 1,5 kg de bacterias, pudiendo superar el 60% de la masa fecal. Las especies de bacterias que varían a lo largo del tracto intestinal son muy diferentes. La menor concentración se encuentra en el estómago ($<10^3$ ufc/g) y la mayor concentración en el colon (10^{13} - 10^{14} ufc/g) (Tiihonen, Ouwehand, & Rautonen, 2010).

La microbiota intestinal juega un importante papel en la salud, ya que participa tanto en los procesos de digestión como en el desarrollo de la mucosa intestinal y del sistema inmune, por ello el ecosistema microbiano debe autorregularse y mantenerse en equilibrio (Gueimonde & Collado, 2012). Las alteraciones en la microbiota, denominadas disbiosis, pueden aparecer debido a infecciones intestinales, por la administración de medicamentos como los antibióticos, o por una mala alimentación y estilo de vida (Engelbrektson et al., 2006).

El consumo de probióticos vivos permiten mantener el equilibrio microbiano intestinal y contribuir en la salud del tracto gastrointestinal. Entre los efectos beneficiosos de los probióticos se encuentran los siguientes:

- Mejora de la digestión de la lactosa y reducción de la flatulencia, ya que contribuyen a degradar la lactosa (Levri, Ketvertis, Deramo, Merenstein, & D'Amico, 2005).
- Prevención y tratamiento de diarreas infecciosas y las asociadas a antibióticos, atenuando los síntomas de la falta de flora intestinal y facilitando la recolonización por los microorganismos autóctonos. También disminuyen la gravedad y duración

al limitar la superficie de mucosa en la que se desarrolla la infección y sus efectos inmunológicos (Isolauri, 2001; Siitonen et al., 1990).

- Reducción de los síntomas de la inflamación intestinal, íntimamente relacionados con los daños en la función barrera de la mucosa intestinal.
- Protección de la mucosa intestinal frente a agentes carcinógenos, al influir en las funciones metabólicas, inmunológicas y protectoras del organismo (Wollowski, Rechkemmer, & Pool-Zobel, 2001).
- Disminución de la hipercolesterolemia, al disminuir la concentración plasmática de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) y colesterol total (Tok & Aslim, 2010).
- Modulación del sistema inmune: reducen la severidad de los síntomas y previenen algunos procesos alérgicos (asma, dermatitis atópica, urticaria, etc.), estados que se caracterizan por una reacción de hipersensibilidad mediada por mecanismos inmunológicos (Isolauri, Arvola, Sutas, Moilanen, & Salminen, 2000).

Los mecanismos de acción de los probióticos son diversos, ya que actúan a diferentes niveles (Figura 3):

En el lumen intestinal. Interaccionan directamente con la microbiota intestinal, modulan su composición, inhibiendo a microorganismos patógenos, mediante la reducción del pH del medio y la producción de compuestos antibacterianos, o favoreciendo la presencia y diversidad de bacterias beneficiosas (Ohland & MacNaughton, 2010). También pueden ejercer efecto metabólico directo, modificando algunas de las funciones metabólicas que ejerce la flora intestinal: absorción de determinados nutrientes, degradación de material no digerible de la dieta, regulación del almacenamiento de energía, síntesis de vitaminas esenciales, aumento de absorción de minerales, entre otras.

En la mucosa y en el epitelio intestinal. Mejoran la función de la barrera intestinal, como mecanismo de defensa que permite mantener la integridad del epitelio intestinal frente a la acción de agresiones externas y prevenir los daños efectuados en la mucosa intestinal y facilitar su reparación, mediante la secreción de mucina, la modulación de la fosforilación de proteínas y el aumento de la resistencia transepitelial (Howarth & Wang, 2013). También intervienen en los procesos digestivos, metabolizando la lactosa, proteínas y lípidos, sintetizando aminoácidos y vitaminas, fermentando hidratos de carbono con la obtención de ácidos grasos de cadena corta y aumentando la absorción de minerales. Además, el intestino es el órgano con la función inmunitaria más importante del organismo y donde se controlan respuestas inmunitarias contra las proteínas de la dieta y microorganismos patógenos. Así, ciertos probióticos tienen la capacidad de alterar este ecosistema intestinal, estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y los no inmunitarios mediante el antagonismo y competencia con patógenos potenciales. Por tanto, intervienen en la activación de los macrófagos locales para que aumente la presentación de antígenos a los linfocitos B y aumente la producción de inmunoglobulina A secretora local y sistémica, se modulen los perfiles de las citoquinas y se induzca la respuesta a los antígenos alimentarios (Galdeano & Perdigon, 2006; Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2008).

1.2.3.- Viabilidad

Los efectos de las bacterias probióticas en el tracto intestinal, dependen de su viabilidad y actividad metabólica, fomentados por la fermentación de los carbohidratos complejos y otros factores prebióticos.

Los probióticos deben sobrevivir al ácido gástrico y las enzimas y adherirse al epitelio intestinal durante un período de tiempo indefinido (Tripathi & Giri, 2014). La supervivencia y el período de residencia de los probióticos en el colon pueden verse afectados por la matriz alimenticia utilizada, así como por la dosis del probiótico y la duración de la administración (Shori, 2016).

No hay un acuerdo general en la concentración de microorganismos necesaria para ejercer efectos probióticos; generalmente se recomiendan recuentos entre 10^6 - 10^8 UFC/g o mL de alimento (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

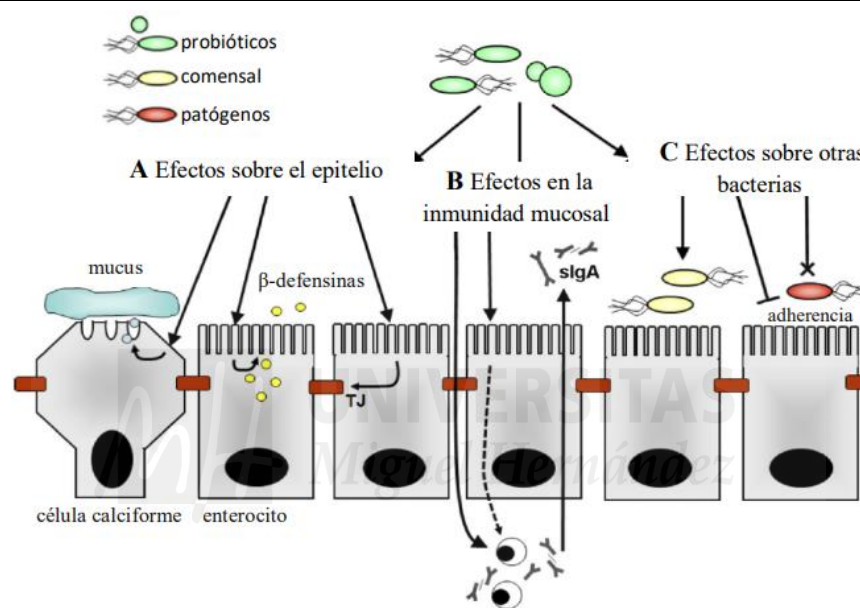


Figura 3.- Efectos de las bacterias probióticas sobre la función de la barrera epitelial intestinal. Adaptada de Howarth & Wang (2013).

1.3.- Matrices alimentarias como portadoras de probióticos

La mayoría de los alimentos probióticos comerciales que hay en el mercado son alimentos fermentados lácteos. Así, parte de la población que es alérgica a las proteínas de la leche, vegetariana estricta o intolerante a la lactosa, no puede consumirlos. Por tanto, es necesario investigar nuevas matrices alimentarias no lácteas como portadoras de probióticos, que permitan ofrecer a los consumidores una alternativa a los productos lácteos fermentados.

La selección de matrices alimentarias como portadoras de probióticos es un factor esencial para asegurar una alta viabilidad de los probióticos para llegar al intestino grueso. Actualmente, las bebidas a base de zumo de frutas y vegetales se están utilizando como matrices portadoras de bacterias probióticas, además de ser una excelente fuente de antioxidantes, vitaminas, compuestos bioactivos y minerales (Granato, Branco, Nazzaro, Cruz, & Faria, 2010; Martins et al., 2013; Valero-Cases & Frutos, 2017; Valero-Cases, Roy, Frutos, & Anderson, 2017). Sin embargo, los cereales

también son sustratos potenciales viables, ya que contienen nutrientes fácilmente asimilables por los probióticos (Charalampopoulos & Pandiella, 2010).

Por tanto, el uso de sustratos de cereales tiene un gran potencial para desarrollar nuevas bebidas funcionales que promuevan la salud gastrointestinal, siempre que aseguren la viabilidad de los probióticos y tengan unas características fisicoquímicas y propiedades organolépticas aceptables (Marsh, Hill, Ross, & Cotter, 2014). Se han utilizado avena, cebada y malta, los cuales mejoran la tolerancia de los probióticos a las condiciones del tracto gastrointestinal, y potencian su crecimiento (Charalampopoulos, Pandiella, & Webb, 2003; Herrera-Ponce, Névarez-Morillón, Ortega-Rivas, Pérez-Vega, & Salmerón, 2014; Salmerón, Thomas, & Pandiella, 2015). También se observó una asociación con la reducción del riesgo de enfermedades crónicas como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo II y algunos tipos de cáncer (Wang, He, & Chen, 2014).

En este trabajo, se utiliza como matriz alimentaria la quinoa roja (*Chenopodium quinoa*) que es un pseudocereal perteneciente a la subfamilia Chenopodioideae de la familia Amaranthaceae. Comúnmente, los granos de quinoa y su harina se emplean para consumo humano y alimentación animal (Rizzello, Lorusso, Montemurro, & Gobetti, 2016). Se trata del único alimento de origen vegetal que presenta todos los aminoácidos esenciales (lisina, metionina, treonina), oligoelementos y vitaminas, equiparándose su calidad proteica a la de la leche, y superando en valor biológico, calidad nutricional y funcional al trigo, maíz, arroz y avena. Además, no contiene gluten, por lo que su consumo es apto para celíacos.





2.- OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo principal

- El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es evaluar la viabilidad de los probióticos *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum*, en una bebida de quinoa roja (*Chenopodium quinoa*, L.) tras diferentes tiempos de fermentación en esta matriz.

2.2.- Objetivos específicos

- Desarrollar una bebida fermentada a base de quinoa roja (*Chenopodium quinoa*, L.) de modo que su método de producción garantice una alta viabilidad de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en el producto elaborado.
- Determinar la influencia del tiempo de fermentación sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en bebidas de quinoa roja.
- Evaluar la resistencia a antibióticos de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en las muestras de bebida fermentadas a diferentes tiempos.
- Determinar los parámetros físico-químicos (ácidos orgánicos y azúcares, sólidos solubles totales, pH, acidez y color) y las propiedades antioxidantes y la concentración de polifenoles totales tras la fermentación de la bebida con *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* a diferentes tiempos durante 24 h de fermentación.
- Investigar el efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las bebidas de quinoa roja fermentadas durante 24 h sobre la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum*.
- Determinar las propiedades antioxidantes y los polifenoles totales de la bebida fermentada durante 24 h, tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Lactobacillus plantarum CECT 220 (ATCC 8014) y *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 4551 se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) en forma liofilizada. Para obtener el pre-inóculo, cada cepa bacteriana se resuspendió en 10 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck; Alemania) a 37 °C durante 24 h bajo condiciones aeróbicas para la cepa de *Lactobacillus*, y durante 48 h bajo condiciones anaeróbicas para la cepa de *Bifidobacterium*. Para obtener una densidad celular inicial aproximadamente de 10⁸ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), 1 mL de cada pre-inóculo se inoculó en 100 mL de caldo MRS y se incubaron entre 24-48 h a 37 °C. La biomasa se separó mediante centrifugación a 2000 g durante 10 min a 4 °C (Centrifuge C30P, B. Braun Biotech International), y se lavó dos veces tampón fosfato salino estéril (PBS) (Sigma; Madrid, España) para eliminar el caldo MRS residual. Una vez lavadas, se resuspendieron en PBS a una concentración de 8 Log UFC/mL aproximadamente y se almacenaron en 10% (v/v) de glicerol a -80 °C hasta su uso.

3.2.- Preparación y fermentación de la bebida

La bebida se preparó utilizando 150 g de quinoa roja de agricultura ecológica (Bio Cesta; Valencia, España). El cereal se trituró ligeramente con un molinillo de café (Taurus Aromatic, Grupo Taurus) durante unos segundos, y se cribó mediante un tamiz con una abertura de 0,991 mm (Cisa, Serie Tyler N°16; Barcelona, España). Los cereales triturados y tamizados se transfirieron a botellas de vidrio de borosilicato estériles con tapones de rosca de polipropileno, y se añadió 1 L de agua potable del grifo. Se preparó un total de 4 L. Las bebidas se pasteurizaron a 80 °C durante 20 minutos en un baño de agua (Unitronic 200, Selecta) y se enfriaron a 37 °C en un baño con hielo. Para la sacarificación, se añadió 0,1% (v/v) de la enzima α -amilasa (Sigma; Madrid, España) y se dejó actuar a 37 °C durante 24 h. Tras este tiempo, se pasteurizaron a 80 °C durante 20 minutos en un baño de agua para inactivar la enzima α -amilasa. Las bebidas se filtraron (Stomacher® 400 Circulator Bags) y se sometieron a un tratamiento a 80 °C durante 20 minutos en un baño de agua (Unitronic 200, Selecta). Se utilizaron 2 L de bebida para su fermentación y el resto se congeló a -20 °C para utilizarla como bebida control sin fermentación.

A una de las botellas con 1L de bebida se inoculó 1% (v/v) de *Lactobacillus plantarum*, y a la otra se inoculó 1% (v/v) de *Bifidobacterium longum subsp. Infantis*, que previamente habían sido centrifugados a 2000g durante 10 min a 4 °C (Centrifuge C30P, B. Braun Biotech International) para eliminar el glicerol residual. Una vez inoculados, se transfirieron las bebidas a frascos de polipropileno de alta transparencia estériles con tapón de polietileno (150 mL) (Deltalab; Barcelona, España). La fermentación se llevó a cabo a 37 °C durante 24 horas y a diferentes tiempos de fermentación: 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h. Se determinó la viabilidad de los microorganismos y se tomaron muestras que se congelaron a -20 °C para su uso en posteriores análisis físico-químicos y funcionales.

3.3.- Determinación de la viabilidad de los probióticos

La viabilidad de los probióticos *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum subsp. Infantis* en las bebidas fermentadas a diferentes tiempos se determinó mediante el método de recuento en placa. Se diluyeron alícuotas de 1 mL de cada muestra en 9

mL de agua de peptona estéril (Oxoid; Madrid, España). Se realizaron varias diluciones seriadas y se extendieron en placas con medio MRS Agar (Scharlau; Barcelona, España) para su recuento. Se incubaron bajo condiciones aeróbicas a 37 °C durante 48 h. Los resultados se expresaron como Log₁₀ unidades formadoras de colonias por mL de bebida (UFC/mL).

3.4.- Digestión *in vitro*

El ensayo de digestión *in vitro* se llevó a cabo mediante el procedimiento de Valero-Cases & Frutos (2017). Se realizó en las muestras fermentadas durante 24 h. Las muestras se sometieron a la digestión gastrointestinal simulada durante 180 min a 37 °C y en agitación. Se utilizó la proporción de bebida/PBS 1:10 (v/v), ajustando el pH a 2,5 con HCl 1 M (Panreac; Barcelona, España), y se agregó pepsina (3,5 g/L) (Sigma; Madrid, España) para llevar a cabo la digestión gástrica durante 60 min. Tras ello, se tomó muestra para determinar la supervivencia de los microorganismos y se inactivó la enzima en un baño con hielo para preparar la simulación de jugos intestinales. Para llevar a cabo la simulación intestinal se aumentó el pH a 7 con NaHCO₃ 1 M (Panreac; Barcelona, España) y se agregó 4,5 g/L de sales biliares y 1 g/L de pancreatina (Sigma, Madrid, España), y se incubaron durante 120 min a 37 °C. Para determinar la supervivencia de los microorganismos en la fase intestinal, se tomaron muestras a los 60 min y a los 120 min y se detuvieron las reacciones enzimáticas mediante inmersión de los recipientes en un baño con hielo.

La viabilidad de los microorganismos probióticos en las muestras se determinó mediante el método de recuento en placa descrito en el apartado 3.3.- Determinación de la viabilidad de los probióticos.

3.5.- Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos se realizó utilizando discos de antibióticos (Liofilchem, Italia). Se determinó la resistencia de 17 antibióticos en todas las muestras fermentadas a diferentes tiempos, así como en las muestras obtenidas de la digestión *in vitro*. Los 17 antibióticos fueron: ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), bacitracina (10 Unidades internacionales, UI), cefsulodina (30 µg), clindamicina (10 µg), cloranfenicol (10 µg), eritromicina (15 µg), estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (30 µg), neomicina (30 µg) novobiocina (5 µg), oxacilina (5 µg), penicilina G (10 UI), polimixina B (300 UI), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg).

Se utilizaron 100 µL de cada muestra, que se extendieron en placas con medio MRS Agar (Scharlau; Barcelona, España). Se incubaron bajo condiciones aeróbicas a 37 °C durante 48 h en una incubadora Raypa (Barcelona, España).

Los resultados se expresaron en función del diámetro de los halos de inhibición formados (mm).

3.6.- Extracción de compuestos bioactivos

Se llevó a cabo la extracción de compuestos bioactivos para la determinación de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en las bebidas fermentadas a diferentes tiempos, así como del control. Las extracciones se prepararon utilizándose como agente extractante una solución de metanol (Methanol de 99,9 % HPLC Gradient Grade J.T. Baker; Madrid, España), y empleándose una relación muestra/metanol 1:2 (v/v). A continuación, las mezclas se agitaron durante 7 minutos en un agitador magnético (Ovan, mod. MultiMix Heat D-MMH30E). Las muestras se centrifugaron a

15000g durante 15 min a 4 °C (Centrifuge C30P, B. Braun Biotech International). Los sobrenadantes se utilizaron para los análisis posteriores.

Las muestras de la digestión gastrointestinal *in vitro* se tomaron directamente en cada etapa de la digestión para su análisis.

3.7.- Extracción de ácidos orgánicos y azúcares

Para la extracción de ácidos orgánicos y azúcares las diferentes muestras de bebida se diluyeron con agua ultrapura con una relación muestra/agua 1:3 (v/v). Las mezclas se agitaron durante 7 minutos en un agitador magnético (Ovan, mod. MultiMix Heat D-MMH30E) y se centrifugaron a 15000g durante 15 min a 4 °C (Centrifuge C30P, B. Braun Biotech International). Los sobrenadantes se filtraron (0,45 µm; Millipore, España) y se almacenaron en viales de vidrio a -20 °C hasta su análisis.

3.8.- Determinaciones analíticas

3.8.1.- Propiedades antioxidantes

3.8.1.1.- Capacidad antioxidante: Método DPPH

La actividad de captación de radicales libres se determinó utilizando el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), siguiendo la metodología desarrollada por Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995), con algunas modificaciones. El radical DPPH (Sigma; Madrid, España) se preparó disolviendo 0,0035 g con 10 mL de metanol (Methanol de 99,9 % HPLC Gradient Grade J.T. Baker; Madrid, España). La solución se conservó en oscuridad durante 30 min y se ajustó la absorbancia a 1 en un espectrofotómetro (UV/Vis Spectrophotometer T80; PG Instruments Limited, UK) a $\lambda = 515$ nm. El blanco se preparó con metanol. La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 0,1631x + 0,108$ ($R^2 = 0,9999$), empleando Trolox 10 mM como patrón de referencia a diferentes concentraciones (0,5 - 4,00 mmol/L).

Para los ensayos, se utilizaron 100 µL de los distintos extractos y se adicionaron 900 µL de la solución DPPH. Se dejó reaccionar durante 10 min en oscuridad, y se midió la disminución de la absorbancia a 515 nm. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mmol de Trolox por 100 mililitros de bebida.

3.8.1.2.- Capacidad antioxidante: Método ABTS

El método de radicales cationes ABTS [2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] se realizó adoptando la metodología desarrollada por Re et al. (1999). El radical ABTS se preparó mezclando ABTS 7 mM (Sigma; Madrid, España) con persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ 2,45 mM (Sigma; Madrid, España) y se dejó reaccionar durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución se diluyó con agua ultrapura hasta ajustar su absorbancia a $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm en el espectrofotómetro (UV/Vis Spectrophotometer T80; PG Instruments Limited, UK). El blanco se obtuvo con agua ultrapura. La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 0,2137x + 0,064$ ($R^2 = 0,9553$), empleando Trolox 10 mM como patrón de referencia en distintas concentraciones (0,20 - 3,00 mmol/L).

Para los ensayos, se mezclaron 100 µL de los diferentes extractos con 900 µL de la solución ABTS, se dejó reaccionar durante 6 minutos en oscuridad, y se midió la absorbancia a 734 nm. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mmol de Trolox por 100 mililitros de bebida.

3.8.2.- Parámetros físico-químicos

3.8.2.1.- Ácidos orgánicos y azúcares

La identificación y cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos en todas las muestras de bebida fermentadas a diferentes tiempos se analizaron simultáneamente por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando un equipo Hewlett-Packard HPLC serie 1100 (Woldbronn, Alemania) equipado con una columna Supelcogel C-610H (30 cm x 7,8 mm) y una pre-columna Supelcoguard C-610H (5 cm x 4,6 mm) (Supelco, Sigma; Madrid, España).

Los ácidos orgánicos se midieron a 210 nm en ultravioleta-visible (UV-VIS) con detector de diodos (DAD G1315A). Para los azúcares se utilizó un detector de índice de refracción (G1362A RID). Como fase móvil se utilizó ácido ortofosfórico al 0,1% con un volumen de inyección de 10 µl y la velocidad de flujo de 0,5 mL/min en condiciones isocráticas. Las concentraciones se calcularon a través de curvas de calibración con los patrones para los azúcares (glucosa, fructosa sacarosa), y ácidos orgánicos (láctico, acético) (Sigma; Madrid, España). Los resultados fueron expresados como gramos por litro de bebida.

3.8.2.2.- Sólidos solubles totales

El contenido de sólidos solubles (SST) se determinó utilizando un refractómetro (Hanna®, modelo HI96812) previamente calibrado con agua destilada y utilizando directamente las muestras de bebida. Los resultados se expresaron como °Brix. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.8.2.3.- pH y acidez

El pH de las diferentes muestras de bebida se determinó por medio de un pH-metro (Crison, PH-meter GLP 21). Se tomaron directamente las muestras para su medida.

Para determinar la acidez titulable (TA), se realizó mediante una valoración con un reactivo básico, hidróxido de sodio NaOH 5 M. Para se tomaron 5,0 mL de bebida, y añadimos 0,5 mL de fenolftaleína (Fenolftaleína solución 1%, Panreac; Barcelona, España) como indicador. Se midió el volumen de NaOH vertido cuando el indicador viró a rosa. Los análisis se realizaron por triplicado. El índice de acidez se expresó como % de ácido láctico.

3.8.2.4.- Color

La determinación del color de las muestras de bebida se realizó con un colorímetro Minolta CR-300 Chroma Mether (Osaka, Japón), usando la escala L*, a*, b* (sistema CIELAB). En este sistema, la coordenada L* recibe el nombre de luminosidad o claridad y, puede tomar valores entre 0 (negro) y 100 (blanco). La a* define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad hacia el rojo si a* es positiva, y hacia el verde si a* es negativa. Análogamente la coordenada b* define la desviación hacia el amarillo si b* es positiva, y hacia el azul si b* es negativa (Francis, 1982).

También se calcularon el croma y el tono (C* y H*) que junto con la L* determinan las coordenadas cilíndricas del espacio CIELAB.

Los resultados instrumentales de color se expresaron como luminosidad L*, Chroma: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ y ángulo Hue: $H = \arctan(b^* / a^*) \times 180/3.14$.

3.8.2.5.- Polifenoles totales

Para la determinación del contenido de polifenoles totales, se empleó la metodología de Folin-Ciocalteu, siguiendo el método descrito por Singleton, Orthofer, Lamuela-Raventos, & Packer (1999). El reactivo de Folin se preparó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu; Merck, Alemania) y agua ultrapura, 1:10 (v/v). Se empleó ácido gálico 1 mM (Sigma; Madrid, España) como patrón de referencia en distintas concentraciones (0 - 4,725 mg/L). La ecuación de la recta de calibrado que se obtuvo fue $y = 0,1273x - 0,0361$ ($R^2 = 0,9978$).

Para los ensayos, se mezclaron 100 μ L de los diferentes extractos con 400 μ L de tampón fosfato 50 mM a pH 7,8. Se añadieron 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y tras agitar y reposar durante 2 min, se añadieron 2 mL de Na_2CO_3 (75 g/L). Se introdujeron en un baño termostático a 50 °C durante 10 min. Se midió la absorbancia a $\lambda = 760$ nm, y el blanco se preparó con 500 μ L de tampón fosfato 50 mM, 2,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na_2CO_3 . Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como mg ácido gálico por 100 mililitros de bebida.

3.9.- Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el software SPSS v 21.0 (SPSS Inc., Chicago-Illinois-USA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como la media \pm la desviación estándar. La comparación de medias se realizó con un análisis de varianza (ANOVA) y mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey. La diferencia significativa fue establecida como ($p < 0.05$).



4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Viabilidad de *L. plantarum* y *B. longum* durante la fermentación a diferentes tiempos

La Tabla 2 muestra a viabilidad de *L. plantarum* y *B. longum* a diferentes tiempos de fermentación en bebidas de quinoa roja. Ambos probióticos cultivados en este sustrato a base de quinoa roja mostraron buen crecimiento a un nivel de inoculación del 1% (v/v) y a una temperatura de incubación de 37 °C alcanzando, tras 24 h de fermentación, poblaciones de 9,82 Log₁₀ UFC/mL para *L. plantarum*, siendo superiores para *B. longum* (12,20 Log₁₀ UFC/mL).

Entre los diferentes tiempos de fermentación en la bebida fermentada con *L. plantarum* se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración de células viables a partir de las 6 h. Sin embargo, las bebidas con *B. longum*, mostraron diferencias significativas a lo largo de las 24 h de fermentación.

Las concentraciones de ambos microorganismos alcanzadas a partir de las 6h de fermentación en las bebidas fueron superiores al mínimo recomendado para un producto probiótico (6 Log₁₀ UFC/mL por mL o g de producto) (Sanders & Huis In't Veld, 1999).

Los valores de viabilidad de los microorganismos en las bebidas fermentadas a base de quinoa roja fueron similares a los observados en bebidas fermentadas de cereales con bacterias ácido-lácticas (Salmerón et al., 2015).

Tabla 2.- Viabilidad (Log UFC/mL) de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en bebidas de quinoa fermentadas en diferentes tiempos de fermentación a 37 °C^a.

Tiempo de fermentación (h)	Células viables (Log UFC/mL)	
	Bebida con <i>L. plantarum</i>	Bebida con <i>B. longum</i>
0	5,98 ± 0,02 a	5,38 ± 0,06 a
3	6,04 ± 0,07 a	5,71 ± 0,08 b
6	6,53 ± 0,09 b	6,49 ± 0,05 c
9	7,50 ± 0,03 c	6,96 ± 0,03 d
12	7,75 ± 0,09 d	7,54 ± 0,09 e
24	9,82 ± 0,08 e	12,20 ± 0,04 f

^a Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$).

4.2.- Metabolismo de azúcares

La Tabla 3 muestra el contenido de azúcares en las bebidas de quinoa a diferentes tiempos de fermentación. La glucosa es el azúcar presente en la concentración más alta en las bebidas (aprox. 9 g/L), mientras que la sacarosa y la fructosa se encontraron a bajas concentraciones (aprox. 0,3 g/L y 0,2 g/L, respectivamente).

Los resultados mostraron que, mientras que en la bebida control sin fermentar las concentraciones de azúcares se mantuvieron estables durante las 24 h, la concentración de cada uno de los azúcares fue disminuyendo durante la fermentación en las bebidas fermentadas con *L. plantarum* y *B. longum*. Tras 24 h de fermentación,

se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de sacarosa y glucosa con respecto a los valores iniciales al comienzo de la fermentación con ambos microorganismos. Se observó un descenso para los niveles de sacarosa que fue más rápido y significativo para *L. plantarum* tras 3 h de fermentación, mientras que para *B. longum* las diferencias fueron significativas tras 12 h. El consumo de glucosa comenzó a ser significativo para ambos microorganismos a partir de las 9 h de fermentación. El contenido en fructosa solo disminuyó significativamente para *L. plantarum* a partir de las 24 h, no observándose un descenso significativo en la bebida con *B. longum*.

Los resultados indican por lo tanto que, durante la fermentación, ambos probióticos tienen la capacidad de utilizar tanto el disacárido sacarosa, como los monosacáridos glucosa y fructosa, aunque de una forma más eficiente por parte de *L. plantarum*. Estas bacterias ácido-lácticas fermentan estos azúcares presentes en la bebida de quinoa y los transforman principalmente en ácidos orgánicos (Tabla 4).

Las bebidas a base de quinoa fueron por lo tanto un buen medio para mantener la supervivencia de *L. plantarum* y *B. longum*, conteniendo azúcares fermentables por estos microorganismos, y permitiendo mantener la concentración celular (Log 6-7 UFC/mL) por encima de la concentración recomendada para su efecto probiótico.

Tabla 3.- Contenido de azúcares en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos^a.

Azúcares	Tiempo de fermentación (h)	Bebidas de quinoa		
		Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>	Control (sin probiótico)
Sacarosa (g/L)	0	0,23 ± 0,01 aA	0,32 ± 0,07 aAB	0,352 ± 0,004 aB
	3	0,15 ± 0,03 bA	0,31 ± 0,01 aB	0,36 ± 0,03 aB
	6	0,15 ± 0,03 bA	0,31 ± 0,03 aB	0,34 ± 0,05 aB
	9	0,15 ± 0,03 bA	0,212 ± 0,002 abB	0,34 ± 0,02 aC
	12	0,101 ± 0,001 bcA	0,172 ± 0,001 bcB	0,351 ± 0,002 aC
	24	0,05 ± 0,02 cA	0,10 ± 0,08 cA	0,343 ± 0,001 aC
Glucosa (g/L)	0	8,66 ± 0,46 aA	8,96 ± 0,16 aA	9,97 ± 0,16 aB
	3	8,44 ± 0,33 aA	9,12 ± 0,10 aB	9,89 ± 0,08 aC
	6	7,29 ± 0,60 bA	9,10 ± 0,29 aB	9,96 ± 0,16 aB
	9	7,80 ± 0,33 abA	8,26 ± 0,03 bA	10,00 ± 0,10 aB
	12	7,90 ± 0,17 abA	8,25 ± 0,17 bA	9,98 ± 0,18 aB
	24	4,06 ± 0,51 cA	5,54 ± 0,18 cB	9,90 ± 0,20 aC
Fructosa (g/L)	0	0,18 ± 0,02 aA	0,172 ± 0,001 aA	0,18 ± 0,02 aA
	3	0,14 ± 0,03 aA	0,17 ± 0,02 aA	0,18 ± 0,02 aA
	6	0,17 ± 0,02 aA	0,16 ± 0,04 aA	0,18 ± 0,03 aA
	9	0,182 ± 0,001 aA	0,17 ± 0,05 aA	0,17 ± 0,02 aA
	12	0,17 ± 0,02 aA	0,15 ± 0,04 aA	0,18 ± 0,03 aA
	24	0,052 ± 0,001 bA	0,10 ± 0,03 aA	0,17 ± 0,02 aB

^a Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$). Media ± desviación estándar en la misma fila seguida de letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en ($p \leq 0,05$) entre las bebidas fermentadas durante el mismo tiempo ($n = 3$).

4.3.- Metabolismo de ácidos orgánicos

El ácido láctico y el ácido acético son los ácidos orgánicos que se encuentran mayoritariamente en las bebidas, siendo el ácido láctico el de mayor concentración, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.- Contenido de ácidos orgánicos en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos^a.

Ácidos orgánicos	Tiempo de fermentación (h)	Bebidas de quinoa		
		Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>	Control (sin probiótico)
Ácido láctico (g/L)	0	0,34 ± 0,02 aA	0,332 ± 0,001 aA	0,341 ± 0,001 aA
	3	0,34 ± 0,02 aA	0,35 ± 0,01 bA	0,332 ± 0,002 aA
	6	0,361 ± 0,001 abA	0,341 ± 0,002 abB	0,344 ± 0,001 aB
	9	0,39 ± 0,01 bcA	0,343 ± 0,005 abB	0,334 ± 0,001 aB
	12	0,401 ± 0,001 cA	0,40 ± 0,02 cA	0,342 ± 0,001 aB
	24	0,44 ± 0,02 dA	0,421 ± 0,002 dA	0,343 ± 0,002 aB
Ácido acético (g/L)	0	0,023 ± 0,010 aA	0,023 ± 0,001 aA	0,023 ± 0,010 aA
	3	0,025 ± 0,002 bA	0,025 ± 0,002 aA	0,023 ± 0,010 aB
	6	0,026 ± 0,001 bA	0,026 ± 0,001 aA	0,023 ± 0,010 aB
	9	0,028 ± 0,002 cA	0,028 ± 0,001 bA	0,023 ± 0,002 aB
	12	0,029 ± 0,001 cA	0,029 ± 0,002 bA	0,023 ± 0,001 aB
	24	0,030 ± 0,001 cA	0,030 ± 0,003 bA	0,023 ± 0,001 aB

^a Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$). Media ± desviación estándar en la misma fila seguida de letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en ($p \leq 0.05$) entre las bebidas fermentadas durante el mismo tiempo ($n = 3$).

Las concentraciones de ácido láctico y acético alcanzadas tras 24 h de fermentación no fueron significativamente diferentes entre las dos bebidas fermentadas con *L. plantarum* y *B. longum*, encontrándose diferencias significativas en la evolución de estos ácidos a lo largo de los diferentes tiempos de fermentación. Los resultados muestran un incremento más rápido en ácido láctico para *B. longum* respecto a *L. plantarum*, mientras que para ácido acético el incremento fue significativo para *L. plantarum* tras 3 h de fermentación y para *B. longum* no lo fue hasta después de 9 h de fermentación.

Durante la fermentación, los ácidos láctico y acético son principalmente los ácidos orgánicos producidos, aunque las cantidades de ácido acético (0,023 – 0,030 g/L) en las bebidas tras las 24 h de fermentación son más bajas que las de ácido láctico (0,33 – 0,44 g/L). Las proporciones inferiores de ácido acético registradas son una característica potencialmente favorable para las propiedades organolépticas de las bebidas fermentadas, ya que el ácido acético puede contribuir a una menor aceptación del sabor de dichas bebidas.

El valor mínimo al cual el ácido acético se detecta organolépticamente es de 0,4 g/L (Siebert, 1999). Así, estas bebidas de quinoa fermentadas con *L. plantarum* y *B. longum* tienen valores de ácido acético que no exceden las concentraciones que

producen ese sabor desagradable “avinagrado” en el producto final. La presencia de ácido láctico en bebidas fermentadas es más deseable, ya que se ha descrito que abarca un atributo de sabor de “ácido agridulce” (Stroehle, Zweytick, & Berghofer, 2006).

Las cantidades de ácido láctico y ácido acético detectadas en estas bebidas fermentadas fueron más bajas que los valores reportados en las bebidas de avena, malta y cebada fermentadas con cepas de lactobacilos (Salmerón et al., 2015).

4.4.- Parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos analizados (pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, color L^* , a^* , b^* , C^* , H^* y polifenoles totales) en cada bebida fermentada a diferentes tiempos se muestran en la Tabla 5.

Los valores de pH de estas bebidas experimentaron un descenso de 4,3 a 3,4, que son más bajos que los reportados en productos lácteos probióticos y productos a base de soja (4,3 a 4,5) y similares a los observados en otros cereales fermentados (3,5 a 4,0) (Farnworth et al., 2007). En las bebidas fermentadas, el pH es importante para determinar la estabilidad microbiológica frente a los patógenos transmitidos por los alimentos, y está directamente relacionado con el sabor de los productos. Se ha informado que un pH por debajo de 3,8 inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias alterantes de los alimentos (Battey, Duffy, & Schaffner, 2001).

Conforme aumenta el tiempo de fermentación de las bebidas, el pH disminuye como consecuencia de la producción de ácidos orgánicos, sobre todo ácido láctico y acético, debido al metabolismo de los azúcares. A las 24 h de fermentación se obtienen valores de pH inferiores a 4, observando diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en las bebidas fermentadas con *L. plantarum* y *B. longum* respecto a los valores iniciales a partir de las 3 h de fermentación. Sin embargo, es necesario un tiempo mínimo de 24 h de fermentación para obtener valores de pH que garantice la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes.

Respecto a la acidez titulable, como muestran los resultados en la Tabla 5, aumenta para ambas bebidas durante la fermentación, aunque los incrementos no son significativos hasta transcurridas 12 h. En la bebida fermentada con *L. plantarum* el mayor incremento de acidez titulable entre las 12 y 24 h de fermentación está relacionado con el aumento significativo de la concentración de ácido láctico entre las 12 y 24 h de fermentación. A las 24 h de fermentación, se observaron diferencias significativas entre ambas bebidas, alcanzado mayor acidez titulable la bebida fermentada con *L. plantarum*.

Los porcentajes de acidez titulable registrados en las bebidas, entre 0,3 a 0,6 fueron superiores a los registrados en otras bebidas fermentadas de malta, cebada y avena (0,04 – 0,12) (Salmerón et al., 2015), pero son comparables a los reportados en productos lácteos con probióticos (0,44 – 0,63) (Gomes, Malcata, & Klaver, 1998). Las diferencias en los valores de acidez se deben a las distintas cantidades de azúcares disponibles dentro de los sustratos, que son transformados principalmente en ácidos orgánicos por las bacterias ácido-lácticas, aumentando la acidez y disminuyendo el pH.

Los valores de los sólidos solubles totales (rango 4,3 – 6,3) disminuyen con el tiempo de fermentación, al igual que la concentración de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa. Estos valores en las bebidas de quinoa fueron muy superiores a los obtenidos en otras bebidas fermentadas con probióticos a base de cereales como avena, malta y cebada (3,10 – 0,40) (Salmerón et al., 2015).

El color de las muestras de las bebidas se expresa usando la escala L^* , a^* , b^* (sistema CIELAB). La coordenada L^* , recibe el nombre de luminosidad y toma valores entre 0 (negro) y 100 (blanco). La a^* tiende hacia el rojo si a^* es positiva, y hacia el verde si a^* es negativa. Análogamente la coordenada b^* define la desviación hacia el amarillo si b^* es positiva, y hacia el azul si b^* es negativa (Francis, 1982).

Respecto a L^* , en todas las bebidas este valor se acerca a 100, durante la fermentación, indicando una tendencia a un color blanco “similar a la leche”. En cuanto a la coordenada a^* , a partir de las 3 h de fermentación, se observa un incremento en los valores de a^* siendo positivos hasta las 24 h de fermentación en ambas bebidas fermentadas con *L. plantarum* y *B. longum*, por lo que el color tiende a rojo. Los valores de la coordenada b^* a todos los tiempos de fermentación es positiva por lo el color se intensifica hacia el amarillo. Así, el color de las bebidas se aproxima a rojizo-amarillento, debido al color de los granos de quinoa roja. Además, es un color bastante claro, ya que L^* toma valores entre 93 y 100.

En cuanto al tono, H^* , este parámetro varía entre 0 y 360° y para los estímulos acromáticos ($a^* = b^* = 0$) es una magnitud indefinida. En ambas bebidas, se observan valores de H^* que se aproximan a 0 y 360° (color rojo/púrpura) a todos los tiempos de fermentación, como consecuencia del color de los granos de la quinoa roja utilizados para hacer la bebida. Respecto a la intensidad de color C^* , este parámetro toma el valor 0 para estímulos acromáticos y normalmente no pasa de 150, aunque puede superar valores de 1000 para estímulos monocromáticos. Tanto en la bebida fermentada con *L. plantarum* como con *B. longum*, los valores decrecen con respecto al tiempo inicial de fermentación a partir de las 3 h de fermentación, siendo la reducción al final de la fermentación del 59 % para *L. plantarum* y del 62 % para *B. longum*, no observándose diferencias para las bebidas para los mismos tiempos de fermentación.

Como se muestra en la Tabla 5, los polifenoles totales, expresados como mg de ácido gálico/100 mL de bebida, disminuyen con el tiempo de fermentación. A partir de las 3 h de fermentación se observa un descenso significativo en la concentración de polifenoles totales con respecto a los valores iniciales a las 0 h en ambas bebidas fermentadas con *L. plantarum* y *B. longum*. Las cantidades obtenidas en estas bebidas de quinoa (rango 4,40 – 2,70) son similares al contenido de polifenoles totales en bebidas probióticas de leche de soja, leche de almendras y leche de coco (Chavan, Gat, Harmalkar, & Waghmare, 2018). El descenso en el contenido de polifenoles indica una utilización metabólica de estos compuestos por parte de las bacterias probióticas *L. plantarum* y *B. longum* sugiriendo un potencial efecto prebiótico de los polifenoles sobre estos microorganismos (Valero-Cases, Nuncio-Jauregui, & Frutos, 2017).

Tabla 5.- Parámetros físico-químicos (pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, color L^* , a^* , b^* , C^* , H^* y polifenoles totales) en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos ^a.

Parámetros	Tiempo de fermentación (h)	Bebidas de quinoa		
		Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>	Control (sin probiótico)
pH	0	4,26 ± 0,01 aA	4,37 ± 0,01 aB	4,20 ± 0,01 aC
	3	4,18 ± 0,01 bA	4,32 ± 0,02 bB	4,17 ± 0,06 aA
	6	4,18 ± 0,01 bA	4,24 ± 0,01 cB	4,21 ± 0,02 aAB
	9	4,18 ± 0,01 bA	4,16 ± 0,02 dA	4,21 ± 0,01 aB
	12	4,16 ± 0,01 bA	4,14 ± 0,01 dA	4,22 ± 0,06 aA
	24	3,45 ± 0,02 cA	3,37 ± 0,01 eB	4,20 ± 0,05 aC

Acidez titulable ^b	0	0,30 ± 0,05 aA	0,30 ± 0,05 aA	0,34 ± 0,01 aA
	3	0,36 ± 0,01 aA	0,36 ± 0,01 aA	0,35 ± 0,01 aA
	6	0,36 ± 0,01 aA	0,36 ± 0,02 aA	0,341 ± 0,002 aA
	9	0,39 ± 0,05 abA	0,36 ± 0,01 aA	0,343 ± 0,001 aA
	12	0,48 ± 0,05 bA	0,51 ± 0,05 bA	0,35 ± 0,01 aB
	24	0,66 ± 0,05 cA	0,60 ± 0,05 bA	0,35 ± 0,02 aB
Sólidos solubles totales (°Brix)	0	5,57 ± 0,15 aA	6,26 ± 0,06 aB	6,25 ± 0,05 aB
	3	4,83 ± 0,06 bA	5,70 ± 0,17 bB	6,25 ± 0,05 aC
	6	4,73 ± 0,06 bcA	5,77 ± 0,06 bB	6,26 ± 0,04 aC
	9	4,60 ± 0,10 bcdA	5,53 ± 0,06 bcB	6,26 ± 0,04 aC
	12	4,53 ± 0,11 cdA	5,37 ± 0,06 cB	6,27 ± 0,03 aC
	24	4,37 ± 0,06 dA	5,27 ± 0,25 cB	6,23 ± 0,06 aC
L*	0	99,01 ± 0,24 aA	101,28 ± 0,23 aB	97,01 ± 0,03 aC
	3	97,54 ± 0,05 bA	96,53 ± 0,36 bB	97,00 ± 0,04 aB
	6	93,74 ± 0,02 cA	96,89 ± 0,13 bB	97,04 ± 0,06 aB
	9	97,06 ± 0,07 dA	100,13 ± 0,50 cB	96,98 ± 0,08 aA
	12	91,36 ± 0,28 eA	93,63 ± 0,36 dB	97,01 ± 0,03 aC
	24	96,98 ± 0,01 dA	100,31 ± 0,01 cB	97,01 ± 0,03 aA
a*	0	-0,90 ± 0,03 aA	-1,53 ± 0,05 aB	0,18 ± 0,08 aC
	3	0,54 ± 0,02 bA	0,22 ± 0,02 bB	0,19 ± 0,02 aB
	6	0,73 ± 0,06 cA	0,28 ± 0,02 bB	0,16 ± 0,01 aB
	9	0,21 ± 0,04 dA	0,03 ± 0,03 cB	0,20 ± 0,01 aA
	12	0,67 ± 0,05 cA	0,22 ± 0,03 bB	0,21 ± 0,04 aB
	24	0,19 ± 0,06 dA	0,26 ± 0,06 bA	0,16 ± 0,05 aA
b*	0	1,77 ± 0,01 aA	1,78 ± 0,07 aA	1,79 ± 0,02 aA
	3	1,92 ± 0,01 bA	1,73 ± 0,03 aB	1,77 ± 0,06 aB
	6	1,78 ± 0,05 aA	1,76 ± 0,02 aA	1,77 ± 0,01 aA
	9	1,76 ± 0,02 aA	1,28 ± 0,22 bB	1,77 ± 0,02 aA
	12	1,25 ± 0,03 cA	1,41 ± 0,05 bB	1,76 ± 0,02 aC
	24	1,76 ± 0,02 aA	1,79 ± 0,04 aA	1,78 ± 0,03 aA
C*	0	4,27 ± 0,01 aA	4,76 ± 0,06 aA	1,80 ± 0,01 aB
	3	1,99 ± 0,01 bA	1,77 ± 0,03 bB	1,71 ± 0,05 aB
	6	1,92 ± 0,02 bA	1,78 ± 0,01 bB	1,77 ± 0,02 aB
	9	1,77 ± 0,02 cA	1,28 ± 0,21 cB	1,78 ± 0,02 aA
	12	1,41 ± 0,01 dA	1,43 ± 0,04 cA	1,78 ± 0,03 aB
	24	1,77 ± 0,02 cA	1,82 ± 0,04 bA	1,78 ± 0,02 aA
H* ^c	0	359,47 ± 0,02 aA	359,13 ± 0,03 aA	0,11 ± 0,05 aB
	3	0,32 ± 0,01 bA	0,13 ± 0,01 bB	0,11 ± 0,01 aB
	6	0,45 ± 0,04 bA	0,17 ± 0,01 bB	0,09 ± 0,04 aC
	9	0,12 ± 0,03 cA	359,65 ± 0,56 aB	0,12 ± 0,02 aA
	12	0,42 ± 0,03 bA	0,14 ± 0,02 bB	0,13 ± 0,02 aB
	24	0,11 ± 0,03 cA	359,79 ± 0,04 aB	0,09 ± 0,03 aA
Polifenoles totales ^d	0	4,40 ± 0,16 aA	3,77 ± 0,21 aA	3,79 ± 0,23 aA
	3	3,28 ± 0,08 bA	2,10 ± 0,08 bB	3,71 ± 0,43 aC
	6	4,39 ± 0,17 aA	2,12 ± 0,08 bB	3,58 ± 0,18 aC
	9	3,83 ± 0,63 abA	2,26 ± 0,19 bB	3,85 ± 0,08 aC

12	3,83 ± 0,63 abA	2,65 ± 0,43 bB	3,66 ± 0,50 aA
24	3,62 ± 0,09 abA	2,68 ± 0,20 bB	3,77 ± 0,22 aA

^a Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$). Media ± desviación estándar en la misma fila seguida de letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en ($p \leq 0.05$) entre las bebidas fermentadas durante el mismo tiempo ($n = 3$).

^b La acidez titulable se expresa como % de ácido láctico.

^c El tono (H^+) se expresa en grados ($^{\circ}$).

^d Los polifenoles totales se expresan como mg de ácido gálico/100 mL de bebida.

4.5.- Resistencia a antibióticos

En la Tabla 6 y Tabla 7 se muestra la resistencia de los probióticos *L. plantarum* y *B. longum* de las bebidas fermentadas a diferentes tiempos de fermentación a los 17 antibióticos estudiados, en función de los halos de inhibición formados (en mm).

Tabla 6.- Resistencia a antibióticos del probiótico *L. plantarum* en las bebidas de quinoa a cada tiempo de fermentación^a.

Antibióticos	Halo de inhibición (mm)					
	Bebida con <i>L. plantarum</i> a cada tiempo de fermentación					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Ácido nalidíxico (30 µg)	10,33 ± 1,53	10,00 ± 1,00	9,83 ± 0,58	9,63 ± 0,58	9,63 ± 0,58	9,63 ± 0,58
Ampicilina (10 µg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Bacitracina (10 UI)	5,33 ± 0,57	5,67 ± 0,57	4,67 ± 0,57	4,33 ± 0,57	4,67 ± 0,57	4,33 ± 0,57
Cefsulodina (30 µg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Clindamicina (10 µg)	10,33 ± 0,58	10,00 ± 1,00	9,67 ± 0,58	9,67 ± 0,58	9,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58
Cloranfenicol (10 µg)	9,67 ± 0,58	9,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58
Eritromicina (15 µg)	10,67 ± 0,57	10,67 ± 0,57	10,33 ± 0,57	10,33 ± 0,57	10,33 ± 0,57	10,33 ± 0,57
Estreptomina (10 µg)	2,67 ± 0,58	2,33 ± 0,58	2,68 ± 0,58	NS	NS	NS
Gentamicina (10 µg)	10,50 ± 0,50	10,83 ± 0,28	3,67 ± 0,58	1,67 ± 0,58	1,17 ± 0,76	1,17 ± 0,76
Kanamicina (30 µg)	3,67 ± 0,57	3,67 ± 0,57	3,33 ± 0,57	NS	NS	NS
Neomicina (30 µg)	4,67 ± 0,57	4,00 ± 0,01	3,67 ± 0,57	2,33 ± 0,57	2,33 ± 0,57	3,67 ± 0,57
Novobiocina (5 µg)	8,67 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,67 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57
Oxacilina (5 µg)	8,67 ± 0,57	8,67 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57
Penicilina G (10 UI)	7,83 ± 0,57	7,67 ± 0,57	8,00 ± 0,01	7,67 ± 0,02	8,00 ± 0,01	7,67 ± 0,02
Polimixina B (300 UI)	1,83 ± 0,29	2,33 ± 0,57	1,17 ± 0,76	NS	NS	NS
Tetraciclina (30 µg)	8,67 ± 0,57	8,67 ± 0,57	8,33 ± 0,58	5,33 ± 0,58	4,67 ± 0,58	NS
Vancomicina (30 µg)	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^a Media \pm desviación estándar. NS: No susceptible.

L. plantarum presenta resistencia a los antibióticos ampicilina (10 μ g), cefsulodina (30 μ g), y vancomicina (30 μ g) en todas las bebidas fermentadas a diferentes tiempos. Sin embargo, *L. plantarum* es resistente a los antibióticos estreptomina (10 μ g), kanamicina (30 μ g), y polimixina B (300 UI) solo en las bebidas fermentadas a partir de 9 h. Además, a las 24 h de fermentación se observa resistencia a la tetraciclina (30 μ g). La resistencia a la gentamicina (10 μ g) va aumentando conforme se incrementa el tiempo de fermentación, disminuyendo el halo de inhibición, pero sin llegar a ser no susceptible.

Los mayores halos de inhibición para *L. plantarum* (rango 8 – 10 mm) a todos los tiempos de fermentación se obtienen para los antibióticos ácido nalidíxico (30 μ g), clindamicina (10 μ g), cloranfenicol (10 μ g), eritromicina (15 μ g), novobiocina (5 μ g), oxacilina (5 μ g), y penicilina G (10 UI), presentando *L. plantarum* mayor susceptibilidad. En el caso de la bacitracina (10 UI) y la neomicina (30 μ g), los halos de inhibición son más pequeños (rango 2 – 5 mm), siendo menor la susceptibilidad.

Tabla 7.- Resistencia a antibióticos del probiótico *B. longum* en las bebidas de quinoa a cada tiempo de fermentación^a.

Antibióticos	Halo de inhibición (mm)					
	Bebida con <i>B. longum</i> a cada tiempo de fermentación					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Ácido nalidíxico (30 μ g)	10,67 \pm 0,57	10,67 \pm 0,57	9,83 \pm 0,58	10,00 \pm 1,00	9,83 \pm 0,58	9,63 \pm 0,58
Ampicilina (10 μ g)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Bacitracina (10 UI)	4,33 \pm 0,57	4,67 \pm 0,57	3,67 \pm 0,57	4,33 \pm 0,57	2,33 \pm 0,57	4,33 \pm 0,57
Cefsulodina (30 μ g)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Clindamicina (10 μ g)	10,33 \pm 0,58	10,67 \pm 0,57	10,00 \pm 1,00	9,67 \pm 0,58	10,00 \pm 1,00	9,33 \pm 0,58
Cloranfenicol (10 μ g)	10,00 \pm 1,00	9,67 \pm 0,58	9,33 \pm 0,58	9,33 \pm 0,58	9,33 \pm 0,58	9,33 \pm 0,58
Eritromicina (15 μ g)	10,67 \pm 0,57	10,67 \pm 0,57	10,67 \pm 0,57	10,33 \pm 0,57	10,33 \pm 0,57	10,33 \pm 0,57
Estreptomina (10 μ g)	2,67 \pm 0,58	1,17 \pm 0,76	NS	NS	NS	NS
Gentamicina (10 μ g)	5,67 \pm 0,58	6,67 \pm 0,58	4,33 \pm 0,58	2,33 \pm 0,58	1,17 \pm 0,76	2,33 \pm 0,58
Kanamicina (30 μ g)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Neomicina (30 μ g)	3,67 \pm 0,57	4,67 \pm 0,57	4,67 \pm 0,57	5,33 \pm 0,57	3,67 \pm 0,57	3,67 \pm 0,57
Novobiocina (5 μ g)	8,67 \pm 0,57	8,67 \pm 0,57	8,67 \pm 0,57	8,33 \pm 0,57	8,33 \pm 0,57	8,33 \pm 0,57
Oxacilina (5 μ g)	8,67 \pm 0,57	8,67 \pm 0,57	8,67 \pm 0,57	8,67 \pm 0,57	8,33 \pm 0,57	8,33 \pm 0,57
Penicilina G (10 UI)	8,67 \pm 0,57	8,67 \pm 0,57	8,00 \pm 0,01	8,00 \pm 0,01	8,00 \pm 0,01	7,67 \pm 0,02
Polimixina B (300 UI)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tetraciclina (30 μ g)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Vancomicina (30 μ g)	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^a Media \pm desviación estándar. NS: No susceptible.

B. longum presenta resistencia a los antibióticos ampicilina (10 μ g), cefsulodina (30 μ g), kanamicina (30 μ g), polimixina B (300 UI), tetraciclina (30 μ g) y vancomicina (30 μ g) en todas las bebidas fermentadas a diferentes tiempos. Sin embargo, *B. longum* es resistente al antibiótico estreptomina (10 μ g) solo en las bebidas fermentadas a partir de 6 h.

Los mayores halos de inhibición (rango 8 – 10 mm) en todos los tiempos de fermentación se obtienen para los antibióticos ácido nalidíxico (30 μ g), clindamicina (10 μ g), cloranfenicol (10 μ g), eritromicina (15 μ g), novobiocina (5 μ g), oxacilina (5 μ g), y penicilina G (10 UI), presentando *B. longum* mayor susceptibilidad, como *L. plantarum*. En el caso de la bacitracina (10 UI), gentamicina (10 μ g), y neomicina (30 μ g), los halos de inhibición son más pequeños (rango 2 – 5 mm), siendo menor la susceptibilidad.

Por tanto, las bebidas fermentadas con *B. longum* a cualquier tiempo de fermentación podrían ser mucho más eficaces en el restablecimiento de la flora intestinal durante y después de terapias de tratamiento con determinados antibióticos, respecto a *L. plantarum*, dado que el probiótico *B. longum* es resistente a un mayor rango de antibióticos.

4.6.- Capacidad antioxidante

Se utilizaron dos métodos diferentes para proporcionar una estimación de la capacidad antioxidante a cada tiempo de fermentación de las bebidas (Tabla 8). Los valores de capacidad antioxidante determinada mediante el método ABTS fueron superiores a los obtenidos con el método DPPH en todas las bebidas fermentadas.

Tabla 8.- Capacidad antioxidante en las bebidas de quinoa fermentadas a diferentes tiempos^a.

		mmol Trolox / 100 mL		
		Bebidas de quinoa		
	Tiempo de fermentación (h)	Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>	Control (sin probiótico)
DPPH	0	1,31 \pm 0,23 aA	2,52 \pm 0,18 aA	1,63 \pm 0,97 aA
	3	0,96 \pm 0,23 aA	2,10 \pm 0,08 abA	1,75 \pm 0,89 aA
	6	1,04 \pm 0,07 aA	2,12 \pm 0,08 abB	1,81 \pm 0,57 aB
	9	0,91 \pm 0,21 aA	1,81 \pm 0,80 abB	1,63 \pm 0,87 aAB
	12	0,96 \pm 0,17 aA	1,64 \pm 0,06 abA	1,76 \pm 0,92 aA
	24	0,84 \pm 0,12 aA	1,31 \pm 0,41 bA	1,53 \pm 0,70 aA
ABTS	0	3,08 \pm 0,23 aA	3,78 \pm 0,31 aB	3,83 \pm 0,21 aB
	3	2,93 \pm 0,45 aA	4,00 \pm 0,09 aB	3,89 \pm 0,16 aB
	6	2,93 \pm 0,45 aA	4,01 \pm 0,27 aB	3,80 \pm 0,30 aB
	9	2,93 \pm 0,45 aA	4,07 \pm 0,20 aB	3,96 \pm 0,08 aB
	12	2,93 \pm 0,45 aA	3,90 \pm 0,30 aB	3,75 \pm 0,23 aB
	24	3,20 \pm 0,30 aA	3,50 \pm 0,17 aA	3,71 \pm 0,44 aA

^a Media \pm desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$). Media \pm desviación estándar en la misma fila seguida de letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en ($p \leq 0.05$) entre las bebidas fermentadas durante el mismo tiempo ($n = 3$).

Los valores de capacidad antioxidante registrados con el método ABTS tanto para las bebidas fermentadas con *L. plantarum*, como con *B. longum*, no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de fermentación, pero sí se muestran diferencias estadísticamente significativas entre las bebidas fermentadas con diferente probiótico. Las bebidas de quinoa con *B. longum* presentan valores más altos de capacidad antioxidante expresada en mmol Trolox por 100 mL de bebida respecto a las fermentadas con *L. plantarum* durante las primeras 12 h de fermentación.

En cuanto a los valores de capacidad antioxidante registrados con el método DPPH para la bebida fermentada con *L. plantarum* se observó un descenso durante la fermentación que no llegó a ser significativo tras 24 h de fermentación respecto a los valores iniciales. Para la bebida de quinoa con *B. longum* se observó una disminución significativa en la capacidad antioxidante (DPPH) tras 24 h de fermentación. Además, en la bebida de quinoa con *B. longum* la disminución de polifenoles fue también mayor (reducción del 29 %) que para la bebida con *L. plantarum* (reducción del 17 %), por lo que este descenso en la capacidad antioxidante podría estar relacionada con la disminución en la concentración de polifenoles.

La capacidad antioxidante suele atribuirse a los fitoquímicos liberados durante la fermentación y también a los péptidos bioactivos formados como resultado de la actividad proteolítica, que tienen la capacidad de donar electrones y protones para neutralizar los radicales libres que están involucrados en una variedad de procesos fisiológicos y patogénicos que incluyen transducción de señalización celular, proliferación celular, diferenciación, apoptosis y muchos trastornos neurodegenerativos (Masisi, Beta, & Moghadasian, 2016).

En uno de los estudios, se atribuyeron las actividades antioxidantes en la quinoa fermentada por *L. plantarum* durante 24 h a los péptidos de cadena corta (<9 kDa) (Rizzello et al., 2017). Aunque existe una falta de información sobre los granos fermentados de quinoa que utilizan *Bifidobacterium* spp., los resultados de diversos estudios muestran que son comparables a los obtenidos con las especies de lactobacilos (Ayyash, Johnson, Liu, Al-Mheiri, & Abushelaibi, 2018). Además, en otro de los estudios se observó una contribución importante de la concentración de los polifenoles en la capacidad antioxidante de bebidas de granada fermentadas con probióticos (Valero-Cases, Nuncio-Jauregui, et al., 2017).

4.7.- Digestión *in vitro*

4.7.1.- Viabilidad de *L. plantarum* y *B. longum* tras la digestión *in vitro*

La Tabla 9 muestra las concentraciones de células viables de las bebidas fermentadas durante 24 h que se han sometido a la digestión *in vitro* gástrica e intestinal (60 y 120 min). En la bebida fermentada con *L. plantarum*, antes de la digestión *in vitro* los valores de recuento obtenidos eran $9,82 \pm 0,08$ Log UFC/mL (Tabla 2). Así, tras la digestión gástrica disminuye el número de células viables en un 34 %, aunque todavía se mantiene a altas concentraciones. Tras la digestión intestinal de 1 h se obtienen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) con respecto a las células viables tras la digestión gástrica, disminuyendo su valor en un 41% con respecto a la concentración inicial antes de la digestión. Sin embargo, no se observan diferencias entre el número de células viables tras la digestión intestinal de 2 h de duración. Las concentraciones finales se aproximan a 6 Log UFC/mL, por lo que tras tres horas de

simulación en jugos gatrointestinales, permanecerá en concentraciones suficientes para ejercer un efecto probiótico beneficioso para la salud.

En la bebida fermentada con *B. longum*, antes de la digestión *in vitro* los valores de recuento obtenidos fueron de $12,20 \pm 0,04$ Log UFC/mL (Tabla 2). Tras la digestión gástrica también disminuye el número de células viables en un 32 %, aunque se mantiene a altas concentraciones (8 Log UFC/mL). Tras la digestión intestinal de 1 h no se obtienen diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células viables tras la digestión gástrica. Sin embargo, se obtienen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre el número de células viables tras la digestión intestinal de 2 h de duración, disminuyendo el número de células viables en un 53 % con respecto a la concentración inicial antes de la digestión. Las concentraciones finales tras 3 horas de digestión gatrointestinal se aproximan a 6 Log UFC/mL, que son concentraciones muy elevadas de este microorganismo que se podrían encontrar a nivel del colon y que serían adecuadas para ejercer un efecto beneficioso en el huésped.

Tabla 9.- Viabilidad (Log UFC/mL) de *L. plantarum* y *B. longum* en bebidas de quinoa fermentadas 24 h tras la digestión *in vitro*^a.

Digestión <i>in vitro</i>	Células viables (Log UFC/mL)	
	Bebidas de quinoa fermentadas 24 h	
	Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>
Sin digestión	9,82 ± 0,08 a	12,20 ± 0,04 a
Gástrica	6,48 ± 0,02 b	8,28 ± 0,14 b
Intestinal 1 h	5,77 ± 0,23 c	8,03 ± 0,20 b
Intestinal 2 h	5,84 ± 0,33 c	5,77 ± 0,23 c

^a Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$).

4.7.2.- Polifenoles totales

La concentración de polifenoles totales en las bebidas de quinoa fermentadas durante 24 h que son sometidas a digestión *in vitro* se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10.- Concentración de polifenoles totales en las bebidas de quinoa fermentadas 24 h tras la digestión *in vitro*^a.

	Digestión <i>in vitro</i>	Bebidas de quinoa fermentadas 24 h	
		Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>
Polifenoles totales ^b	Gástrica	3,14 ± 0,35 a	3,17 ± 0,70 a
	Intestinal 1 h	4,12 ± 0,13 b	4,16 ± 0,64 a
	Intestinal 2 h	4,08 ± 0,31 b	3,56 ± 0,11 a

^a Media ± desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$).

^b Los polifenoles totales se expresan como mg de ácido gálico/100 mL de bebida.

En la bebida fermentada con *L. plantarum* la concentración de polifenoles totales se mantiene estable en las condiciones gástricas. Sin embargo, se produce un aumento

de la concentración de los polifenoles totales tras la digestión intestinal de 1 h que se mantiene estable durante la digestión intestinal de 2 h. Este incremento será debido al metabolismo de los compuestos fenólicos de *L. plantarum* en las condiciones de digestión intestinal (pH neutro, presencia de enzimas pancreáticos y sales biliares).

En el caso de la bebida fermentada con *B. longum* la concentración de polifenoles totales se mantiene estable en todas las condiciones, tanto gástricas como intestinales.

Así, los compuestos fenólicos derivados del metabolismo microbiano derivados de la fermentación de quinoa roja y la alta viabilidad de los microorganismos que alcanzan el colon puede contribuir al mantenimiento de la salud intestinal. Es necesaria mayor investigación para conocer cuáles son los metabolitos fenólicos y poder comprender el mecanismo de acción de esos metabolitos microbianos a nivel fisiológico en los humanos.

4.7.3.- Capacidad antioxidante

Se utilizaron dos métodos diferentes para proporcionar una estimación de la capacidad antioxidante a cada tiempo de fermentación de las bebidas (Tabla 11).

En las bebidas fermentadas con *L. plantarum* se observó que la capacidad antioxidante se mantenía estable durante el período de digestión gástrica e intestinal, y los valores eran similares a la capacidad antioxidante en la bebida fermentada durante 24 h sin digestión *in vitro* ($0,84 \pm 0,12$ mmol de Trolox/100 mL, Tabla 8), para el ensayo DPPH. Para el ensayo ABTS, durante el período de digestión gástrica la capacidad antioxidante disminuye con respecto a la observada en bebida fermentada durante 24 h sin digestión *in vitro* ($3,20 \pm 0,30$ mmol de Trolox/100 mL, Tabla 8). Sin embargo, se produce un aumento en la capacidad antioxidante en condiciones de digestión intestinal con cambios significativos durante las 2 h de digestión intestinal. Este aumento podría deberse a las condiciones intestinales (pH neutro, presencia de enzimas pancreáticos y sales biliares), que conllevarían a una mejora en la liberación de compuestos bioactivos.

Tabla 11.- Capacidad antioxidante en las bebidas de quinoa fermentadas 24 h tras la digestión *in vitro*^a.

		mmol Trolox / 100 mL	
		Bebidas de quinoa fermentadas 24 h	
	Digestión <i>in vitro</i>	Con <i>L. plantarum</i>	Con <i>B. longum</i>
DPPH	Gástrica	$1,02 \pm 0,45$ a	$0,32 \pm 0,16$ a
	Intestinal 1 h	$1,04 \pm 0,46$ a	$0,51 \pm 0,40$ a
	Intestinal 2 h	$1,07 \pm 0,30$ a	$0,51 \pm 0,30$ a
ABTS	Gástrica	$1,11 \pm 0,01$ a	$1,10 \pm 0,16$ a
	Intestinal 1 h	$5,86 \pm 0,18$ b	$5,73 \pm 0,10$ b
	Intestinal 2 h	$5,56 \pm 0,08$ c	$5,80 \pm 0,18$ b

^a Media \pm desviación estándar en la misma columna seguida de letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) para cada bebida fermentada a diferentes tiempos ($n = 3$).

En las bebidas fermentadas con *B. longum* se observó que la capacidad antioxidante se mantenía estable durante el período de digestión gástrica e intestinal, pero los valores medidos en mmol de Trolox por 100 mL de bebida eran menores a la

capacidad antioxidante en la bebida fermentada durante 24 h sin digestión *in vitro* ($1,31 \pm 0,41$ mmol de Trolox/100 mL, Tabla 8), para el ensayo DPPH. Para el ensayo ABTS, durante el período de digestión gástrica la capacidad antioxidante disminuye con respecto a la observada en bebida fermentada durante 24 h sin digestión *in vitro* ($3,50 \pm 0,17$ mmol de Trolox/100 mL, Tabla 8). Sin embargo, se produce un aumento en la capacidad antioxidante en condiciones de digestión intestinal sin cambios significativos durante las 2 h de digestión intestinal. Al igual que en la bebida con *L. plantarum*, este aumento podría ser debido a las condiciones del intestino que mejora la liberación de compuestos bioactivos potencialmente antioxidantes.

Los resultados obtenidos concuerdan con los informados en otro de los estudios, en los que se observó también un aumento en los valores de capacidad antioxidante mediante el ensayo ABTS después de la digestión *in vitro* para los granos de mijo (Chandrasekara & Shahidi, 2012).





5.- CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

- El método de producción desarrollado para obtener la bebida fermentada a base de quinoa roja garantiza una alta viabilidad de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en el producto elaborado, indicando que la quinoa roja (*Chenopodium quinoa*, L.) es una buena matriz alimentaria para mantener la viabilidad de *L. plantarum* y *B. longum* por encima del mínimo recomendado (10^6 - 10^7 UFC/mL) para su efecto probiótico.
- Las bebidas a base de quinoa son un buen medio para mantener la supervivencia de *L. plantarum* y *B. longum*, ya que contienen azúcares fermentables (glucosa, fructosa, sacarosa) que son transformados principalmente en ácido láctico y acético mediante la fermentación por parte de las bacterias ácido-lácticas, aumentando la acidez y disminuyendo el pH.
- La resistencia a los antibióticos ampicilina (10 µg), cefsulodina (30 µg), estreptomina (10 µg), kanamicina (30 µg), polimixina B (300 UI), tetraciclina (30 µg) y vancomicina (30 µg) demostrada por *L. plantarum* y *B. longum* en las bebidas de quinoa roja fermentadas representa un gran potencial para poder restaurar la microbiota intestinal durante y después de las terapias de tratamiento de enfermedades con determinados antibióticos.
- La viabilidad tras la digestión gastrointestinal *in vitro* de *L. plantarum* y *B. longum* en las bebidas fermentadas durante 24 h es alta, pudiendo ejercer estos probióticos su efecto potencialmente beneficioso en el colon.
- La digestión gastrointestinal *in vitro* influye sobre la concentración de polifenoles totales y la capacidad antioxidante debido al metabolismo microbiano, apuntando a un posible efecto prebiótico de los polifenoles de la quinoa roja sobre *L. plantarum* y *B. longum*, que requiere de estudios posteriores para conocer los metabolitos fenólicos generados y su efecto a nivel intestinal.
- El estudio realizado en el presente trabajo supone una alternativa tecnológica para el desarrollo de un producto funcional, usando pseudocereales como la quinoa roja como potenciales vehículos para los microorganismos estudiados (*L. plantarum* y *B. longum*). Sin embargo, se debe asegurar su viabilidad por encima del mínimo recomendado (10^6 - 10^7 UFC/mL o g) en el momento del consumo para poder alcanzar el intestino grueso en elevadas concentraciones, por lo que son necesarios estudios posteriores para optimizar las condiciones de almacenamiento más favorables para la supervivencia de los microorganismos en estas matrices.



6.- BIBLIOGRAFÍA

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Ayyash, M., Johnson, S., Liu, S., Al-Mheiri, A., & Abushelaibi, A. (2018). Cytotoxicity, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat by *Bifidobacterium* species: In-vitro investigations. *Lwt-Food Science and Technology*, 95, 295-302. doi:10.1016/j.lwt.2018.04.099
- Batthey, A., Duffy, S., & Schaffner, D. (2001). Modelling mould spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. *Food Microbiology*, 18(5), 521-529. doi:10.1006/fmic.2001.0438
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1), 25-30.
- Butel, M. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Medecine Et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1-8. doi:10.1016/j.medmal.2013.10.002
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149. doi:10.1016/S0168-1605(99)00082-3
- Cavaillon, J., & Legout, S. (2016). Centenary of the death of Elie Metchnikoff: a visionary and an outstanding team leader. *Microbes and Infection*, 18(10), 577-594. doi:10.1016/j.micinf.2016.05.008
- Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 226-237. doi:10.1016/j.jff.2011.11.001
- Charalampopoulos, D., & Pandiella, S. (2010). Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(3), 431-435. doi:10.1016/j.lwt.2009.09.006
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S., & Webb, C. (2003). Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 133-141. doi:10.1016/S0168-1605(02)00248-9
- Chavan, M., Gat, Y., Harmalkar, M., & Waghmare, R. (2018). Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. *Lwt-Food Science and Technology*, 91, 339-344. doi:10.1016/j.lwt.2018.01.070
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G., & van Sinderen, D. (2011). Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), 4-18. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.019

- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E., & Roberfroid, M. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 1-27.
- Engelbrektsen, A., Korzenik, J., Sanders, M., Clement, B., Leyer, G., Klaenhammer, T., & Kitts, C. (2006). Analysis of treatment effects on the microbial ecology of the human intestine. *Fems Microbiology Ecology*, 57(2), 239-250. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00112.x
- Farnworth, E., Mainville, I., Desjardins, M., Gardner, N., Fliss, I., & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 174-181. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.015
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report). (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ed. London, Ontario, Canada.
- Francis, F. (1982). Colorimetry of foods. *Food Technology*, 36(1), 36-36.
- Fuster, G., & González-Molero, I. (2007). Probiotics and prebiotics in clinical practice. *Nutricion Hospitalaria*, 22, 26-34.
- Galdeano, C., & Perdigon, G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(2), 219-226. doi:10.1128/CVI.13.2.219-226.2006
- Gaspar, P., Carvalho, A., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764-788. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.03.011
- Gomes, A., Malcata, F., & Klaver, F. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2817-2825. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75840-0
- Granato, D., Branco, G., Nazzaro, F., Cruz, A., & Faria, J. (2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292-302.
- Gueimonde, M., & Collado, M. (2012). Metagenomics and probiotics. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 32-34. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03873.x
- Herrera-Ponce, A., Névarez-Morillón, G., Ortega-Rivas, E., Pérez-Vega, S., & Salmerón, I. (2014). Fermentation adaptability of three probiotic *Lactobacillus* strains to oat, germinated oat and malted oat substrates. *Letters in Applied Microbiology*, 59(4), 449-456. doi:10.1111/lam.12302

- Howarth, G., & Wang, H. (2013). Role of Endogenous Microbiota, Probiotics and Their Biological Products in Human Health. *Nutrients*, 5(1), 58-81. doi:10.3390/nu5010058
- Isolauri, E. (2001). Probiotics in human disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(6), 1142S-1146S.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sutas, Y., Moilanen, E., & Salminen, S. (2000). Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(11), 1604-1610.
- Kumar, H., Salminen, S., Verhagen, H., Rowland, I., Heimbach, J., Banares, S., . . . Lalonde, M. (2015). Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 99-103. doi:10.1016/j.copbio.2014.11.021
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-+. doi:10.1128/MMBR.00017-08
- Levri, K., Ketvertis, K., Deramo, M., Merenstein, J., & D'Amico, F. (2005). Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *Journal of Family Practice*, 54(7), 613-620.
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1-2), 1-17. doi:10.1016/S0958-6946(01)00036-X
- Marsh, A., Hill, C., Ross, R., & Cotter, P. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124. doi:10.1016/j.tifs.2014.05.002
- Martins, E., Ramos, A., Vanzela, E., Stringheta, P., Pinto, C., & Martins, J. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764-770. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.047
- Masisi, K., Beta, T., & Moghadasian, M. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, 196, 90-97. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.021
- Ohland, C., & MacNaughton, W. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G807-G819. doi:10.1152/ajpgi.00243.2009
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rizzello, C., Lorusso, A., Montemurro, M., & Gobbetti, M. (2016). Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic

- acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology*, 56, 1-13. doi:10.1016/j.fm.2015.11.018
- Rizzello, C., Lorusso, A., Russo, V., Pinto, D., Marzani, B., & Gobbetti, M. (2017). Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 252-261. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.035
- Saito, M. (2007). Role of FOSHU (Food for Specified Health Uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 127(3), 407-416. doi:10.1248/yakushi.127.407
- Salmerón, I., Thomas, K., & Pandiella, S. (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*, 15, 106-115. doi:10.1016/j.jff.2015.03.012
- Sanders, M., & Huis In't Veld, J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 293-315. doi:10.1023/A:1002029204834
- Schell, M., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., . . . Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14422-14427. doi:10.1073/pnas.212527599
- Sendra, E., Sayas-Barberá, M. E., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2016). Chapter 17 - Effect of Food Composition on Probiotic Bacteria Viability. In R. R. Watson & V. R. Preedy (Eds.). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*, 257-269. doi:Academic Press
- Shori, A. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1-8. doi:10.1016/j.fbio.2015.11.001
- Siebert, K. (1999). Modeling the flavor thresholds of organic acids in beer as a function of their molecular properties. *Food Quality and Preference*, 10(2), 129-137. doi:10.1016/S0950-3293(98)00059-7
- Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S., Gordin, A., Saxelin, M., Wikberg, R., & Kirkkola, A. (1990). Effect of *Lactobacillus* GG yogurt in prevention of antibiotic associated diarrhea. *Annals of Medicine*, 22(1), 57-59. doi:10.3109/07853899009147243
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., & Packer, L. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants, Pt a*, 299, 152-178.

- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), 456-467. doi:10.1016/j.appet.2008.05.060
- Stroehle, L., Zweytick, G., & Berghofer, E. (2006). Sauerkraut fermentation with L(+)-lactic acid producing bacteria. *Ernaehrung*, 30(7/8), 293–303.
- Tannock, G. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189-3194. doi:10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004
- Tiihonen, K., Ouwehand, A., & Rautonen, N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, 9(2), 107-116. doi:10.1016/j.arr.2009.10.004
- Tok, E., & Aslim, B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiology and Immunology*, 54(5), 257-264. doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00219.x
- Tripathi, M., & Giri, S. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241. doi:10.1016/j.jff.2014.04.030
- Valero-Cases, E., & Frutos, M. (2017). Effect of inulin on the viability of *Lactobacillus plantarum* during storage and *in vitro* digestion and on composition parameters of vegetable fermented juices. *Plant Foods For Human Nutrition*, 72(2), 161-167. doi:10.1007/s11130-017-0601-x
- Valero-Cases, E., Nuncio-Jauregui, N., & Frutos, M. (2017). Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and *in vitro* digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6488-6496. doi:10.1021/acs.jafc.6b04854
- Valero-Cases, E., Roy, N., Frutos, M., & Anderson, R. (2017). Influence of the fruit juice carriers on the ability of *Lactobacillus plantarum* DSM20205 to improve *in vitro* intestinal barrier integrity and its probiotic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(28), 5632-5638. doi:10.1021/acs.jafc.7b01551
- Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101-111. doi:10.1016/j.jff.2014.01.033
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., & Pool-Zobel, B. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 451S-455S.