



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización fisicoquímica de vainas y harinas de
algarrobo (*Prosopis alba* y *Prosopis nigra*). Aplicaciones
en productos horneados y fermentados**

Tesista: Sciammaro Leonardo Pablo

Directora: Puppo María Cecilia

Codirectora: Ferrero Cristina

Codirector: Voget Claudio Enrique

Defensa oral y pública: 22 de Diciembre de 2015

A mi familia

*“A veces en la vida hay que saber luchar no sólo sin miedo, sino
también sin esperanza”*

Alessandro Pertini

Agradecimientos

A la Dra. María Cecilia Puppo por su paciencia, esfuerzo y tiempo invertidos en este trabajo de tesis.

A la Dra. Cristina Ferrero, por las ganas, los consejos, la ayuda y siempre estar para dar una mano.

Al Dr. Claudio Enrique Voget, por el trabajo codo a codo durante todos los procesos de fermentación y toda la buena predisposición para el trabajo.

A la Señora Nancy Campos y a la Dra. Laura Iturriaga, por la gran ayuda brindada durante nuestra estadía en la Provincia de Santiago del Estero.

Al CONICET por otorgarme la beca doctoral y permitirme realizar mis actividades de investigación.

A la Universidad Nacional de La Plata y sus centros de investigación CIDCA y CINDEFI, por ser los lugares en donde realicé todos los ensayos y tuve lugar para trabajar.

A mis compañeros de trabajo del CIDCA y del CINDEFI, no me alcanzarían las hojas para poner los nombres de todos los que tanto me han ayudado.

A los técnicos, pero especialmente al Señor Claudio Reyes y al Dr. Fabricio Lareu, por su aguante y ayuda.

A los amigos que me regalo la vida, Juan, Santiago, Eduardo, Catta, Roqui, Viviana; que durante todos estos años estuvieron ahí para prestarme un oído y darme una mano cuando los necesite.

Y por último, a Nati por su ayuda, amor y paciencia durante este camino, que juntos, vamos recorriendo.

¡¡A todos GRACIAS!!

Resumen

Estado del tema. La importancia del estudio del fruto del árbol algarrobo se basa en que la República Argentina constituye el mayor centro de diversificación del género *Prosopis* spp. con la mayor cantidad de especies endémicas. Otro factor interesante que avala la promoción de estas especies es que las mismas poseen elevada resistencia a la sequía, temperaturas extremas y alta salinidad, a la vez que contribuyen a la mejora de suelos por medio de la fijación de nitrógeno, lo que le confiere gran valor en sistemas agro-forestales. Los bosques naturales de *Prosopis* spp. de nuestro país han sido diezmados, especialmente en los últimos años, debido a las actividades antropogénicas. Consecuentemente, la reforestación con especies de algarrobo para la producción del fruto con fines alimentarios, fomentaría el desarrollo de las comunidades regionales como también la disminución del daño ambiental causado por la deforestación. Además, las comunidades regionales del noroeste argentino asocian al fruto de algarrobo y sus productos con sus orígenes e identidad. Por lo expuesto, las investigaciones sobre las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales de vainas y harinas derivadas del fruto de diferentes especies de *Prosopis* spp. nativas de Argentina permitirán contar con el conocimiento necesario para revalorizar este fruto como ingrediente alimentario.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) analizar la composición química y nutricional de vainas, harinas y semillas del fruto de algarrobo blanco (*Prosopis alba*) y algarrobo negro (*Prosopis nigra*) b) utilizar la harina obtenida de *Prosopis alba* en la elaboración y caracterización funcional de dos productos horneados, por un lado bocaditos dulces a base de semillas andinas (amaranto, quinua y chía) con azúcar, miel y harina de algarroba como aglutinantes de la formulación; y por otro la obtención de panificados dulces libres de gluten tipo muffins a base de una mezcla de harinas de algarroba, maíz y arroz c) obtener a escala de laboratorio a partir de vainas enteras de *Prosopis alba* la bebida fermentada llamada aloja, típica del noroeste argentino, para estudiar la cinética de fermentación y caracterizar la microflora de la misma durante todo

el proceso hasta llegar al producto final; como también determinar parámetros fisicoquímicos de la bebida como pH, acidez y contenido alcohólico, entre otros.

Materiales y Métodos. Se realizó una caracterización morfológica de vainas y semillas de *P. alba* y *P. nigra*. Se caracterizaron las vainas secas y las harinas provenientes de dichas vainas luego de pasar a través de tamices de 1000 y 500 μm . Se determinó la composición de las muestras a través de distintos ensayos: cenizas, minerales, lípidos, perfil de ácidos grasos, contenido de proteínas y naturaleza de las mismas por SDS-PAGE, perfil aminoacídico por HPLC, ensayo de presencia de prolaminas con anticuerpos policlonales y actividad antitriptica. Se determinó fibra dietaria total e insoluble por método gravimétrico-enzimático, azúcares solubles por HPLC, perfil de galactomananos por GC, contenido de polifenoles y actividad antioxidante. Se analizó el color de las harinas como también la actividad acuosa y las isothermas de adsorción a diferentes temperaturas (10° - 20° - 40°C) que se ajustaron con diferentes modelos matemáticos. Con la harina de *P. alba* se prepararon bocaditos dulces a base de semillas de amaranto, quinua y chía en proporción constante (51,8%). Las semillas guardaron la relación: 22% amaranto, 22% de quinua y 7,8% de chía. El aglutinante (48,2%) estuvo formulado con azúcar, miel y harina de algarroba en proporción variable según un diseño de mezclas de 3 componentes con restricción (la de no tener una formulación con solamente harina de algarroba). El diseño arrojó 5 formulaciones distintas. A los cinco productos se les analizó color, humedad, actividad acuosa, perfil de textura y test de aceptabilidad con 55 panelistas mediante 2 paneles diferentes: uno de ordenamiento por preferencia con las 5 formulaciones y otro de aceptabilidad de atributos mediante escala hedónica de 9 puntos con los 2 mejor seleccionados en el panel anterior. Con la misma harina se elaboraron panificados dulces tipo *muffins* con mezcla de harinas de algarroba, maíz y arroz, cuya proporción se determinó mediante un diseño experimental de mezclas tricomponentes con replicado del punto central. Se mantuvo constante la proporción del resto de las materias primas utilizadas: leche descremada, huevo entero líquido, margarina vegetal, emulsificante, hidrocoloide, leudante químico y levadura en polvo. No se agregó agua a la formulación. Se fermentó la mezcla 40 min a 30°C y se horneó 25 min a 180°C . A los panificados se les midió diferentes parámetros de calidad: volumen, altura, color, humedad, alveolado y textura de la miga. Se realizó un análisis sensorial de escala hedónica de 9 puntos con 76 panelistas no entrenados, con 4 de las formulaciones que

contenían harina de algarroba. Los datos se analizaron mediante ANOVA de acuerdo al modelo general lineal. Se analizaron las diferencias significativas entre medias mediante el test de Fisher (LSD) ($p < 0.05$).

Se preparó la bebida fermentada llamada aloja que se caracterizó a través de la cinética de fermentación, determinándose el tipo de flora bacteriana mediante crecimiento en diferentes medios de cultivos. Las colonias obtenidas se identificaron mediante ensayos moleculares. Se hizo el seguimiento a diferentes tiempos de fermentación midiéndose el pH, acidez, azúcares, grado alcohólico, entre otros ensayos.

Resultados y Conclusiones. La especie *Prosopis alba* presentó un contenido significativamente mayor de sacarosa que *P. nigra*, razón por la cual sumada a la mayor abundancia y disponibilidad de vainas de *P. alba*, se ha seleccionado esta especie como materia prima para los diferentes productos elaborados a partir de vaina y harina de algarrobo. La harina de *P. alba* con la que se elaboraron dichos productos presentó menor contenido de proteínas, lípidos, fibra dietaria total y polifenoles, aunque mayor contenido de azúcares solubles (> 50% sacarosa). *P. alba* presentó mayor contenido de K, Mg y Fe pero menor contenido de Ca, Zn y Mn que *P. nigra*. Los lípidos de harinas de *Prosopis* spp. tienen principalmente ácidos palmítico, oleico y linoleico pero también contienen ácidos esteárico, araquídico, α -linolénico y araquidónico. Muchos de los componentes nutricionalmente importantes de un fruto del tipo leguminosa se encuentran en la semilla; la semilla de *P. alba* presentó mayor contenido de calcio y magnesio que la de *P. nigra*. La fracción goma (un galactomanano) de *P. alba* presentó una relación molar Man/Gal de 1,56. Los ácidos grasos predominantes fueron el linoleico, seguido del ácido oleico y palmítico. El contenido de proteínas resultó mayor para *P. nigra*, aunque con una proporción aminoácida semejante en ambas especies. Las proteínas de ambas especies de *Prosopis* spp. no fueron deficientes en lisina ni en aminoácidos azufrados, como ocurre con otras proteínas vegetales, lo que las convierte en un buen complemento nutricional. Asimismo, los altos contenidos de ácidos aspártico y glutámico y de arginina hacen de estas proteínas, y por ende del germen de las semillas de algarrobo, un ingrediente adecuado para alimentos para deportistas ya que estos aminoácidos cumplen un rol importante en el incremento de la masa muscular, la síntesis de colágeno y la producción de glicógeno. Estas proteínas no presentaron actividad antitriptica y el análisis mediante anticuerpos policlonales dio como resultado ausencia de prolaminas lo que significa que

Resumen

estas harinas son ingredientes aptos para productos libres de gluten destinados a personas con enfermedad celíaca. El contenido de polifenoles de *P. nigra* resultó el doble que el de *P. alba*, tanto en semilla entera como en cada parte de la misma, encontrándose el mayor valor en la capa externa o testa. La actividad antioxidante siguió el mismo comportamiento que el contenido de polifenoles, sin embargo resultó significativamente mayor en semillas de *P. nigra*. El análisis comparativo de una harina de vaina entera (con semillas) y otra de pulpa (sin semillas) demuestra que se puede utilizar la semilla para la obtención de proteínas o goma (fibra soluble) y la fracción remanente ser utilizada en productos panificados sin mayores variaciones en el perfil nutricional de los mismos.

Entre las propiedades físicas a evaluar en harinas, una de las más importantes es la actividad acuosa, relacionada con la estabilidad frente al almacenamiento. La actividad acuosa para la harina de *P. alba* fue de 0,351 y para *P. nigra* de 0,138, en tanto que para la misma actividad acuosa (a_w 0,7), la harina de *P. nigra* tolera una mayor humedad de almacenamiento que la harina de *P. alba*. Las curvas de humedad vs a_w fueron del tipo “J” o tipo III en la clasificación de BET.

Las buenas propiedades fisicoquímicas y nutricionales de la harina de algarroba, hacen que la misma constituya un ingrediente ideal para la elaboración de diferentes productos horneados dulces saludables, como los estudiados en este trabajo de tesis con la harina de *P. alba*: bocaditos dulces a base de semillas y panificados libres de gluten tipo *muffin*.

Los bocaditos con sólo azúcar o azúcar aportada por la harina de algarroba, presentaron a los 30 min de cocción una mayor variación de color, mientras que la de menor producción de color resultó la formulación con cantidades equivalentes de los tres aglutinantes (harina algarroba, miel, azúcar). La dureza y masticabilidad resultó mayor en las formulaciones con mayor contenido de harina de algarroba, mientras que los bocaditos más blandos fueron los que no contenían esta harina. Se prefirieron por igual el bocadito que contiene solamente azúcar y el de proporciones equivalentes de aglutinantes; ambos presentaron igual aceptabilidad global. Se puede concluir que la harina de algarroba resulta adecuada para el desarrollo de color pero, en niveles del 66% en la mezcla de aglutinantes endurece los bocaditos y no son preferidos por los consumidores. Sin embargo, en una proporción equivalente con miel y azúcar, esta

formulación fue elegida por su mejor apariencia, con igual percepción de aroma y dulzor que el bocadito formulado con azúcar.

Los panificados libres de gluten resultaron de mejor calidad que los preparados solamente con harina de maíz o de arroz, tanto desde el punto de vista de su aspecto (color y volumen), como de propiedades de textura y sensoriales. La muestra con mayor contenido de harina de algarroba fue la que presentó menor dureza y consistencia, menor masticabilidad, mayor adhesividad y resultó ser menos resiliente y elástica. Estas propiedades texturales se relacionaron con una miga más aireada, es decir con mayor porcentaje de área ocupada por alvéolos. Este panificado resultó ser de color amarronado, por lo que la harina de algarroba podría constituir un sustituto ideal del chocolate en productos panificados.

La aloja es una bebida fermentada típica de la región del noroeste argentino elaborada con vainas enteras de algarrobo blanco. Debido a que no se ha encontrado hasta el momento información científica sobre la elaboración y caracterización fisicoquímica y microbiana de esta bebida, es que el desafío del último capítulo estuvo centrado en el estudio de la misma. Los protocolos para preparar aloja se han ido transmitiendo en forma oral de generación en generación, ya que es una práctica artesanal casera, que depende del productor y de la región en donde se la elabora. La fermentación es posible debido a que las vainas tienen una microbiota epifítica variable. El crecimiento microbiano de no más de 3 días y el consumo de azúcares fermentables, demostraron que el proceso de fermentación es relativamente corto y puede dividirse en dos etapas: una primera hasta las 18-24 h caracterizada por una intensa fermentación láctica que disminuye el pH del medio de 6,4-6,6 inicial a 4,5, lo cual impide el desarrollo de microorganismos patógenos, llegando a una acidez de alrededor de 0,7 % p/v (expresada como ácido láctico), conservando la bebida un ligero sabor dulce. En la segunda etapa se intensifica la fermentación alcohólica asociada al crecimiento de levaduras en la cual los azúcares se agotan y el nivel de alcohol llega a 6,5 – 7,5 % v/v; a las 60 h la bebida es agria y alcohólica. Mediante el aislamiento en medios selectivos se siguió la evolución de la población microbiana observándose dos tipos de colonias de levaduras y dos tipos de bacteria láctica que se identificaron mediante métodos moleculares. Las especies resultaron ser *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*, presentes en fermentados

Resumen

vegetales que poseen potencial acción probiótica, y las levaduras identificadas fueron *Wickerhamomyces anomalus* y *Saccharomyces cereviceae*.

Es posible que en las propiedades del producto final influyan varios factores como tiempo y temperatura de conservación de las vainas hasta su utilización, año de cosecha, condiciones de clima, forma de recolección y transporte del fruto, el agua empleada en el proceso, el tipo de molienda, entre otros. A pesar del gran número de variables involucradas, se ha observado en el transcurso de 2 años de ensayos bajo las mismas condiciones de fermentación en el laboratorio con vainas cosechadas en distintos lugares, años y tiempos de almacenamiento (entre una semana y varios meses), que el proceso fermentativo en líneas generales sigue la misma cinética y que la bebida evoluciona dentro de cierto rango de valores de acidez, contenido de azúcares y alcohol, entre otros, que le son característicos.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, resulta evidente la versatilidad del fruto del algarrobo por sus múltiples usos en alimentos de diversa naturaleza. A su aplicación en la preparación de productos regionales tradicionales se suma su potencial como materia prima para la elaboración de productos para necesidades específicas como los destinados a personas celíacas y productos saludables para consumidores en general.

Palabras clave

Prosopis alba, *Prosopis nigra*, vaina, harina, bocadito, panificado, celiarquía, fermentación, aloja.

Índice

Resumen	I
Abreviaturas	1
1 Introducción general	5
1.1 Características de las especies de <i>Prosopis</i> spp. Usos potenciales.....	5
1.2 Vainas y harinas	7
1.3 Productos y actividades regionales.....	9
1.4 Harinas obtenidas del fruto del algarrobo	11
1 Objetivos del trabajo	14
1.1 Objetivo General.....	14
1.2 Objetivos Específicos	14
Capítulo I Harinas de algarrobo, desde su obtención hasta su composición.....	15
1 Introducción	18
2 Objetivos	19
3 Materiales y Métodos	20
3.1 Descripción de las diferentes muestras utilizadas para el análisis.....	20
3.2 Parámetros morfológicos	20
3.3 Obtención de las harinas	21
3.4 Codificación de las muestras.....	21
3.5 Análisis de macro y microcomponentes	22
3.5.1 Humedad (AOAC 925.45).....	25
3.5.2 Cenizas totales (AOAC 900.2)	25
3.5.3 Minerales	26
3.5.4 Proteínas (AOAC 920.152)	26
3.5.5 Determinación de nitrógeno no proteico.....	27
3.5.6 Lípidos (AOAC 963.15).....	27
3.5.7 Fibra Dietaria Total (AOAC 991.43).....	28
3.5.8 Fibra dietaria insoluble (FDI).....	29
3.5.9 Obtención de extractos para cuantificación de polifenoles y antioxidantes.....	29

Índice

3.5.10	Determinación de polifenoles solubles.....	29
3.5.11	Capacidad antioxidante sobre radical ABTS ^{•+}	29
3.5.12	Factor antinutricional por inhibición de la tripsina pancreática.....	30
3.5.13	Obtención de extractos acuosos para determinación de azúcares.....	31
3.5.14	Determinación de azúcares por HPLC.....	32
3.5.15	Análisis de proteínas por SDS-PAGE.....	32
3.5.16	Determinación de galactomananos.....	35
3.5.17	Determinación de ácidos grasos.....	36
3.5.18	Análisis de aminoácidos.....	36
3.6	Características físicas de las harinas.....	37
3.6.1	Color de las harinas.....	37
3.6.2	Actividad acuosa (a_w) e isothermas de adsorción de las harinas.....	37
3.7	Análisis estadístico de los datos.....	41
3.8	Resultados y Discusión.....	41
3.8.1	Parámetros morfológicos de vainas y semillas.....	41
3.8.2	Rendimiento de las harinas obtenidas.....	43
3.8.3	Comparación de los parámetros de composición proximal entre las diferentes vainas.....	43
3.8.4	Comparación de los atributos entre vainas y sus respectivas harinas.....	50
3.8.5	Composición química de las semillas.....	60
3.8.6	Comparación de harina de vaina entera y harina de vaina sin semillas.....	71
3.8.7	Características físicas de las harinas de <i>Prosopis alba</i> y <i>Prosopis nigra</i>	76
3.9	Conclusiones parciales.....	84
Capítulo II Elaboración de un bocadito dulce con base en semillas nativas americanas y harina de algarrobo blanco.....		85
1	Introducción.....	88
2	Objetivos.....	91
3	Materiales y Métodos.....	91
3.1	Obtención del producto inicial.....	91
3.2	Obtención del modelo.....	92
3.3	Tratamiento de los ingredientes.....	93

3.3.1	Tratamiento de la quinua	94
3.3.2	Tratamiento de la chía y el amaranto	95
3.3.3	Preparación de los bocaditos.....	96
3.3.4	Determinación del tiempo de cocción.....	96
3.4	Ensayos de calidad del producto.....	97
3.4.1	Humedad	97
3.4.2	Actividad acuosa (a_w).....	97
3.4.3	Color	98
3.4.4	Textura de los bocaditos	99
3.5	Análisis sensorial.....	101
3.5.1	Ordenamiento de preferencia	101
3.5.2	Escala hedónica	102
3.6	Análisis cuantitativo	102
4	Resultados y Discusión.....	103
4.1	Tratamiento de las semillas	103
4.2	Tiempo de horneado.....	104
4.3	Color de los bocaditos	108
4.4	Determinación de la textura del bocadito.....	109
4.4.1	Textura de los bocaditos horneados	109
4.5	Análisis sensorial.....	114
4.5.1	Ordenamiento por preferencia	114
4.5.2	Panel de aceptabilidad por atributos	116
4.6	Composición	122
4.7	Conclusiones parciales	123
Capítulo III Elaboración de un panificado dulce apto para celíacos con harina de algarrobo		125
1	Introducción	128
2	Objetivos	130
3	Materiales y Métodos	130
3.1	Diseño experimental y obtención de las formulaciones.....	130
3.2	Preparación del panificado.....	131

Índice

3.3	Determinación del tiempo de fermentación	132
3.4	Evaluación fisicoquímica de los panificados.....	132
3.4.1	Determinación de volumen, altura y peso	132
3.4.2	Preparación de las muestras de miga	132
3.4.3	Determinación de la humedad de miga.....	133
3.4.4	Color	133
3.4.5	Textura de la miga.....	133
3.4.6	Alveolado de miga.....	133
3.5	Análisis sensorial de los panificados.....	134
3.6	Análisis estadístico de los resultados	135
4	Resultados y discusión	136
4.1	Preparación del panificado.....	136
4.2	Determinación del tiempo de fermentación	137
4.3	Panificados del diseño experimental.....	137
4.4	Aspecto y color de los panificados	137
4.5	Propiedades fisicoquímicas de los panificados	142
4.6	Características de la miga.....	143
4.7	Alveolado de la miga	146
4.8	Perfil de Textura	150
4.9	Análisis sensorial.....	159
5	Conclusiones Parciales	164
Capítulo IV Alojja, una bebida tradicional del Noroeste Argentino		165
1	Introducción	168
1.1	La bebida, su historia	168
1.2	Elaboración de la Alojja.....	171
1.3	Antecedentes del tema.....	173
2	Objetivo y desarrollo general del trabajo	173
3	Materiales y Métodos	174
3.1	Materia prima y elaboración de Alojja.....	174
3.2	Análisis microbiológicos y fisicoquímicos	174

3.2.1	Composición de la materia prima.....	174
3.2.2	Muestreo y análisis microbiológico	176
3.2.3	Conservación de cepas	178
3.2.4	Observación de microorganismos y pruebas bioquímicas	178
3.2.5	Test en placas para la determinación del potencial enzimático de las levaduras	179
3.2.6	Identificación molecular de los aislamientos	180
3.3	Análisis fisicoquímicos de la bebida	187
3.3.1	pH y acidez.....	187
3.3.2	Cromatografía de ácidos orgánicos en capa delgada	187
3.3.3	Determinación de ácidos orgánicos por HPLC	188
3.3.4	Determinación de azúcares por HPLC	188
3.3.5	Determinación contenido alcohólico.....	188
4	Resultados	189
4.1	Ensayo I. El “saber hacer” de la Aloja.....	189
4.2	Análisis de la fermentación	191
4.3	Fermentaciones en laboratorio.....	197
4.3.1	Estandarización del proceso.....	197
4.4	Resultados	199
4.4.1	Cinética de fermentación	199
4.4.2	Identificación y caracterización de los microorganismos fermentadores	206
4.5	Discusión y conclusiones parciales	207
	Conclusiones generales	215
1	Conclusiones generales	217
1.1	Vainas	217
1.2	Harinas	218
1.3	Productos	219
	Anexo.....	223
1	Anexo Capítulo I.....	225
1.1	Reactivos de Carrez.....	225
1.1.1	Solución de Carrez I	225

Índice

1.1.2	Solucion de Carrez II.....	225
1.2	Reactivo de Mortimer	225
1.3	Reactivos para determinar antioxidantes	225
1.3.1	Solución madre ABTS ^{•+}	225
1.3.2	Solución de reacción.....	225
1.4	Hemoglobina bovina.....	225
1.5	Reactivos utilizados en electroforesis.....	226
1.5.1	Buffer de extracción	226
1.5.2	Buffer muestra.....	226
1.5.3	Gel apilador.....	226
1.5.4	Gel separador.....	227
1.5.5	Buffer stacking.....	227
1.5.6	Buffer separador.....	227
1.5.7	Buffer de corrida 1X.....	227
1.6	Certificado harinas libres de gluten.....	228
2	Anexo Capítulo II.....	229
2.1	Planilla de ordenamiento por preferencia.....	229
2.2	Planilla aceptabilidad de bocaditos por atributos	229
3	Anexo Capítulo III	230
3.1	Planilla utilizada para la evaluación sensorial	230
4	Anexo Capítulo IV	231
4.1	Medios de cultivo.....	231
4.1.1	Medio WL	231
4.1.2	Medio MRS	231
4.1.3	Medio Mac Conkey.....	232
4.1.4	Medio VRBA	233
4.1.5	Medio MSA.....	233
4.1.6	Medio PCA	233
4.1.7	Medio de Wickerham	234
4.1.8	Medio EMB	234

4.1.9	Medio Luria Bertani (EB)	235
4.2	Tinción de Gram	235
4.3	Prueba de la catalasa.....	235
4.4	Hidróxido de sodio para determinación de acidez.....	235
4.5	Fase móvil para TLC.....	236
4.6	Geles de agarosa	236
4.6.1	Soluciones de trabajo.....	236
4.6.2	Preparación de los geles	237
4.6.3	Desarrollo de los geles.....	237
4.7	Biología molecular.....	237
4.7.1	Primers Bacterias.....	237
4.7.2	Primers Levaduras.....	238
4.7.3	ARNr 16s	238
4.7.4	Dominio D1/D2 levaduras	238
4.8	Buffer de lisis para extracción de ADN de levaduras	239
	Bibliografía	241

Abreviaturas

°C	grados centígrados
μL	microlitro
μm	micrómetro
μmol	micromoles
a _w	actividad acuosa
b.h	Base húmeda
b.s	Base seca
BAL	Bacterias ácido lácticas
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool
c.s.p	cantidad suficiente para
CGL	Cromatografía gas líquido
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
CIELab	Espacio de color L* a* b*
CS	Chemical Score
DTT	ditriotreitol
EB	Enterobacterias
ELISA	enzyme - linked immunosorbent assay
EMB	Eosina azul de metileno agar
EPA	Endosperma seminal <i>P. alba</i>
EPN	Endosperma seminal <i>P. nigra</i>
eV	electron Voltios
FAc	Fermentador acero
FDI	Fibra dietaria insoluble
FDT	Fibra dietaria total
FPlas	Fermentador plástico
G	Fuerza G 1G = 9,8 m/s ²
g	gramo
Gal	galactosa
GC	Gas Chromatography (Cromatografía gaseosa)
GPA	Germen semilla <i>P. alba</i>
GPN	Germen semilla <i>P. nigra</i>

Abreviaturas

H₂O (bd) Agua bidestilada

H₂O (d) Agua Destilada

H₂O (mq) Agua Milli-Q® Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos

HA Harina de arroz

HA11S Harina de *P. alba* proveniente de VA11S

H_e Humedad en el equilibrio

HLac Ácido láctico

HM Harina de maíz

HN13S Harina de *P. nigra* proveniente de VA13S

HPA Harina de algarrobo blanco

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta performance)

HPMC HidroxiPropilMetilCelulosa

IDR Ingesta diaria recomendada

IRAM Instituto Argentino de Normalización y Certificación

kDa kilodalton

kg kilogramo

L litro

LBG Locust bean gum

LDL Lipoproteína de baja densidad

M molaridad (número de moles por litro de solución)

Man Manosa

mL mililitro

mmol milimoles de soluto en 1000 mL de solución

MRS Man Rogosa Sharpe

MSA (Manitol Salado Agar)

msnm metros sobre el nivel del mar

N normalidad (número de equivalentes por litro de solución)

NCBI National Center for Biotechnology Information

nm Nanómetro

NOA Noroeste Argentino

%p/p g soluto cada 100 g de solución

%p/v g de soluto cada 100 mL de solución

PAGE polyacrilamide gel electrophoresis
pb pares de bases
PCA Plate Count Agar
PCR polymerase chain reaction
PGA Ácido poligalacturónico
PPA Episperma seminal *P. alba*
ppm partes por millón (mg/L)
PPN Episperma seminal *P. nigra*
Psi Pounds square inches (Libras por pulgada cuadrada)
RP-HPLC Cromatografía líquida de alta performance en fase reversa
rpm revoluciones por minuto
SD desvío standard
SDS Dodecilsulfato de sodio
SPA Semilla *Prosopis alba*
SPN Semilla *Prosopis nigra*
SSL Estearoil Lactilato de Sodio
t tonelada
TCA Ácido tricloroacético
TFA Ácido trifluoroacético
TLC Thin Layer Chromatography (cromatografía en capa delgada)
UFC Unidades Formadoras de Colonias
%v/v mL de soluto cada 100 mL de solución
VA10F Vaina *P. alba*, año 2010, provincia de Formosa, Ingeniero Juez
VA11S Vaina *P. alba*, 2011, provincia de Santiago del Estero, Santiago del Estero
VA12A Vaina *P. alba*, año 2012, provincia de Santiago del Estero, Arraga
VA12L Vaina *P. alba*, año 2011, provincia de Santiago del Estero, Loreto
VA12S Vaina *P. alba*, año 2012, provincia de Santiago del Estero, Santiago del Estero
VA13S Vaina *P. alba*, año 2011, provincia de Santiago del Estero, Santiago del Estero
VN13S Vaina *P. nigra*, año 2011, provincia de Santiago del Estero, Santiago del Estero
VRBA Violeta Rojo Vilis Agar
WL Wallerstein Laboratories

1. Introducción general

1.1 Características de las especies de *Prosopis* spp. Usos potenciales

El género *Prosopis* pertenece a la familia de las leguminosas y subfamilia mimosoidea. Incluye 44 especies (Burkart, 1976) de gran importancia en la composición arbórea y arbustiva de regiones áridas y semiáridas. La distribución de *Prosopis* incluye el sudoeste de Asia (3 especies nativas), África tropical (1 especie nativa) y América con 40 especies nativas. En el último continente, los *Prosopis* spp. están extendidos desde el sudoeste de USA hasta la Patagonia argentina y chilena, siendo Argentina el mayor centro de diversificación, con la mayor proporción de especies endémicas (Felker, 2009).

Muchas de las especies de América con atributos útiles han sido introducidas desde regiones vecinas (Pasiiecznik y col., 2001). Los árboles del género *Prosopis* han sido extensamente introducidos por el hombre durante los últimos 100 a 150 años. La primera introducción documentada de *Prosopis* desde esa fecha fue en Kenia, habiéndose naturalizado en ese país (Choge y col., 2007). *Prosopis juliflora* es la especie más común naturalizada en Kenia, aunque también se encuentra *Prosopis pallida*. Este fenómeno se produjo debido al valor percibido de los múltiples productos obtenidos de este árbol y el alto rendimiento incluso bajo condiciones de pobreza de la zona de cultivo. Muchas especies del género *Prosopis* spp. son valiosas por sus múltiples usos, proveen madera para muebles, leña, alimento para ganado (generalmente cabras), alimento humano, sombra, refugio. La tolerancia a la sequía y a suelos áridos, al ramoneo y su capacidad para la mejora de los suelos, son algunas de las causas que hacen que estas especies tengan valor en sistemas silvopastoriles. El valor de los *Prosopis* spp. como productores de madera, excelente combustible y frutos dulces comestibles ha sido bien reconocido por los pobladores de las zonas donde comúnmente crecen estos árboles; lo que ha hecho que se seleccionaran especies que cumplan las mismas funciones para adaptarlas a otros países (Choge y col., 2007). Las vainas, que son ricas en azúcares, carbohidratos y proteínas, han sido históricamente fuente de alimento para las poblaciones del norte y sur de América, siendo fuente de harinas y otros productos comestibles. A pesar del conocimiento que los aborígenes tienen del *Prosopis* spp., el fruto ha sido subutilizado o usado como forraje para ganado, mayoritariamente en Asia y África (Choge y col., 2007).

Introducción general

En Argentina, *Prosopis flexuosa* y *P. ichilenses* son nativas de la zona árida-templada denominada “Provincia Fitogeográfica del Monte”. Esta zona incluye el corredor paralelo de los Andes desde las provincias de Salta a La Pampa (Villagra y col., 2004). El algarrobo blanco (*Prosopis alba*) es un árbol que habita el centro de Argentina (Córdoba), la región ecológica del “Gran Chaco” (Chaco, Formosa y Santiago del Estero) y parte de la Mesopotamia Argentina (Corrientes y Misiones).

Las especies de *Prosopis* son generalmente árboles u arbustos de apariencia variada, con hojas bipinnadas y hasta en algunos casos sin hojas, con flores iridiscentes en racimo y frutos dulces con gran contenido de semillas (Parodi y Dimitri, 2000). Debido a su abundancia y comportamiento ecológico, las especies de *Prosopis* constituyen elementos importantes en regiones áridas de numerosos países. Estos árboles ofrecen sombra, madera para construcciones, leña y alimento para animales salvajes y domésticos, como también frutos para consumo humano.

Los pueblos originarios, le confirieron diferentes nombres al algarrobo, según sus cualidades, por ejemplo los Guaraníes llamaban al algarrobo blanco “igopé-para” que significa “árbol puesto en el camino para comer”. Los Quechua lo identificaban como “yaná-tacú” cuyo significado es “el árbol” (Roig, 1993). Estas dos culturas entre otras muchas, demuestran la gran importancia que tiene el algarrobo para los pueblos originarios de Argentina y Sudamérica.

La gran mayoría de las especies de *Prosopis* presentan elevada resistencia a la sequía (López Lauenstein y col., 2005), temperaturas extremas (Verga y Norverto, 2005) y alta salinidad (Felker y col., 1981), contando con una alta capacidad de fijar nitrógeno y siendo fácilmente adaptable a una gran diversidad de climas, principalmente climas secos y sub-húmedos (Villagra y col., 2004).

En Argentina, se ha estimado que los bosques naturales de *Prosopis* spp. han sido reducidos entre el 25 y 50% de su área original entre los años 1500 y 1975, debido a las actividades antropogénicas (D’Antoni y Solbrig, 1977, Villagra y col., 2004).

Las reforestación de tierras desérticas con especies de *Prosopis* y la explotación integral de este cultivo, contribuirían a la mejora de las condiciones alimentarias de la población rural marginal del noroeste argentino (NOA) con productos autóctonos (Abraham y Prieto, 1981). En este sentido, podrían dejar de depender de semillas e insumos que no aseguran una buena producción o que no se adaptan a zonas áridas

(Verga y Norverto, 2005). Otra ventaja de la reforestación con algarrobos es el beneficio ambiental. El algarrobo aumenta la biodiversidad, favorece una mayor infiltración y retención de agua en el suelo, y disminuye los procesos de contaminación y erosión edáfica (Villagra y col., 2004).

Las comunidades nativas asocian al fruto de algarrobo y sus productos con sus orígenes e identidad, por lo que investigaciones sobre las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales de harinas derivadas del fruto de diferentes especies de *Prosopis* spp. nativas de Argentina permitirían contar con conocimiento que contribuya a revalorizar este fruto como ingrediente alimentario; además de contribuir con el medio ambiente a través de la reforestación de zonas desérticas de nuestro país.

1.2 Vainas y harinas

El fruto de *Prosopis* spp. es un lomento drupáceo indehisciente (lomentum drupaceum) (Burkart, 1952, Burkart, 1976, Giovannetti y col., 2008). Este fruto varía en tamaño, color y composición química, dependiendo de la especie (Figura 1) (Fagg y Stewart, 1994).

Los frutos de *Prosopis alba* son semicirculares de color amarillento, con una longitud de entre 12 y 25 cm (Figura 1) (Burkart, 1976). Sus semillas son de color marrón oscuro, oblongas con endospermo asimétrico y vítreo y su germen amarillento (Galera, 2000). Según Galera (2000) estos frutos contienen entre 25-28% de glucosa, 11-17% almidón y minerales como hierro y calcio; bajo contenido de lípidos y digestibilidad aceptable. Las semillas están en el fruto en una proporción del 10% p/p y contienen 32% de proteína, 2-7% de lípidos con alto contenido de ácido linoleico (42-48%) y oleico (25-27%).

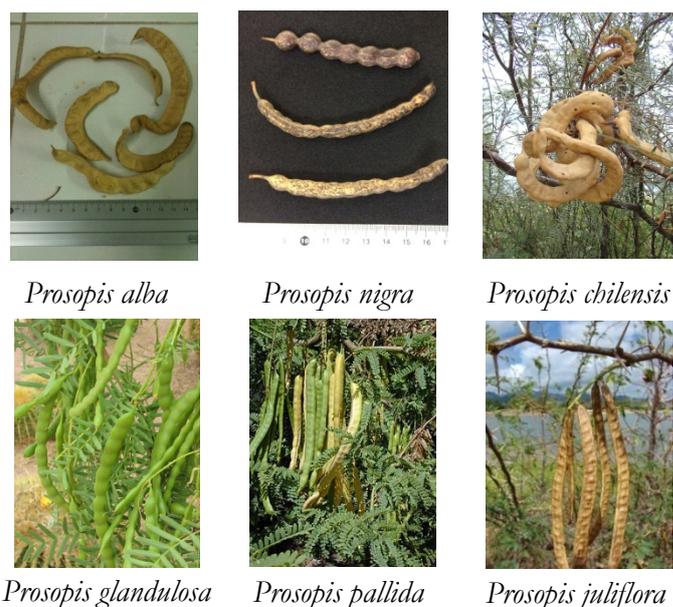


Figura 1. Vainas de diferentes especies de *Prosopis* spp.

Prosopis pallida y *Prosopis juliflora* son especies que producen frutos especialmente alargados y dulces (Figura 1). Las vainas son amarillas con un tamaño de hasta 30 cm de largo y un peso promedio de aproximadamente 12 g. El contenido de azúcar de la pulpa es del 46% (Grados y Cruz, 1996). *Prosopis chilensis* es un fruto de color amarillento opaco con forma de “S”, de 12-18 cm de largo con semillas pequeñas ovoides de color marrón (Burkart, 1976). El fruto de *P. chilensis* var. Catamarcana tiene una pulpa color amarillenta, mientras que las vainas de *P. chilensis* var. Riojana poseen un color cercano al negro. La vaina de *P. chilensis* tienen una composición de entre 25-28% de glucosa, 11-17% de almidón y 7-11% de proteínas (Galera, 2000). *Prosopis nigra* produce vainas cilíndricas de color púrpura de 7-18 cm de largo. Por otra parte, estos frutos son dulces y de consistencia pulposa, entre las semillas se observa un pequeño estrechamiento que le da a la vaina el aspecto de un collar de cuentas (Figura 1). Esta es la especie que presenta el menor daño ocasionado por un insecto denominado brúchido de la familia *Bruchidae*, que ataca los frutos de árboles y arbustos de leguminosas (L'Argentier, 1990, Terán, 1990), debido a que posee un endocarpio duro. Las semillas de *P. nigra* contienen un 30-32% de proteínas y 12-14% de lípidos.

Era costumbre de la gente del NOA en la época de la colonización española, la recolección de las vainas en forma colectiva, formando caravanas de hombres, mujeres y niños que celebraban de esta forma el comienzo del verano. Se colectaban las mejores

vainas que se dejaban uno o dos días bajo el sol para su secado. A esta práctica, llamada “algarrobeada”, contribuían tanto aborígenes como criollos. En tiempos de cosecha, las vainas de algarrobo son consumidas directamente, crudas o usadas para la elaboración de diferentes productos como “añapa” o “aloja”. Las vainas también se suelen tostar y moler e incorporar a la leche. Para preservar las vainas, la gente del NOA las introduce en alforjas llamadas *trojas* o las convierten en diferentes productos como harina, *patay*, *arrobe* y *bolonchao* (INCUPPO, 1991).

1.3 Productos y actividades regionales

Las vainas de *Prosopis* spp. de alta calidad se emplean para consumo humano, generalmente en la región nativa de este cultivo. El fruto de *Prosopis* spp. desde tiempos ancestrales constituye un recurso alimentario para el hombre, ya que es una excelente fuente de carbohidratos y proteínas. Los productos regionales preparados por la gente del NOA son los siguientes:

Patay. Es un producto dulce (17,2% glucosa, 26,9% sacarosa) elaborado con harina fina y seca. La harina se mezcla con agua hasta formar una masa. Esta masa se introduce en moldes circulares y se hornea. Se vende en mercados regionales y constituye un importante alimento regional en Santiago del Estero y otras provincias de Argentina (Figura 2).

Añapa. Es una bebida refrescante preparada con vainas maduras de algarroba. La gente prefiere *Prosopis alba* en vez de *Prosopis nigra*. Las vainas se trituran en un mortero y se las mezcla con exceso de agua fría. Se agita la dispersión y luego se filtra. Se deja luego reposar el filtrado en vasijas especiales de barro, tipo tinajas o directamente en recipientes de vidrio (Figura 2).

Aloja. Es una bebida fermentada, autóctona y ancestral (Figura 2) de sabor dulce que se bebe muy fría y se compra en puestos callejeros. Las vainas de *Prosopis alba* se muelen en un mortero y se introducen con agua en una vasija para favorecer el proceso de fermentación. La mezcla se guarda en lugar fresco, seco y en oscuridad. Luego de dos días, los pedazos de vainas se remueven en forma manual, se descartan, y se agregan nuevas vainas de modo de favorecer la fermentación. El punto óptimo de la bebida se detecta por cata o degustación. La aloja debe ser consumida en pocos días ya que tiene un

período de preservación muy corto. Generalmente se consume por sus propiedades diuréticas.

Arrope. El *arrope*, *algarrobina* o *miel de algarrobo* es un líquido denso y oscuro obtenido luego de machacar las vainas de algarroba con agua y cocinar la mezcla durante 8 horas. Durante este proceso se produce la concentración de azúcares. En la mitad de la cocción se separan las semillas. Se obtiene un jarabe oscuro (Figura 2) tipo miel.

Bolanchao. El *bolanchao* es un dulce tradicional del norte de Argentina de forma esférica. Se prepara machacando en mortero frutos de *Zizyphus mistol* Griseb hasta formar una pasta granulosa. Esta receta no necesita agua ya que los frutos aportan el agua necesaria. Con la pasta se arman bolas que se espolvorean con harina de algarroba y se hornean.

A nivel de cocina casera se encuentran, especialmente en los últimos tiempos con el auge de alimentos saludables, numerosas recetas que incluyen harina de algarroba, marcadas por la amplia creatividad y costumbres de la gente del lugar. El Instituto de Cultura Popular (INCUPO) a través de la recopilación de recetas culinarias regionales ha difundido diferentes productos elaborados con algarroba, desde caramelos con miel y harina de algarroba, bebidas calientes con harina tostada como sucedáneo del chocolate o reemplazante del café, hasta productos de panadería y pastelería como panes y tortas. Las comunidades de Santiago del Estero (Argentina) Juárez y col. (2003) experimentaron con harina de algarrobo elaborando diversos productos: tortas (Figura 2), *snacks*, bombones con miel, miel, licores, aloja, galletitas, pizza, espaguetis, café, bolonchao, entre otros. Actualmente un grupo de familias de los departamentos de Capital, Banda, Silípica y Robles de la provincia de Santiago del Estero auto-producen sus alimentos y elaboran productos para venta en ferias y red de consumidores, a través de la cooperativa *Inti Atun*. Esta organización es reconocida por elaborar alimentos y productos medicinales con frutos del monte santiagueño, donde se destaca la harina de algarroba y sus derivados como torrados, panificados, licores y confituras.

Uno de los panificados dulces más comercializados y consumidos en nuestro país y que constituye un sello de identidad a nivel internacional, es el alfajor, que comúnmente se elabora con harina de trigo (Figura 2). En la actualidad, en los negocios de dietética se están comercializando alfajores con harina de algarroba (Figura 2).

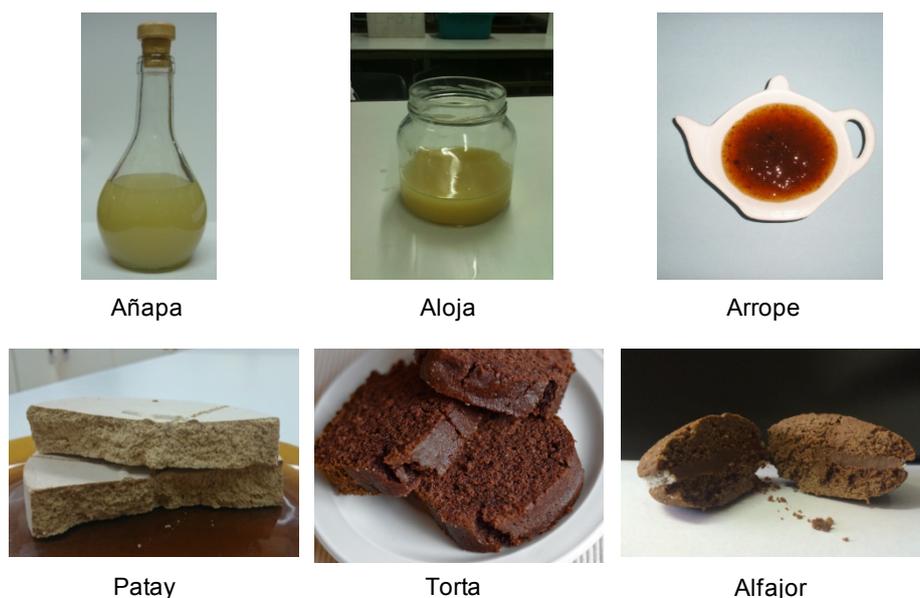


Figura 2. Alimentos tradicionales elaborados con harina de *Prosopis alba*.

1.4 Harinas obtenidas del fruto del algarrobo

La harina de *Prosopis* se prepara de forma tradicional. Luego de la cosecha, las vainas se secan al sol sobre el techo de las casas o en las trojas. El material seco se mantiene en dichas trojas para prevenirlo del ataque de los brúchidos, insectos que como mencionamos anteriormente, atacan a las semillas y desmejoran la apariencia de los frutos. Los lugareños suele poner dentro de las trojas, junto con las vainas, algunas plantas como *atamisqui*, *paico* y *ancoche*, que se utilizan como repelentes. La molienda se lleva a cabo en forma manual con morteros, aunque actualmente se suele usar molino de martillo. Luego la harina se tamiza y se conserva en recipientes herméticos (Juarez y col., 2003). Los integrantes de la comunidad Toba de la provincia de Chaco saben cuándo las vainas están en condiciones óptimas para convertirlas en harina: si las vainas producen ruido cuando se zarandean, ya están listas para preparar la harina. En general, las familias no nativas prefieren para la preparación de harina el algarrobo blanco (*Prosopis alba*) al negro (*Prosopis nigra*), debido a su sabor más suave. Por otro lado, los nativos prefieren las vainas de algarrobo negro porque si bien son dulces, poseen un sabor más fuerte.

Estas harinas son altamente energéticas por su elevado contenido de azúcares. La harina de *P. alba* analizada por Prokopiuk y col. (2000) presentó 2,5% de agua, 3,1% de cenizas, 59,1% de azúcares con 2,8% azúcares reductores, 2,4% fibra cruda, 7,2% de proteínas y 2,2% de lípidos. Estos porcentajes en general varían con el tipo de especies,

región y año de recolección. La harina de *P. alba* también presentó alto contenido de minerales, principalmente calcio (1274 ppm) y hierro (450 ppm) (Prokopiuk y col., 2000). La harina de *P. pallida* contiene mayor cantidad de carbohidratos, hierro, fósforo aunque menor contenido de fibra y proteína que *P. alba* (Prokopiuk y col., 2000).

Comparando en forma simultánea harinas de diferentes especies de *Prosopis* spp., *P. nigra* contiene altos niveles de proteína cruda (11,33 g/100g b.s.) y cenizas (4,12 g/100g b.s.) (González Galán y col., 2008). *P. juliflora* presenta el menor nivel de lípidos (0,79 g/100 g b.s.), proteína cruda (8,84 g/100 g b.s.) y fibra dietaria (40,15 g/100g b.s.); y el mayor de azúcares no reductores principalmente sacarosa (52,51 g/100 g b.s.) y de digestibilidad proteica in vitro (66,45%). La concentración de inhibidores de tripsina (0,29 a 9,32 UTI / mg b.s.) resultó inferior a la de soja cruda, presentando *P. juliflora* los mayores valores. Respecto a las saponinas, hemaglutinina y polifenoles, los niveles encontrados resultan muy bajos. El contenido de fitatos oscila entre 1,31 a 1,53 g/100 g entre especies (González Galán y col., 2008).

El alto contenido de azúcares, fibra dietaria, minerales y la cantidad aceptable de proteínas, convierte a la harina de algarroba en un ingrediente valioso para la elaboración de diferentes productos alimenticios.

El Código Alimentario Argentino (CAA, 2015) en su Capítulo IX: “Alimentos farináceos – cereales, harinas y derivados” hace referencia a harinas de algarroba en los siguientes artículos:

Artículo 681 – (Resolución Conjunta SPReI N°282/2014 y SAGyP N° 298/2014) “Con el nombre de Harina de algarroba, se entiende el producto de la molienda de las semillas limpias, sanas y secas del algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb) y/o algarrobo negro [*Prosopis nigra* (Grisebach) Hieronymus] y/o *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntzemend. Burkart y/o *Prosopis flexuosa* (DC).”

Artículo 681 tris – (Resolución Conjunta SPReI N°282/2014 y SAGyP N° 298/2014) “Con el nombre de Harina de fruto (vaina completa con sus semillas) de algarrobo, se entiende el producto de la molienda de los frutos completos limpios, sanos y secos, del algarrobo blanco (*Prosopis alba* Griseb) y/o algarrobo negro [*Prosopis nigra* (Grisebach) Hieronymus] y/o *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntzemend. Burkart y/o *Prosopis flexuosa* (DC). El producto deberá rotularse como: harina del fruto de algarrobo, indicando la/s especie/s que corresponda/n.”

Como se hace referencia a “harina de algarroba” a la molienda de semillas (Artículo 681) y nosotros hemos trabajado con vaina completa, y considerando que a la harina de vaina completa se la denomina “harina de fruto de algarrobo” (Artículo 681 tris), por simplicidad en todo este trabajo de tesis se utilizará el término simplificado “harina de algarrobo” para la harina proveniente de la molienda de vaina entera.

1. Objetivos del trabajo

1.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo de tesis fue el estudio integral de las características fisicoquímicas de vainas y harinas del fruto del algarrobo blanco (*Prosopis alba*) en comparación con las de algarrobo negro (*Prosopis nigra*); y la aplicación de harina de algarrobo blanco, más utilizada a nivel regional, en diferentes productos horneados y fermentados.

1.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos, detallados en cada capítulo, fueron los siguientes:

- a- Analizar la composición química y nutricional de vainas, harinas y semillas del fruto de algarrobo blanco (*Prosopis alba*) y algarrobo negro (*Prosopis nigra*). Estudiar la actividad acuosa y la cinética de adsorción de las harinas a diferentes temperaturas.
- b- Formular bocaditos dulces horneados a base de semillas andinas (amaranto, quinua y chía) y analizar la capacidad de la harina de algarrobo (*Prosopis alba*) de actuar como aglutinante junto con azúcar y miel. Realizar una caracterización funcional y sensorial de dichos productos mediante diferentes ensayos de calidad.
- c- Analizar la aptitud de la harina de *Prosopis alba* junto con harina de maíz y de arroz en la elaboración de panificados dulces libres de gluten tipo “muffins”. Estudiar las características fisicoquímicas y sensoriales de los panificados.
- d- Elaboración a partir de vainas enteras de *Prosopis alba* y agua de una bebida fermentada llamada “aloja” típica del noroeste argentino. Estudiar la cinética de fermentación y caracterizar la microflora de la misma durante todo el proceso hasta llegar al producto final; como también determinar parámetros fisicoquímicos de la bebida.

Capítulo

I

Harinas de algarrobo,
desde su obtención
hasta su composición

DEL ALGARROBO AL OMBÚ

*Canto a tí como un laurel mi grito
por el sueño que en mi canto sueño
y este orgullo de ser argentino
argentino es decir guitarrero y cantor.*

*Sureño en el norte, norteño en el sur
pa' mí el algarrobo es igual que el ombú.*

*Siempre fue de norte a sur la patria
solo una, nada más que una
madre gaucha que cobija hermanos
hermanos que juntos tenemos que andar.*

*Sureño en el norte, norteño en el sur
pa' mí el algarrobo es igual que el ombú*

*Hay dos árboles en mi guitarra
tierra erguida de una misma tierra
sí la patria que es amor dividido
divido también mi propio corazón.*

*Sureño en el norte, norteño en el sur
pa' mí el algarrobo es igual que el ombú*

*No pretendo conquistar el cielo
con el rezo que en mis noches rezo
y las notas que en mi canto, canto
no buscan la gloria sino la ilusión.*

*Sureño en el norte, norteño en el sur
pa' mí el algarrobo es igual que el ombú*

Letra y música: Chaqueño Palavecino

1 Introducción

El uso de los frutos del algarrobo en la actualidad es casi inexistente. Los algarrobos han sido ampliamente estudiados como árboles que previenen la desertificación que se define como la degradación de la tierra en regiones áridas, semiáridas y sub-húmedas secas, resultante de diversos factores, incluso variaciones climáticas y actividades humanas. Sólo en Chaco anualmente se cosechan 100.000 t de troncos de algarrobo con el propósito de utilizarlo para la obtención de muebles y pisos (Felker y Guevara, 2003); sin embargo la reimplantación de la especie es casi nula lo que hace que la actividad sea insustentable, debiéndose generar nuevas plantaciones para bajar la presión sobre los ecosistemas nativos (Burkart, 1976, Felker y col., 2003). De varios ejemplares nativos analizados en la Argentina se estimó que la tasa de crecimiento de los mismos es de 0,41mm por año lo que da tasas de rotación para obtener troncos de 40 cm (los que se usan habitualmente) de 100 años (Giménez y col., 1998), pudiéndose mejorar estos valores mediante mejoramiento genético y manejo de los bosques nativos y los rodales.

De lo expuesto en el párrafo anterior se deduce que de los montes de algarrobo nativo se extraen miles de toneladas anuales de madera; lo que genera un marcado problema ecológico, ya que las especies nativas albergan gran cantidad de otras especies vegetales y animales a las que les dan refugio; no obstante eso la eliminación de especies centenarias aporta a la erosión génica de la misma causando una disminución en el pool genético de plantas que pudiesen haber sido útiles para mejorar la especie.

La implantación de grandes extensiones de algarrobos ayudaría a las regiones áridas a detener el avance de la desertificación, fijar grandes cantidades de CO₂ gas de efecto invernadero causal del calentamiento global, fijar N₂ e incrementar la producción de vainas comestibles, ya que una hectárea de algarrobo implantado puede producir hasta 546 kg de vaina, aunque este valor puede llegar hasta 2600 kg si se utilizan variedades de alta productividad (Felker y col., 2001). El hecho de que el algarrobo produzca vainas comestibles lo hizo una especie útil a lo largo de la historia ya que antes del arribo de los Europeos especies como *Prosopis alba*, *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa* eran la mayor fuente de materiales para construcción, combustible y comida de los pueblos originarios.

Tanto el algarrobo blanco (*Prosopis alba*) como el negro (*Prosopis nigra*) tienen un gran potencial para estimular economías locales dado que en la actualidad se pueden conseguir en mercados de las provincias de Santiago del Estero y Chaco, principalmente productos obtenidos a partir de las vainas como puede ser la Aloja, Añapa, Arrope, Patay, la harina, entre otros; todas éstas, preparaciones que se han ido transmitiendo de generación en generación a lo largo de los siglos. Por otra parte se pueden conseguir productos de carácter más moderno aunque parcialmente sustituidos por harina de algarrobo como pueden ser muffins, tortas, bocaditos, merengues, sustitutos de café, de chocolate y un gran número de preparaciones que solo están limitadas a la imaginación de quien manufactura. Estos productos en su mayoría son elaborados por productores artesanales aunque no son solo del Noroeste argentino sino que también provienen de otras regiones ya que el uso de la harina de algarrobo se está popularizando no solo por su carácter dulce sino también por ser una harina apta para la elaboración de dietas para celíacos por su ausencia de prolaminas. A pesar de que se está utilizando la harina de algarrobo que se consigue en negocios de venta de productos dietéticos en la elaboración de diferentes alimentos de producción artesanal, poco o casi nulo es el conocimiento que se tiene hasta el momento de las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales de la harina y de los productos elaborados con ella. Es por esta razón, que previamente a la elaboración de cualquier producto con harina del fruto de algarrobo, es necesario conocer en profundidad los parámetros fisicoquímicos y nutricionales de su materia prima.

2 Objetivos

Dado las comprobadas propiedades nutricionales de su fruto, la importancia regional de este cultivo y la potencialidad de su utilización como ingrediente nutricional en diferentes alimentos, es que los objetivos de esta parte del trabajo fueron:

- Analizar los parámetros morfológicos de las vainas de algarrobo como así también su composición porcentual.
- Obtener harinas de algarrobo blanco (*Prosopis alba*) y negro (*Prosopis nigra*) a partir de las vainas y determinar su composición centesimal, propiedades nutricionales y parámetros físicos de calidad como actividad acuosa e isoterma de adsorción.

- Estudiar la composición de las semillas y de sus constituyentes, a fin de evaluar el aporte nutricional de las diferentes partes del fruto del algarrobo.

3 Materiales y Métodos

3.1 Descripción de las diferentes muestras utilizadas para el análisis

Para la realización de este capítulo se utilizaron vainas de diferentes procedencias y años de recolección, las mismas provinieron de: Ingeniero Juárez (23° 54'S y 63° 51'O), Provincia de Formosa; Santiago del Estero (27° 47' 04''S 64° 16' 01''O), Árraga (28° 06' 03''S 64° 13' 26''O) y Silípica (28° 2' 42''S 64° 13'26''O), Provincia de Santiago del Estero. En la Figura 1.3 se detallan las diferentes vainas, sus procedencias y los usos que se le dio a cada una durante este trabajo ya que a cada vaina en particular se le aplicaron diferentes tratamientos y se las utilizaron para diferentes fines, los que se irán describiendo a lo largo de la tesis.

3.2 Parámetros morfológicos

Tanto para las vainas de algarrobo blanco como para las de algarrobo negro se determinó el peso medio de 100 vainas, porcentaje de semillas por vaina, largo de vainas, peso medio de 100 semillas, largo y ancho de semillas. El largo y ancho de vainas y semillas se determinó con un calibre.

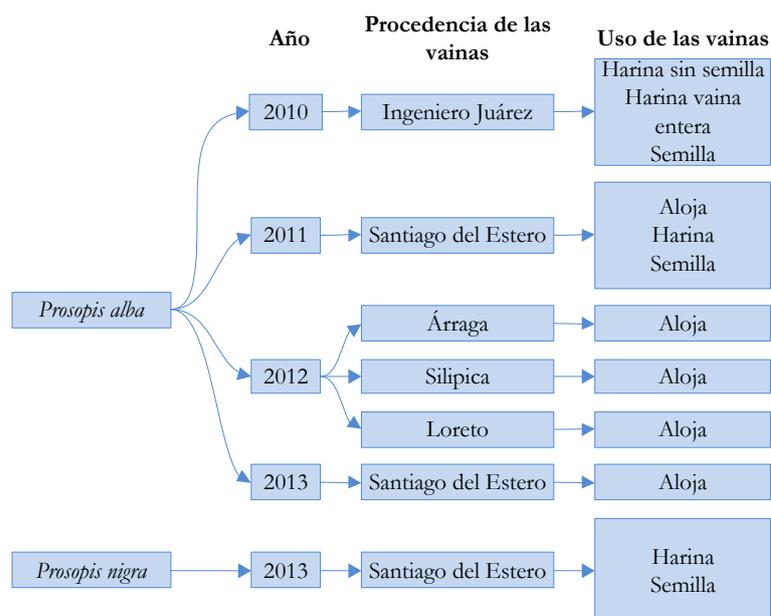


Figura 1.3. Año de recolección procedencia y usos que se les dio a las vainas durante la tesis.

3.3 Obtención de las harinas

De acuerdo a lo que define el Código Alimentario Argentino (Art. 681 tris, en el laboratorio se elaboró harina de algarrobo blanco y harina de algarrobo negro las que se utilizaron para realizar los diferentes ensayos (Figura 1.4).

Un segundo procedimiento consistió en eliminar las semillas de las vainas de algarrobo, con esas vainas sin semillas obtener harina, y contrastar a la misma con harina obtenida de la molienda de la vaina entera. El objetivo perseguido en este ensayo fue el de evaluar las diferencias en la composición de ambas harinas (sin y con semilla), ya que obteniendo harina a partir del fruto al cual se le extrajo la semilla se obtiene por un lado harina de vaina sin semilla y por otro lado semilla de la que se plantea obtener gomas y aislados proteicos. La Figura 1.5 muestra el protocolo de obtención de la harina de vaina de *Prosopis alba* con y sin semilla. El secado de las vainas se realizó en estufa de convección forzada (Sanjor SL60SF, San Andres, Buenos Aires, Argentina) durante 4 h a 80°C. Una vez secas, las muestras se molieron, para ello se utilizó un procesadora doméstica (Moulinex, Aleçon, Francia). Al producto de la molienda de las vainas se las pasó por dos tipos de tamices uno de 1000 μm (#18) y otro de 500 μm (#35) normalizados de acuerdo a la norma ASTM (ASTM, 2013). Las harinas se guardaron a 4°C en heladera hasta el momento de su uso.

En otro ensayo se separaron semillas de las vainas de ambas especies (*P. alba* y *P. nigra*) según se muestra en la Figura 1.6 con la finalidad de analizar las diferentes partes de dichas semillas.

3.4 Codificación de las muestras

Se trabajó con vainas de diferentes orígenes geográficos las que se detallan en la Tabla 1.1, a partir de las cuales se obtuvieron cuatro harinas para la realización de diferentes ensayos, las mismas se detallan en la Tabla 1.2. En cuanto a las semillas se las denominó como SPA (semilla algarrobo blanco) y SPN (semilla de algarrobo negro), obteniéndose 3 fracciones que se especifican en la Tabla 1.3

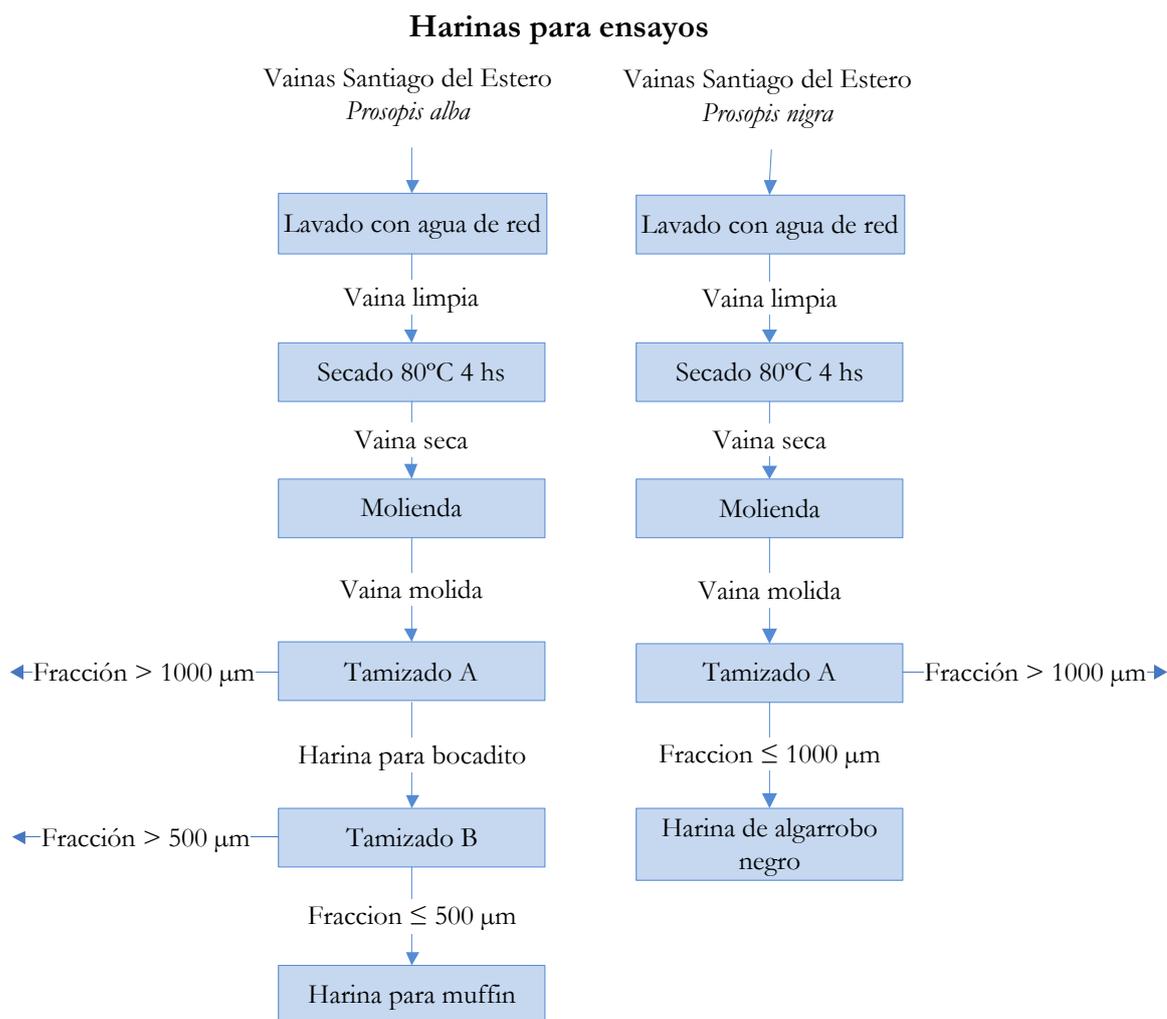


Figura 1.4. Obtención de las diferentes harinas que se utilizaron para la elaboración de diferentes productos.

3.5 Análisis de macro y microcomponentes

No todas las técnicas que se describen a continuación se aplicaron en la totalidad de las muestras, ciertas técnicas se aplicaron para algunas muestras y para otras no, en base a la perspectiva de funcionalidad de la harina.

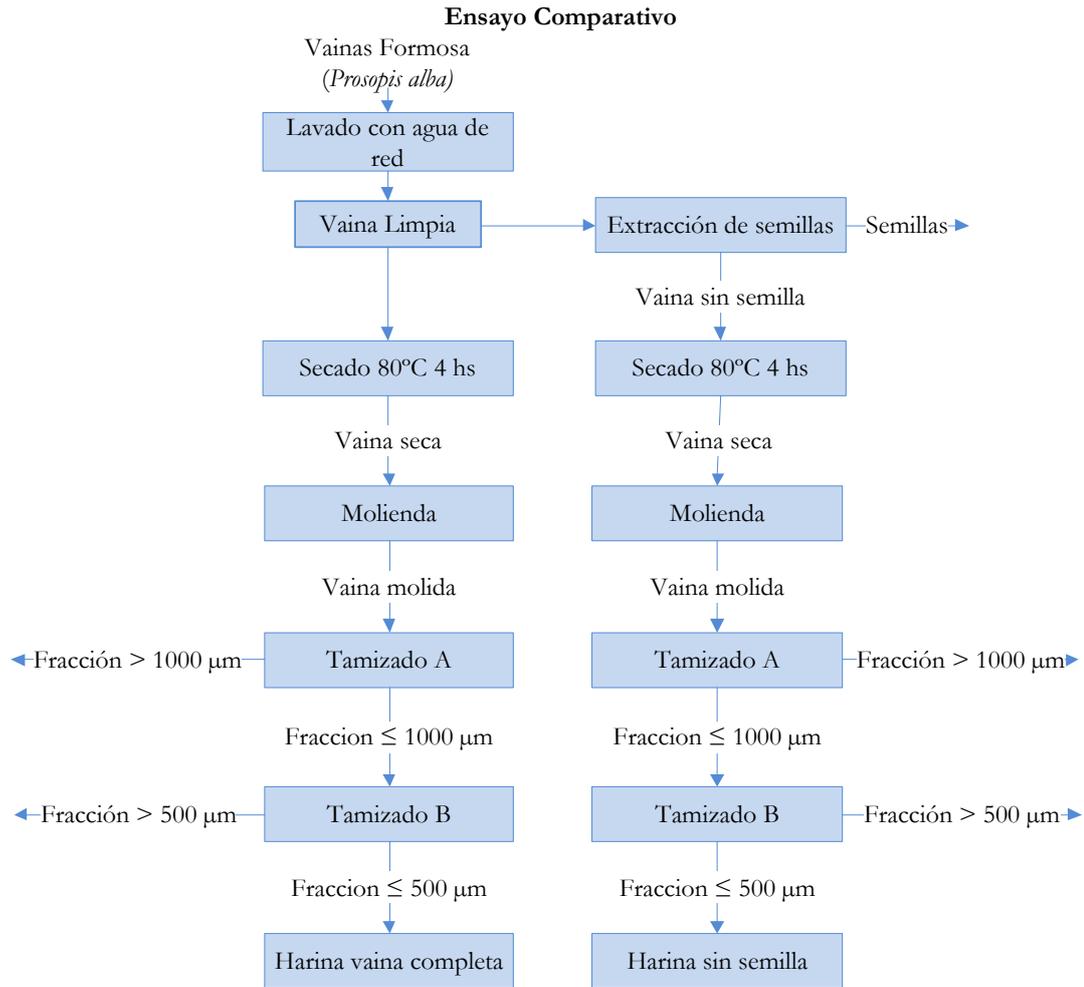


Figura 1.5. Esquema de obtención de las diferentes fracciones de harina de algarrobo: harina de vaina entera y harina de vaina sin semilla

Tabla 1.1. Origen y codificación de las diferentes vainas utilizadas para realizar el trabajo.

Provincia	Especie	Año	Ciudad	Codificación
Formosa	<i>P. alba</i>	2010	Ingeniero Juárez	VA10F
Santiago del Estero	<i>P. alba</i>	2011	Santiago del Estero	VA11S
		2012	Silípica	VA12S
			Árraga	VA12A
			Loreto	VA12L
	2013	Santiago del Estero	VA13S	
	<i>P. nigra</i>	2013	Santiago del Estero	VN13S

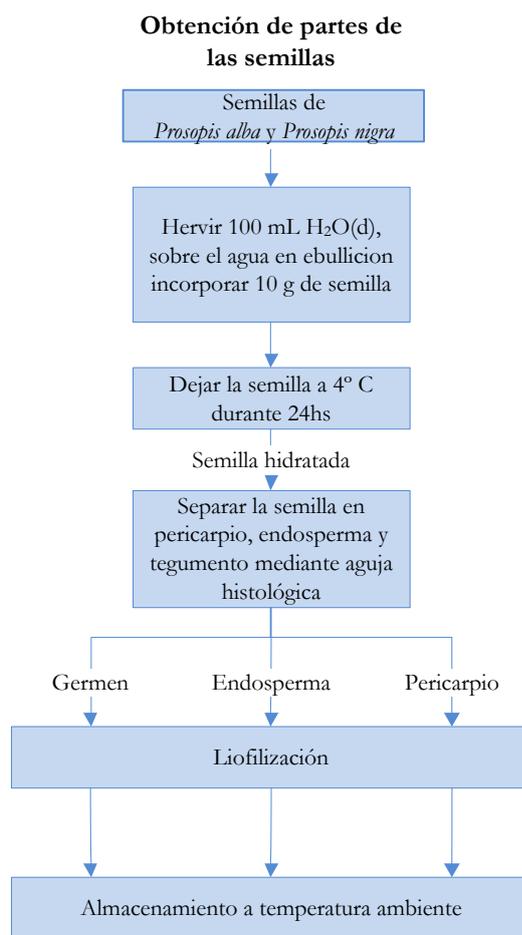


Figura 1.6. Obtención del episperma, endosperma y tegumentos seminales tanto para las semillas de algarrobo blanco como para las de algarrobo negro.

Tabla 1.2. Origen de las harinas utilizadas para los diferentes análisis.

Vaina de partida	Codificación de las harinas
VA10F	H10EF
	H10SSF
VA11S	HA11S
VN13S	HN13S

Tabla 1.3. Origen de las partes de las semillas utilizadas.

Semilla de partida	Codificación para las partes de las semillas	
SPA	Episperma	PPA
	Endosperma	EPA
	Germen	GPA
SPN	Episperma	PPN
	Endosperma	EPN
	Germen	GPN

3.5.1 Humedad (AOAC 925.45)

La humedad de las muestras se determinó a través de un método indirecto, evaluando por diferencia de pesada el agua perdida tras el secado de las mismas a 60°C y a una presión inferior a 50 mmHg, hasta peso constante. Para ello una porción de harina se colocó en un cristizador previamente tarado, se pesó en una balanza analítica (METLER TOLEDO, AL 204) y el conjunto se llevó a estufa de vacío. Luego se retiró y se guardó en un desecador hasta que alcanzó temperatura ambiente y se pesó. Se colocó nuevamente en estufa y se repitió el procedimiento hasta peso constante. El porcentaje de humedad (en base húmeda) se calculó de acuerdo a la Ecuación 1.1.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100 \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Siendo:

m₁: peso del cristizador, en g

m₂: peso del cristizador con muestra húmeda, en g

m₃: peso del cristizador con muestra seca, en g

3.5.2 Cenizas totales (AOAC 900.2)

Para la determinación de cenizas totales se siguieron los siguientes pasos:

- a- Limpieza por calcinación de las cápsulas de porcelana vacías en mufla a 900°C durante 2 horas.
- b- Enfriamiento de las cápsulas de porcelana en desecador hasta temperatura ambiente.
- c- Pesado de las cápsulas de porcelana y de las muestras en balanza analítica.
- d- Carbonización de las muestras mediante mechero con triángulo de pipas.
- e- Obtención de ceniza mediante mufla durante 6 h a 525°C (en el caso en que las cenizas quedaran con puntos negros se les agregó una gota de H₂O (bd) y se le hizo otro ciclo de calcinación).
- f- Una vez obtenidas cenizas de color grisáceo se las pesó y se obtuvo el porcentaje de ceniza en base húmeda de acuerdo a la Ecuación 1.2.
- g- A las cenizas de ciertas muestras se las guardo para la determinación de minerales.

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m} * 100 \quad \text{Ecuación 1.2}$$

m_1 : peso de la cápsula de porcelana, en g.

m_2 : peso de la cápsula con la muestra tras la incineración, en g.

m : peso de la muestra, en g.

3.5.3 Minerales

Las muestras de cenizas se disolvieron en solución acuosa de ácido nítrico (1:1) y los minerales se analizaron mediante espectroscopia de absorción atómica (Shimadzu AA-6650, Kyoto, Japón). El calcio se determinó diluyendo las muestras en óxido de lantano a concentración final de 0,5% p/v. El hierro, calcio, zinc y magnesio se determinaron por espectroscopia de absorción atómica usando una lámpara de cátodo vacío del mismo metal. El potasio se determinó por espectroscopia de emisión. Las longitudes de onda fueron: 248,3 nm (Fe), 422,7 nm (Ca), 285,2 nm (Mg), 766,9 nm (K) y 213,9 nm (Zn).

Para la determinación de sodio se utilizó el método 325 B (APhA, 1985). Se diluyó el extracto nítrico hasta concentración apropiada en HNO₃ 0,14N con cloruro de potasio 0,5% p/v. La disolución se filtró por membrana de 0,45 micrones. Se realizaron curvas de calibración con patrón certificado. Se determinó sodio (Na) por emisión atómica con aspiración directa a longitud de onda de 589,6 nm utilizando tipo de llama oxidante.

En todos los ensayos se utilizó acetileno como combustible y aire como oxidante, y todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.5.4 Proteínas (AOAC 920.152)

El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Kjeldahl en un equipo semiautomático BÜCHI K350 (Suiza). En este método se determina el contenido total de nitrógeno (N) tras digerir la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado en presencia de sulfato de cobre y sulfato de sodio como catalizadores. El N orgánico pasa a amoníaco (que queda retenido como sulfato de amonio). Por neutralización con NaOH 32% p/v y destilación se libera el NH₃ y se recoge en medio ácido (solución de ácido bórico 4% p/v). Para determinar el punto final de la titulación, se empleó el indicador de Mortimer (Ver Anexo Capítulo I). Se utilizó como factor de conversión de porcentaje de

nitrógeno a porcentaje de proteína el factor 6,25 siendo el valor que la AOAC recomienda para frutos. Para el cálculo se utilizó la Ecuación 1.3.

$$Proteínas (\%) = (V_m - V_b) * N_{HCl} * 0,014 \frac{g}{meq} * \frac{100}{m} * 6,25 \quad \text{Ecuación 1.3}$$

V_b : volumen de HCl gastado en la valoración del blanco

V_m : volumen de HCl gastado en la valoración de la muestra

N_{HCl} : normalidad del HCl utilizado

0,014: gramos por mili-equivalente de N

6,25: factor de conversión de nitrógeno a proteína

m : peso de la muestra en gramos

3.5.5 Determinación de nitrógeno no proteico

En tubos de centrifuga Beckman® de 50 mL de capacidad se pesó 1g de muestra, a cada tubo se le agregó un buzo para homogeneizar la muestra y 10 mL de agua bidestilada medidos con pipeta de doble aforo. A los tubos se los dejó durante 60 minutos en agitación, una vez pasado ese tiempo se les agregó 10 mL de ácido tricloroacético 24% p/v (TCA) (Sivaraman y col., 1997) medido con pipeta de doble aforo dejándolo una hora más en agitación. Pasada la hora se centrifugaron los tubos a 17000 g durante 15 minutos, del sobrenadante obtenido se transfirieron 10 mL a un tubo Kjeldahl; a partir de ese punto se siguieron los pasos del protocolo para determinar proteínas de la AOAC 920.152 explicado en el punto anterior.

3.5.6 Lípidos (AOAC 963.15)

Esta determinación se realizó por el método de Soxhlet. Las muestras se pesaron en cartuchos armados con papel de filtro; una vez pesadas las muestras se ensambló el equipo de extracción que consta de un extractor en el cual se introduce el cartucho, un refrigerante que impide la evaporación del solvente y un balón exactamente pesado en el cual se recoge la muestra. Para la extracción se utilizó éter de petróleo de punto de ebullición entre 35-60°C y se realizaron siete sifonadas por muestra, lo que se considera suficiente para una extracción satisfactoria. Luego se evaporó el solvente de los balones

mediante rotavapor y se pesó para obtener el extracto etéreo. El contenido de lípidos se expresó en forma porcentual siguiendo la Ecuación 1.4.

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{(m_2 - m_1)}{m_3} * 100 \quad \text{Ecuación 1.4}$$

m₁: peso del balón vacío en g

m₂: peso del balón con residuo lipídico en g

m₃: peso de la muestra en g

3.5.7 Fibra Dietaria Total (AOAC 991.43)

La determinación de fibra dietaria total se realizó por el método enzimático gravimétrico (TOTAL DIETARY FIBRE KIT ASSAY, Megazyme International Ireland Limited). Se pesó $1 \pm 0,001$ g de muestra, la cual fue disuelta en tampón MES-TRIS pH 8,2. Luego se sometió a tratamiento enzimático; primero a través de alfa-amilasa termo-resistente, luego mediante una solución de proteasa y por último con una alfa-glicosidasa. Una vez acabada la digestión enzimática se adicionó alcohol etílico al 95% para la precipitación de la fibra soluble. El residuo obtenido previa filtración se lavó sucesivamente con alcohol 70%, alcohol 95% y acetona. Se secó en estufa a 105 °C, se dejó enfriar en desecador y se pesó.

Después de la pesada se determinó el contenido de proteína y cenizas del residuo contenido en las cápsulas, tanto de las muestras como del blanco. El porcentaje de fibra se calculó siguiendo la Ecuación 1.5.

$$\text{Fibra dietaria total (\%)} = \frac{(R_T - P - C - B_t)}{M} * 100 \quad \text{Ecuación 1.5}$$

R_T: residuo total de la muestra = (P₂ - P₁)

P₁: peso inicial de la cápsula limpia y seca

P₂: peso de la cápsula con el residuo

B_t: residuo total del blanco = (B₂-B₁) - P_b - C_b

B₁: peso de la cápsula limpia y seca del blanco

B₂: peso de la cápsula con el residuo del blanco

P_b: contenido de proteínas del blanco

C_b: contenido de cenizas del blanco

M: masa de muestra inicial

C: contenido de cenizas

P: contenido de proteínas

3.5.8 Fibra dietaria insoluble (FDI)

Se utilizó la misma técnica que para la realización de fibra dietaria total, con la diferencia que no se precipita la fibra soluble con etanol al 95% lo que hace que no quede retenida en los filtros y no se cuantifique en la pesada.

3.5.9 Obtención de extractos para cuantificación de polifenoles y antioxidantes

Para los ensayos de antioxidantes y polifenoles se realizó una extracción con solución acuosa de acetona al 50% v/v modificando la técnica de Papagiannopoulos y col. (2004). La extracción se llevó a cabo en tubos con tapa a rosca con una relación solvente de extracción:muestra de 6:1 que se agitaron en un termobloque Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a una velocidad de 650 rpm a 4°C durante 40 minutos. Luego se centrifugó en centrifuga Eppendorf 5430 a 2655 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para cuantificar polifenoles y antioxidantes.

3.5.10 Determinación de polifenoles solubles

A 50 µL del extracto acetónico descrito anteriormente se le agregó H₂O (bd) para completar un volumen de 2350 µL, luego se agregaron 50 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se esperaron 3 minutos y se incorporaron 100 µL una solución de Na₂CO₃ 20% p/v preparada en una solución de NaOH 0,1M (Singleton y col., 1999) y se esperaron 90 minutos para que se complete la reacción. La medida se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Mini 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) a una absorbancia de 765 nm utilizando ácido gálico como patrón. La concentración de polifenoles se expresó en equivalentes de ácido gálico cada 100 g de materia seca (GAE/100g b.s.) de acuerdo a Zaro y col. (2014).

3.5.11 Capacidad antioxidante sobre radical ABTS^{•+}

La capacidad antioxidante sobre el radical ABTS^{•+} (ácido [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)]) se midió en el sobrenadante del extracto acetónico,

descrito anteriormente. El ensayo fue realizado de acuerdo a Re y col. (1999). A 10 μ L de extracto acetónico se le agregaron 1000 μ L de ABTS^{•+}, se mezcló con vortex y se incubó durante 20 minutos y se midió absorbancia a 734 nm; los blancos se determinaron sólo con acetona para comprobar la estabilidad del ABTS^{•+}. Las muestras se ensayaron por duplicado. Se utilizó Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) como estándar y los resultados se expresaron como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) en μ mol Trolox / 100 g b.s.

3.5.12 Factor antinutricional por inhibición de la tripsina pancreática

Para determinar si la muestra contenía sustancias que inhiben a la tripsina se siguió el método de Gonzales y Carrillo (1987), Sobral y Wagner (2009). Los extractos de inhibidores se prepararon mezclando 1g de harina de algarrobo, utilizando 1 g de poroto de soja como control positivo de reacción con 30 mL de HCl 0,05N durante 15 minutos. Se dejaron reposar durante 24 horas en la heladera; se centrifugaron a 1300 g durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un vaso de precipitado y se llevó a pH 8 con solución saturada de Na₂CO₃, luego se llevó a volumen en matraz de 25 mL con el buffer fosfato de sodio. Simultáneamente se prepararon soluciones de tripsina de páncreas porcino (90 U/mg), (10 mg/mL) (Sigma Aldrich, Missouri, UnitedStates); hemoglobina bovina adecuada como sustrato para proteasa (Sigma Aldrich-ver Anexo Capítulo I), buffer fosfato de sodio pH 8, reactivo de Folin Cicalteau 33 % v/v, TCA 5 % p/v. La Figura 1.7 muestra el protocolo utilizado para determinar el porcentaje de inhibición.

Se obtuvieron tres lecturas de absorbancia, una para el control, una para el blanco y una para la muestra. A partir de dichas lecturas se calculó la actividad antitriptica de la muestra siguiendo la Ecuación 1.6, Ecuación 1.7 y Ecuación 1.8.

$$Abs_c - Abs_B = 100 \% A_T \quad \text{Ecuación 1.6}$$

$$Abs_m - Abs_B = \% A_T \quad \text{Ecuación 1.7}$$

$$100 - \% A_T = \% I_T \quad \text{Ecuación 1.8}$$

Abs_c Absorbancia del control sin muestra

Abs_b Absorbancia del blanco

Abs_m Absorbancia de la muestra

A_T Actividad de la tripsina

I_T Inhibición de la tripsina

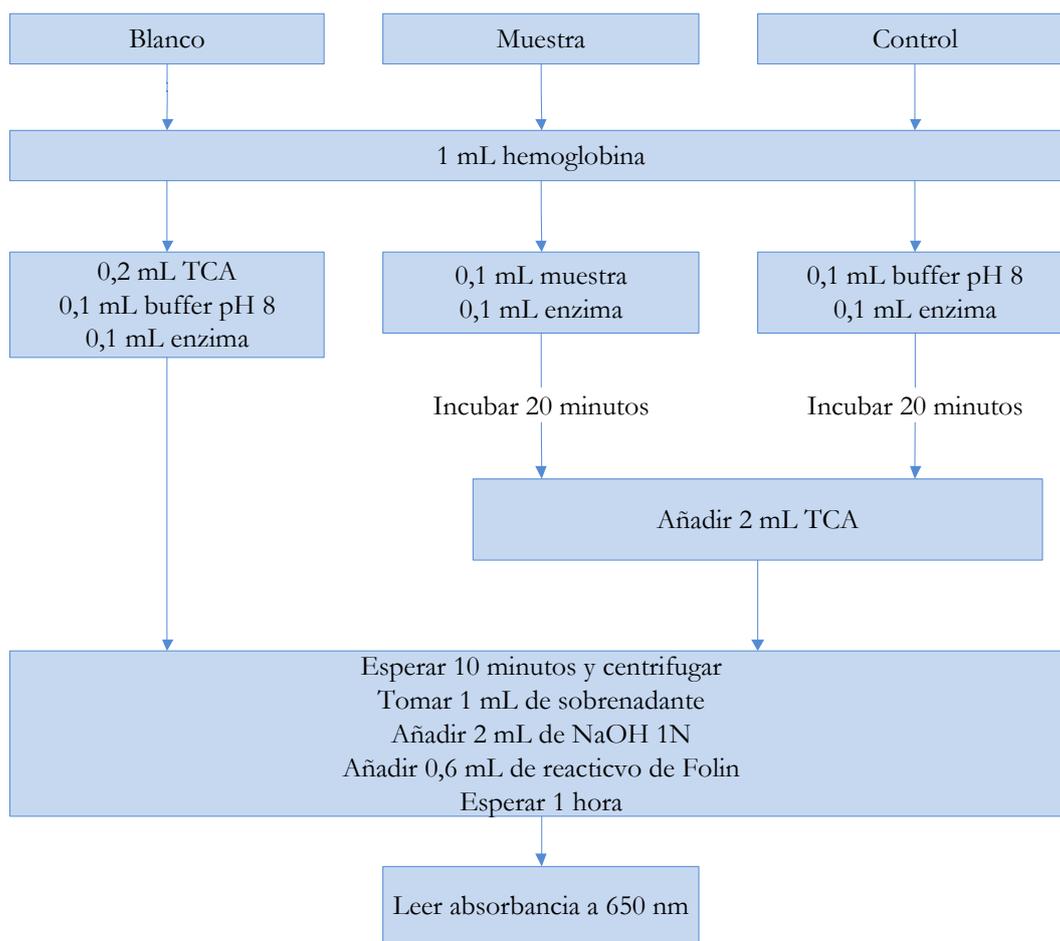


Figura 1.7. Protocolo de determinación de inhibición de tripsina.

3.5.13 Obtención de extractos acuosos para determinación de azúcares

Para extraer azúcares para la determinación por HPLC se utilizó la técnica descrita por Eliasson (2006), para la cual se pesaron 1 gramo de cada muestra a analizar en tubos con tapa a rosca, se desgrasaron las muestras con hexano en termobloque (Eppendorf) durante 1 h 650 rpm 40°C; luego se centrifugaron 10 minutos a 2655 g, se descartó el sobrenadante y las muestras se llevaron a estufa 1 h a 70°C para evaporar el resto de hexano. Luego se le agregó al tubo 13 mL de agua H₂O (mq), 1 mL de solución de Carrez A y 1 mL de solución de Carrez B (ver Anexo Capítulo I); se calentó en termobloque con agitación constante durante 30 minutos a 70°C, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se le agregaron 10 mL de acetonitrilo y se centrifugó la muestra 10 min a 2655 g. El sobrenadante se filtró con membranas de 0,44 µm (Sartorius, Goettingen, Alemania).

3.5.14 Determinación de azúcares por HPLC

A los extractos acuosos obtenidos de acuerdo al punto anterior se les determinó azúcares simples por medio de un cromatógrafo líquido Waters 1525 (Waters Corporation, Massachusetts, United States) equipado con un detector de índice de refracción Waters 2014. La separación isocrática de los azúcares fue realizada a un flujo de 1,2 mL/min a través de una columna Hypersil Gold Amino 250 x 4.6 con un tamaño de partícula de 5 µm (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, United States). Una solución de acetonitrilo-agua 80:20 fue utilizada como fase móvil, la que se filtró mediante filtro de membrana de 0,22 µm. La columna fue mantenida a 35°C, el eluente de la columna ingresó al detector de índice de refracción con una sensibilidad de 16. Los azúcares estándar utilizados fueron glucosa, fructosa y sacarosa (Sigma Aldrich, Missouri, United States) preparados en fase móvil, filtrados con filtros de 0,44 µm e inyectados por duplicado en concentraciones crecientes de 1 a 20 mg/mL a los que se les determinó las áreas y tiempos de retención utilizando el software PeakFit V4.12 (Framingham, MA, USA). Una vez determinadas las áreas se realizó una regresión lineal con la concentración que permite con las áreas de las muestras calcular las concentraciones utilizando la curva de calibración. Las muestras se prepararon de la forma descrita para los patrones y se corrieron en iguales condiciones.

3.5.15 Análisis de proteínas por SDS-PAGE

3.5.15.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de las proteínas de la semilla se utilizó el germen liofilizado obtenido de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, el protocolo de extracción se muestra en la Figura 1.8. El objetivo del primer lavado con hexano fue el de eliminar las sustancias grasas que tiene el germen, el lavado con la solución de acetona 50% v/v es para eliminar cualquier rastro que pueda existir de polifenoles en la muestra ya que los mismos interfieren con las electroforesis. El procedimiento que se muestra en la Figura 1.8 se realizó para el germen tanto de *Prosopis alba* como el de *Prosopis nigra*. Se utilizaron 3 tubos por muestra los que se indican a continuación:

Tubo 1- 500 µL Buffer de extracción (Ver Anexo Capítulo I).

Tubo 2- 500 µL Buffer de extracción + SDS 2%.

Tubo 3- 500 µL Buffer de extracción + SDS 2% + DTT 0,5%.

El SDS es un agente desnaturizante y el DTT es un agente reductor de puentes disulfuro.

Para separar las proteínas se utilizó un equipo Mini-PROTEAN® III (Bio-Rad, California, USA), utilizando como sistema geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Para este caso se utilizó un sistema discontinuo el que cuenta con un gel apilador (pH 6,8) en el cual se siembra la muestra de proteínas a analizar y un gel separador o de corrida (pH 8,8) de mayor tamaño de poro que el anterior (ver Anexo Capítulo I).

3.5.15.2 *Separación de proteínas*

Con el fin de separar las subunidades de proteínas extraídas se utilizó el método de electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida (PAGE) descrito ampliamente por Hames (1998). Las proteínas presentan una carga eléctrica neta y si se encuentran en un medio de pH diferente a su punto isoeléctrico (pI) se desplazan cuando se las someten a un campo eléctrico como es el caso de la electroforesis. En la PAGE las proteínas migran de acuerdo a la carga y al tamaño, es decir a su relación carga/masa. La SDS-PAGE es una electroforesis en la que se emplea dodecil sulfato sodio (SDS) como agente desnaturizante de las proteínas. El SDS al ser un detergente aniónico tiene la particularidad de cargar negativamente a las proteínas, por lo que las mismas migran por el campo eléctrico de acuerdo a su tamaño. Las más pequeñas lo hacen más rápido que las más grandes, permitiendo a la SDS-PAGE la separación de diferentes fracciones proteicas. En el gel apilador (4%) que tiene mayor tamaño de poro es en donde se siembran las muestras y permite apilar las proteínas antes de entrar al gel separador (12%), siendo este último un gel de tamaño de poro más pequeño y es en donde se hace la separación de las subunidades. La composición de ambos geles se describe en el Anexo Capítulo I.

En el gel se sembraron 10 µL de muestra por calle y 3 µL de patrón. Luego de la corrida los geles fueron coloreados durante 24 h en agitación con una solución 16:40:40:2 de ácido acético (16% v/v), metanol (40%v/v), H₂O (40%v/v) y colorante Coomassie Blue (2% v/v). La decoloración se realizó con una solución similar a la de tinción (25:10:65) compuesta por metanol (25%v/v), ácido acético (10%v/v) y agua

(65%_{v/v}). Una vez decolorados los geles se almacenaron sumergidos en agua destilada para su posterior análisis.

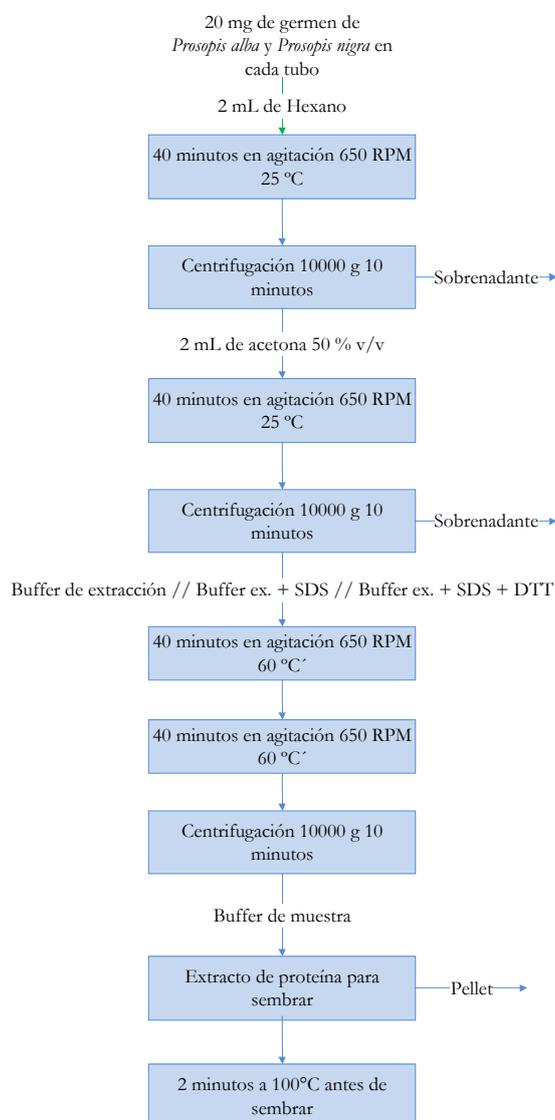


Figura 1.8. Protocolo de extracción de proteínas del germen.

3.5.15.3 Caracterización e identificación de subunidades

Las masas moleculares de las subunidades proteicas se calcularon utilizando como proteínas estándar los patrones de baja masa molecular de Amersham (GE, U.S.A): 97 (fosforilasa b), 66 (albumina), 45 (ovoalbúmina), 30 (anhidrasa carbónica), 20,1 (inhibidor de tripsina) y 14,4 (α -lactoalbúmina) kDa. Las masas moleculares se calcularon utilizando el software informático denominado Sigma-Gel (JandelScientific – Versión 1.0-1994-1995).

3.5.15.4 *Detección de prolaminas*

La ausencia/presencia de prolaminas se determinó utilizando el método de ELISA de tipo competitivo con anticuerpos policlonales desarrollado por Chirido y col. (1995). El método de ELISA competitivo se basa en el uso de anticuerpos anti-gliadina policlonales provenientes de conejos. La muestra se trató con etanol al 70% v/v para extraer las posibles prolaminas, al extracto se le agregó una dilución adecuada de anticuerpos policlonales, lo mismo se realizó con la solución de patrones y se incubó 2 h a 37°C. La solución pre-incubada se agregó a una placa micro-tituladora que contiene gliadinas y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego se agregó peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpo de cabra anti-conejo IgG (BioRad) y se incubó 1 hora a 37°C. La reacción se reveló con o-fenilenediamina. La reacción enzimática se finalizó luego de 20 minutos con H₂SO₄ 2M. Se determinó la densidad óptica a 490 nm.

3.5.16 **Determinación de galactomananos**

3.5.16.1 *Extracción*

Para la determinación de los galactomananos tanto de *Prosopis alba* como de *Prosopis nigra* se utilizaron las gomas extraídas de las semillas. Se analizaron los alditoles peracetilados correspondientes a los azúcares generados por hidrólisis ácida de las mismas. Las muestras se hidrolizaron a 120°C en TFA 2N durante 1,5 h. Posteriormente se evaporó el ácido y los azúcares generados se redujeron con NaBH₄. Finalmente se acetilaron con anhídrido acético-piridina y los productos se extrajeron con cloroformo. La mezcla de alditoles peracetilados generados se inyectaron en el cromatógrafo gaseoso (CGL).

3.5.16.2 *Análisis cromatográfico*

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se usó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron con una relación de split 90:1. Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de la fase líquida. El flujo del gas portador fue de 1 mL/min y la presión en cabeza de columna fue de 15 Psi. Se realizó una corrida de 200°C a 230°C a una velocidad de 2°C/min. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 240°C.

Con la finalidad de identificar componentes menores, se realizaron corridas en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa (equipo Shimadzu GCMS-QP 5050 A, a un potencial de ionización de 70 eV). Las condiciones de CGL fueron idénticas a las descriptas previamente.

3.5.17 Determinación de ácidos grasos

3.5.17.1 Extracción de lípidos para determinar el perfil de ácidos grasos

Para la extracción de la materia grasa de la muestra se utilizó el método de Folch. Se pesó un Erlenmeyer de 250 mL con tapa una cantidad adecuada de muestra como para obtener 500 mg de lípidos. Por cada gramo de muestra pesada se le agregó 20 mL de mezcla cloroformo / metanol 2:1 (grado HPLC). Se agitó 20 minutos a 20°C. Se destapó y dejó decantar. Se filtró en embudo con papel de filtro y se recogió el sobrenadante en tubos de centrífuga de 50 mL con tapa a rosca. El solvente (cloroformo:metanol, 1:1) se lavó con solución fisiológica (4 mL solvente cada 20 mL de solución), se agitaron los tubos en vortex. Se centrifugó a 400 g durante 5 minutos. Se removió la fase superior y la inferior se trasvasó a un balón que luego se evaporó con rotavapor a 40-45°C hasta el final. Se solubilizó la fase grasa con hexano calidad GC. Se pasó al tubo derivatizador, al que se le eliminó el cloroformo con corriente de N₂. La derivatización se realizó utilizando metóxido de sodio para formar esteres metílicos de acuerdo a la norma IRAM 5650 parte II (IRAM, 1982).

3.5.17.2 Análisis cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Claurus 500 equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se usó nitrógeno como gas portador. Se utilizó una columna capilar Supelco SP-2560 de 100 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de la fase líquida, el flujo del gas portador fue de 1,3 mL/min. Se realizó una corrida de 150°C a 210°C. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 240°C y 280°C, respectivamente. La identificación de los ácidos grasos se realizó contra patrones SUPELCO FAME Mix NHI-C y FAME Mix C14-C22.

3.5.18 Análisis de aminoácidos

Se hidrolizaron muestras de germen de *Prosopis alba* y *P. nigra* en cantidad que contuvieran 2 mg de proteína, con 1,5 mL de HCl 6M. Las soluciones se colocaron en

tubos con atmósfera de nitrógeno, se sellaron e incubaron a 110°C durante 24 h. Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) de acuerdo al método de Alaiz y col. (1992) modificado por Cian y col. (2015). Los aminoácidos se derivatizaron a 50°C durante 50 min con exceso de dietil etoximetilenmalonato usando ácido D,L- α -aminobutírico como estándar interno. Se utilizó un HPLC Modelo Agilent Serie 1100 con detector de longitud de onda variable VW (Santa Clara, CA, USA) equipado con una columna de fase reversa de 300 x 3,9 mm de diámetro interno (Novapack C18, 4 m; Waters) mantenida a 18°C. Se utilizó para la elución un gradiente binario a una velocidad de flujo de 0,9 mL/min. Los solventes usados fueron acetato de sodio (25 mmol /L) conteniendo azida sódica (0,02 g/100 mL) pH 6,0 (A) y acetonitrilo (B). La elución se llevó a cabo de la siguiente forma: 0,0 a 3,0 min con gradiente lineal desde A/B (91/9) a A/B (86/14); 3,0 a 13,0 min con A/B (86/14); 13,0 a 30,0 min con A/B (86/14) a A/B (69/31); 30,0 a 35,0 min con A/B (69/31). Los aminoácidos eluidos fueron detectados a 280 nm. El triptófano se determinó por RP-HPLC luego de una hidrólisis alcalina según el método de Yust y col. (2004).

3.6 Características físicas de las harinas

3.6.1 Color de las harinas

El color de las harinas de algarrobo se midió con un colorímetro triestímulo (Minolta CR400, Osaka, Japón) mediante la obtención de los valores L^* , a^* y b^* del espacio de color CIELab. Se realizaron 20 replicados de cada muestra.

Dónde “a” es la coordenada verde-rojo con valores negativos hacia el verde y positivos hacia el rojo, “b” la coordenada azul-amarillo con valores negativos hacia el azul y positivos hacia el amarillo, y L la luminosidad (coordenada perpendicular al plano a-b) que toma valores de 0 a 100, correspondiendo 100 al mayor valor de luminosidad.

3.6.2 Actividad acuosa (a_w) e isothermas de adsorción de las harinas

Las actividades acuosas e isothermas de adsorción se realizaron con las muestras HA11S y HN13S. Conocer la relación entre el contenido de humedad y la actividad acuosa (a_w) se ha considerado de importancia en los últimos tiempos, ya que permite a los

productores de alimentos realizar un seguimiento de la calidad de sus productos. El deterioro de los alimentos puede deberse a diferentes mecanismos: crecimiento microbiano, oxidación lipídica, pérdida de antioxidantes entre otros (Figura 1.9); y la a_w es un parámetro que está en relación directa con dicho deterioro. Por lo tanto conocer la a_w de las harinas permitirá establecer normas para su adecuado almacenamiento.

Las isoterma relacionan el contenido de humedad en el equilibrio (kg agua/100 kg materia seca) a una temperatura constante con la actividad termodinámica del agua del producto a un rango de humedades determinado (Rangel–Marrón y col., 2010). Si se parte de un alimento deshidratado se observará un comportamiento de adsorción y si se parte de un alimento húmedo un comportamiento de desorción. Para estimar teóricamente este comportamiento en productos ricos en azúcares se han sugerido en literatura un gran número de modelos, no encontrándose hasta el momento un modelo que pueda describir todos los alimentos.

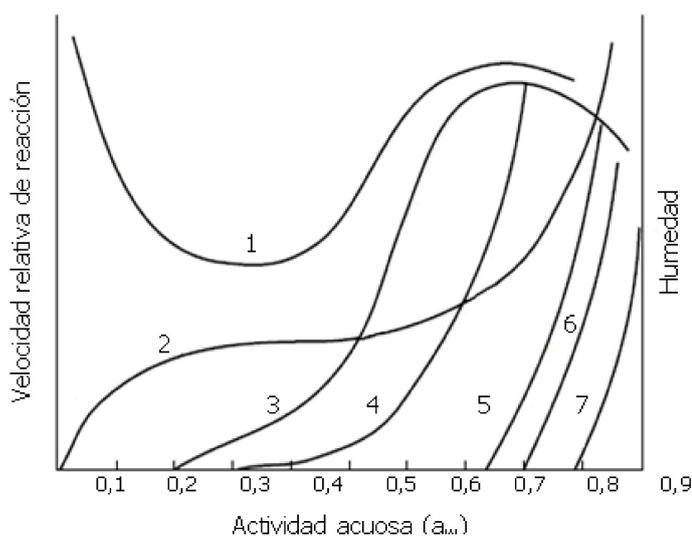


Figura 1.9. Velocidad de alteración de los alimentos según su actividad acuosa: 1-Oxidación de lípidos, 3- Pardeamiento no enzimático, 4- Actividad enzimática, 5-Mohos, 6-Levaduras, 7- Bacterias. Isoterma de sorción: curva 2 con lectura de las ordenadas del lado derecho.

3.6.2.1 Actividad acuosa a 20°C (a_w)

La actividad acuosa (a_w) se determinó utilizando el método estático gravimétrico a temperatura controlada de 20°C. Se pesaron muestras de harina de $1 \pm 0,01$ g a las cuales se les determinó previamente la humedad; éstas se introdujeron en sistemas cerrados herméticamente que contenían cada uno una solución sobresaturada de una sal de a_w conocida, en el rango de 0,089 a 0,544 (Tabla 1.4). Se consideró que las muestras estaban

equilibradas con el medio cuando la diferencia entre pesadas consecutivas resultó menor o igual al 3%. Una vez que la muestra llegó al equilibrio se graficó la diferencia de humedad inicial y en el equilibrio Dif_H (kg H₂O / kg muestra seca) en función de la a_w . Los puntos se ajustaron a un modelo matemático y la a_w de las harinas se interpoló del modelo cuando el valor de la diferencia fuera igual a cero.

3.6.2.2 *Determinación y modelado de las isotermas de adsorción*

Las isotermas de adsorción se realizaron a partir de una muestra totalmente seca, para lo cual se deshidrató la harina en una estufa de vacío a 70°C y 50 mmHg hasta peso constante. Todas las determinaciones de las isotermas se realizaron por triplicado. Se pesó una masa de $1 \pm 0,01$ g, la que se dejó llegar al equilibrio dentro de frascos como el de la Figura 1.10.



Figura 1.10. Cámara para la determinación de actividad acuosa e isoterma de adsorción por el método estático gravimétrico. a-Frasco, b-muestra, c-porta muestra, d- soporte, e- solución salina sobresaturada.

Para la construcción de la isoterma se utilizaron soluciones sobresaturadas de sales de a_w conocida en el rango de 0,089 a 0,867; dichas sales en orden ascendente según su a_w son: NaOH, LiCl, KC₂H₃O₂, MgCl₂, K₂CO₃, Mg(NO₃)₂, NaNO₂, NaCl y KCl. El valor de a_w para cada sal varía en función de la temperatura como se muestra en la Tabla 1.4. A los sistemas que tuvieran una a_w mayor a 0,6 se les agregó un eppendorf conteniendo tolueno para inhibir el crecimiento microbiano (especialmente el de hongos filamentosos). Las temperaturas elegidas para realizar las isotermas de adsorción fueron 10°C, 20°C y 40°C las cuales se mantuvieron constantes a lo largo del ensayo mediante el uso de cámaras de temperatura controlada.

Tabla 1.4. Actividad acuosa de las soluciones de sal en función de la temperatura.

Sal	a_w 10°C	a_w 20°C	a_w 40°C
NaOH	0,096	0,089	0,063
LiCl	0,113	0,113	0,112
KC ₂ H ₃ O ₂	0,245	0,234	0,208
MgCl ₂	0,340	0,330	0,320
K ₂ CO ₃	0,431	0,432	0,433
Mg(NO ₃) ₂	0,574	0,544	0,484
NaNO ₂	0,654	0,654	0,614
NaCl	0,760	0,757	0,747
KCl	0,879	0,867	0,843

3.6.2.3 Modelado de las isotermas de adsorción

La relación entre la humedad en el equilibrio H_e (kg agua / kg muestra seca) y la a_w de la harina de algarrobo fue predicha utilizando cuatro ecuaciones representando modelos habitualmente utilizados en alimentos: BET (Ratti, 2009), Halsey (Halsey, 1948), Iglesias-Chirife (Andrade y col., 2011) y Leiva Diaz (Leiva Díaz y col., 2009) (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Modelos matemáticos aplicados a las isotermas de adsorción.

Referencia	Modelo	
BET (1938)	$He = \frac{a_w * X_m * C_{BET}}{(1 - a_w) * (1 + (C_{BET} - 1) * a_w)}$	Ecuación 1.9
Halsey (1948)	$He = \left(\frac{-A_H}{\ln a_w} \right)^{B_H}$	Ecuación 1.10
Iglesias-Chirife (1976)	$He = A_I * \left(\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right) + B_I$	Ecuación 1.11
Leiva Diaz (2009)	$He = C1 * e^{(C2*(a_w)^{C3})}$	Ecuación 1.12
<p>H_e (humedad en el equilibrio, kg agua / kg muestra seca); X_m la humedad de monocapa; C_{BET}, A_H, A_I, B_H, B_I, K, $C1, C2, C3$ son constantes; a_w (actividad acuosa)</p>		

La bondad de ajuste de los modelos fue evaluada en términos de porcentaje del error cuadrático medio % ECM (Ecuación 1.13), el que predice las diferencias entre el contenido experimental de humedad y el predicho. El valor calculado debe ser menor al 10% para considerar el modelo como válido (Rangel-Marrón y col., 2010).

Todos los parámetros de las ecuaciones fueron obtenidos mediante la técnica de regresión no lineal utilizando el programa OriginPro 9[®] de OriginLab[®] como así también la evaluación del error cuadrático medio.

$$\% ECM = \left(\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{H_{exp} - H_{pre}}{H_{exp}} \right)^2} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 1.13}$$

Donde n es el número de valores del experimento, H_{exp} el valor experimental de la humedad en el equilibrio y H_{pre} el valor predicho de la humedad en el equilibrio.

3.7 Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis fueron realizados por duplicado a excepción de aquellos en los que se ha hecho la aclaración en el texto. Las variables fueron analizadas mediante análisis de la varianza (ANOVA). El test de Fisher (LSD) fue utilizado para comparar la varianza de los valores medios. El nivel de significancia aceptado fue del 5% del nivel de probabilidad. El software estadístico utilizado para los análisis fue OriginPro 9[®] (OriginLab[®], Northampton, Estados Unidos).

3.8 Resultados y Discusión

3.8.1 Parámetros morfológicos de vainas y semillas

La Figura 1.11 y Figura 1.12 muestra la morfología de las vainas y semillas de *Prosopis alba* y *nigra*, respectivamente. La cuantificación de los parámetros morfológicos se realizó sobre 100 vainas y 100 semillas de vainas VA10F y VN13S con las que se determinaron los parámetros expresados en la Tabla 1.6. La vaina de *Prosopis nigra* es un tanto más pequeña que la de *Prosopis alba* y contiene menor número de semillas. Bravo y col. (1994) reportaron para *Prosopis pallida* un tamaño de vaina de 19 x 1,6 cm y un peso promedio de 12 g, lo que demuestra que esta especie tiene un fruto de mayor tamaño que los de VA10F y VN13S y con un número de semillas igual al de VA10F pero mayor al de VN13S, siendo el peso de las semillas mayor que para las dos especies analizadas en este trabajo. Zolfaghari y col. (1986) encontraron para *Prosopis glandulosa* un porcentaje de semilla en vaina del 15%, valor similar al encontrado para VN13S, mientras que Becker y

Grosjean (1980) encontraron para *Prosopis velutina* un 25% de semillas. El fruto de *Ceratonia siliqua* (algarrobo europeo) presenta una longitud de 14,5 x 1,8 cm con 11 semillas por vaina pero de mayor tamaño (Bravo y col., 1994).

Las diferentes partes de las semillas, tanto de *Prosopis alba* (SPA) como de *Prosopis nigra* (SPN) se muestran en la Figura 1.13. La semilla está compuesta de testa o cubierta, endosperma y el germen. La separación de las partes resultó en una proporción en peso aproximada de testa, endosperma y germen de 1:1:2. Para el caso de la especie *Ceratonia siliqua* la relación testa, endosperma, germen es de 1:2:1, estos valores fueron reportados por Dakia y col. (2007).



Figura 1.11. Vaina de algarrobo blanco con sus respectivas semillas.



Figura 1.12. Vainas de algarrobo negro con sus respectivas semillas.

3.8.2 Rendimiento de las harinas obtenidas

El rendimiento, expresado en porcentaje de harina obtenida a partir de 100 g de vaina húmeda, fue de 83,9% para HA11S y 77,3% para HN13S. En el caso de las muestras utilizadas para realizar el ensayo comparativo se logró un rendimiento de 68,01% para H10EF y un 60% para la H10SSF; esta diferencia se debe a que cuanto más finas son las fracciones menor es el rendimiento de molienda, ya que las harinas H10EF y H10SSF se obtuvieron a partir de tamices de 500 μm (Figura 1.5).

Tabla 1.6. Parámetros morfológicos de las vainas y las semillas de algarroba.

Parámetro	Vaina	
	VA10F	VN13S
Largo (cm)	17,00 \pm 3,34	13,05 \pm 2,40
Peso (g)	5,70 \pm 1,49	4,56 \pm 1,20
Semillas / Vaina	26,68 \pm 4,36	18,45 \pm 3,81
	Semilla	
	SPA	SPN
Peso de semilla (mg)	26,98 \pm 4,36	35,12 \pm 5,79
Ancho (mm)	3,27 \pm 0,34	3,78 \pm 0,39
Largo (mm)	5,61 \pm 0,56	5,90 \pm 0,43
Semillas en vaina (%)	12,62	14,20

3.8.3 Comparación de los parámetros de composición proximal entre las diferentes vainas

La humedad de las vainas de *Prosopis alba* varió con el año de recolección para la misma zona y las vainas de las zonas de Loreto y Árraga (año 2012) resultaron más húmedas. Comparando *P. alba* con *P. nigra*, esta última presentó un contenido de humedad significativamente mayor (Figura 1.14). El contenido de cenizas no resultó modificado ni con la especie ni con el año de recolección (Figura 1.15).

El contenido de proteínas de las vainas fue relativamente constante con valores en un rango de 8-10%, a excepción de la vaina VA12S que presentó un valor significativamente mayor. Asimismo, no se observaron diferencias entre las especies *P. alba* y *P. nigra* de la misma temporada (Figura 1.16).



Figura 1.13. Fracciones obtenidas a partir de las semillas de algarrobo: semilla entera (A), episperma o testa (B), germen (C), endosperma (D).

En cuanto a los lípidos, las vainas de Santiago del Estero presentaron mayor contenido que las de Árraga y Loreto y éstas no presentaron diferencias significativas con el año de cosecha. Asimismo, las vainas de *P. nigra* presentaron un contenido significativamente mayor que las de *P. alba*, de aproximadamente el doble (Figura 1.17).

Para el mismo año de cosecha, las vainas de Loreto y Árraga presentaron menor contenido de fibra dietaria total que la de Santiago del Estero, sugiriendo que existe una pequeña variación dependiendo de la zona de crecimiento del árbol de algarrobo, debido seguramente a diferencias climáticas. Las vainas de *P. nigra* no presentaron diferencia significativa en el contenido de fibra con las vainas de *P. alba* (Figura 1.18).

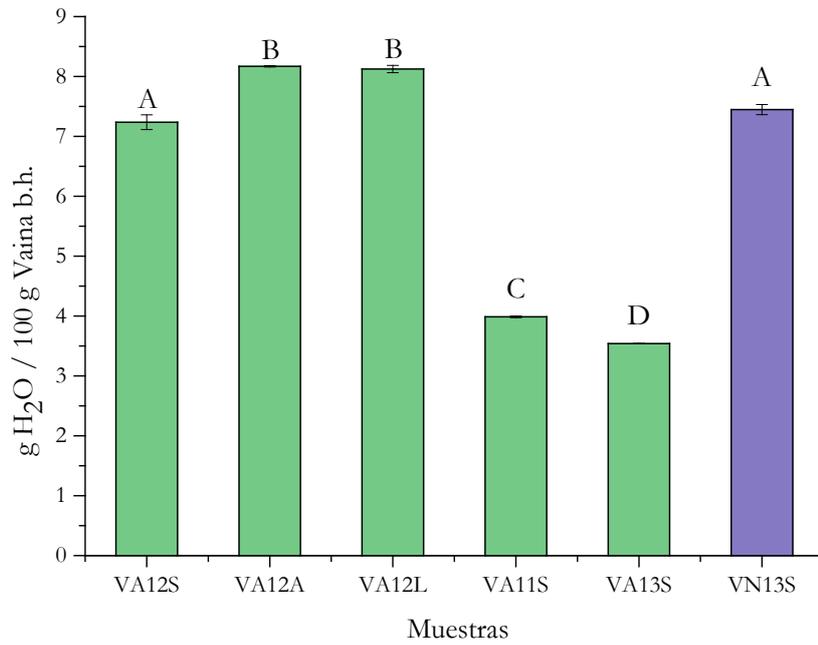


Figura 1.14. Contenido de humedad para las vainas de *P. alba* y *P. nigra*.

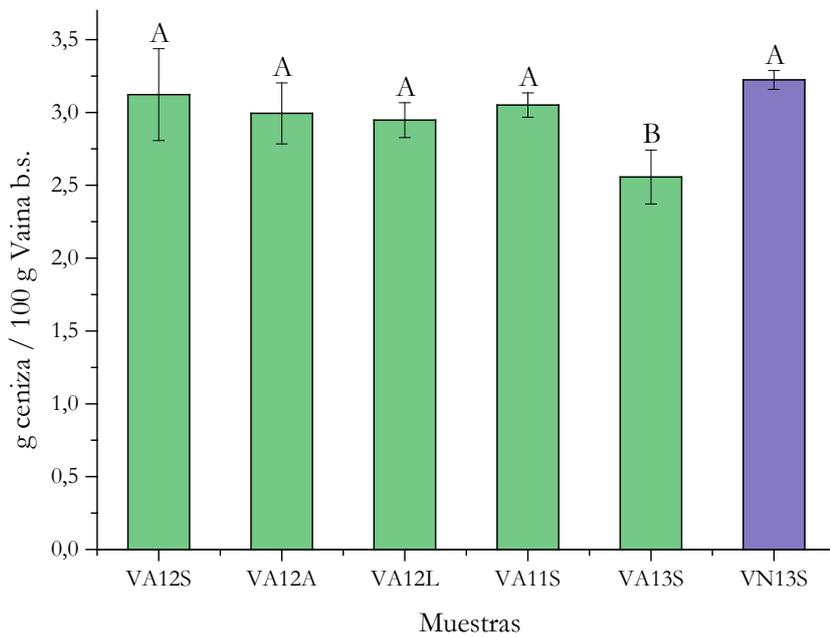


Figura 1.15. Contenido de cenizas para las vainas de *P. alba* y *P. nigra*.

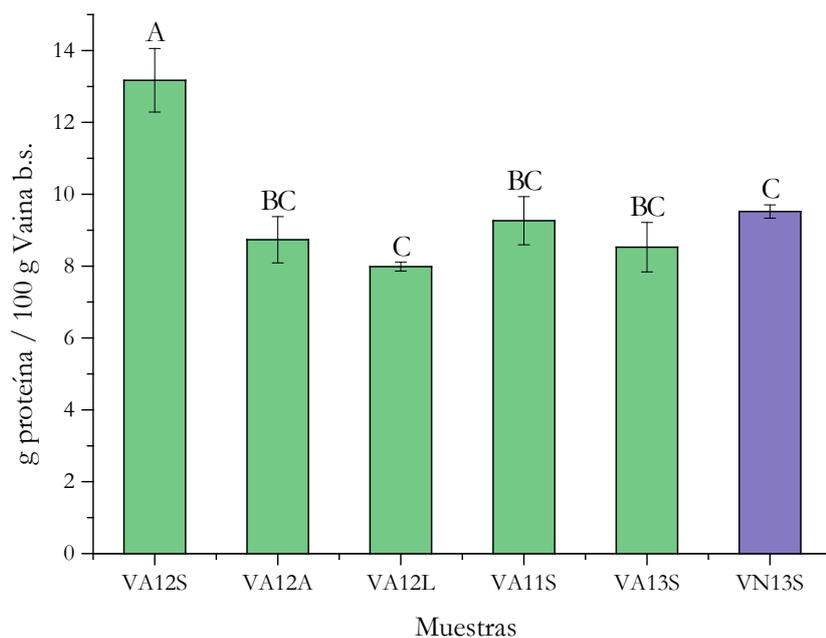


Figura 1.16. Contenido proteico para las vainas de *P. alba* y *P. nigra*.

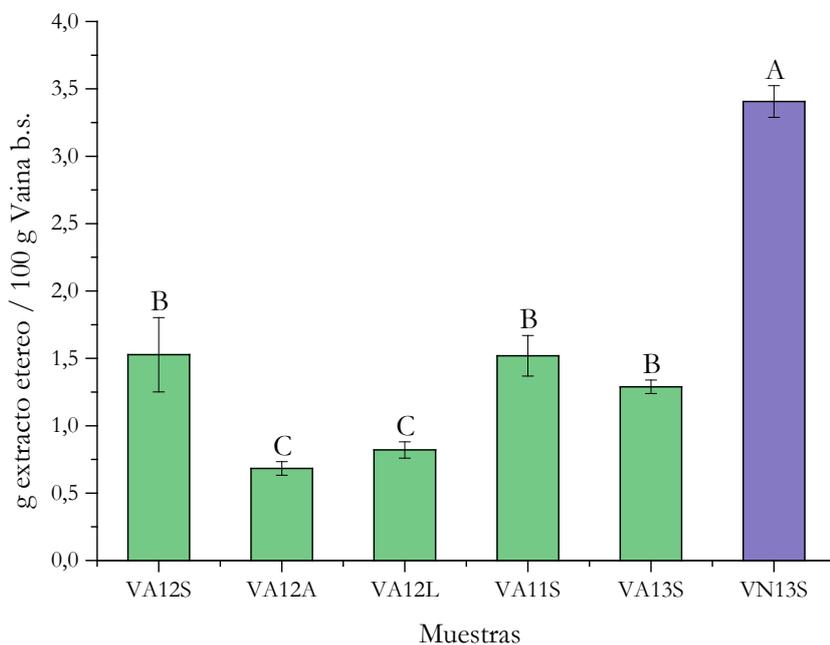


Figura 1.17. Contenido lipídico para las vainas de *P. alba* y *P. nigra*.

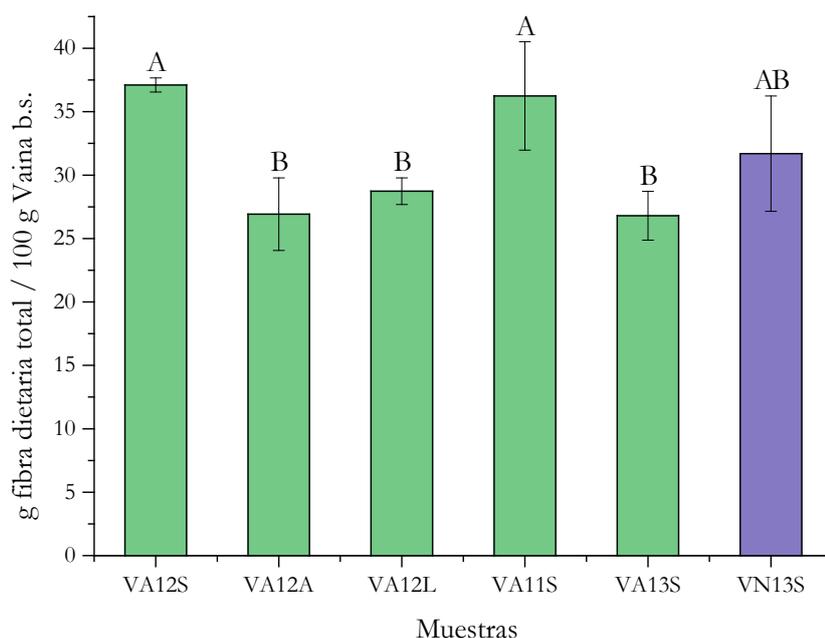


Figura 1.18. Contenido de fibra dietaria total para las vainas de *P. alba* y *P. nigra*.

Como se explicó en la sección Materiales y Métodos se realizó la determinación de los tres azúcares más representativos de este fruto que son sacarosa, glucosa y fructosa. La Figura 1.19 muestra el contenido del azúcar mayoritario, la sacarosa. Los valores resultaron un tanto aleatorios con el año de recolección y el lugar del cultivo y la especie, observándose valores entre $34,89\% \pm 0,19$ y $52,11\% \pm 0,41$. Si se comparan las dos especies del mismo año, *P. alba* presentó un contenido significativamente mayor de sacarosa que *P. nigra*.

En el caso de la fructosa, tres de las vainas analizadas presentaron este componente, éstas fueron VA11S con $2,31 \pm 0,68\%$, VA12S con $1,76 \pm 0,14\%$ y VN13S con $1,93 \pm 0,27\%$; no encontrándose diferencias significativas entre lotes. En cuanto a la glucosa solamente fue encontrada en las muestras VA12S en un $0,35 \pm 0,1\%$ y VA11S en un $0,44 \pm 0,2\%$ no habiéndose detectado diferencias significativas entre las muestras.

La variación en el contenido de azúcares resultó inversa al del resto de los componentes mayoritarios: proteínas, lípidos y fibra dietaria total. Este fenómeno puede deberse a que el periodo de llenado de las vainas es dependiente del clima, alta radiación solar y disponibilidad de humedad edáfica que posibilitarían una mayor generación de compuestos fotoasimilados los que se translocarían a los frutos almacenándose en forma

de sacarosa. Años secos con menor disposición hídrica se traducen en una menor cantidad de fotoasimilados, lo que genera frutos con menor contenido de azúcares que se traduce en un aumento del contenido porcentual de los otros componentes.

La Figura 1.20 muestra que las vainas de *P. alba* presentaron en todos los casos un contenido de polifenoles menor a 0,8 g ácido gálico/100 g vaina (b.s.), con diferencias significativas entre lotes, y además dicho valor fue significativamente menor que el observado para *P. nigra*, que fue de alrededor de 1,2. La capacidad antioxidante siguió la misma tendencia que el contenido de polifenoles (Figura 1.21).

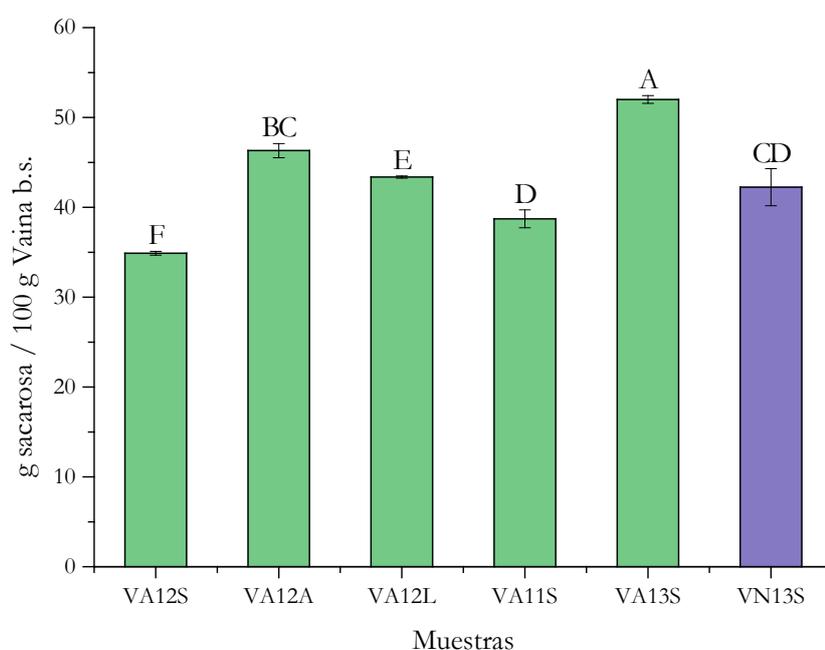


Figura 1.19. Contenido de sacarosa para las diferentes vainas.

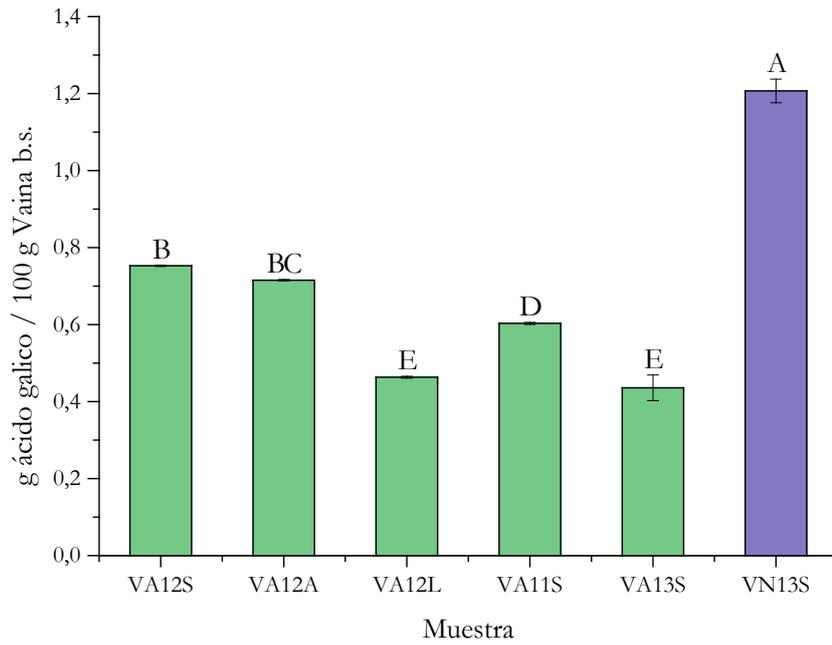


Figura 1.20. Contenido de polifenoles para las diferentes vainas.

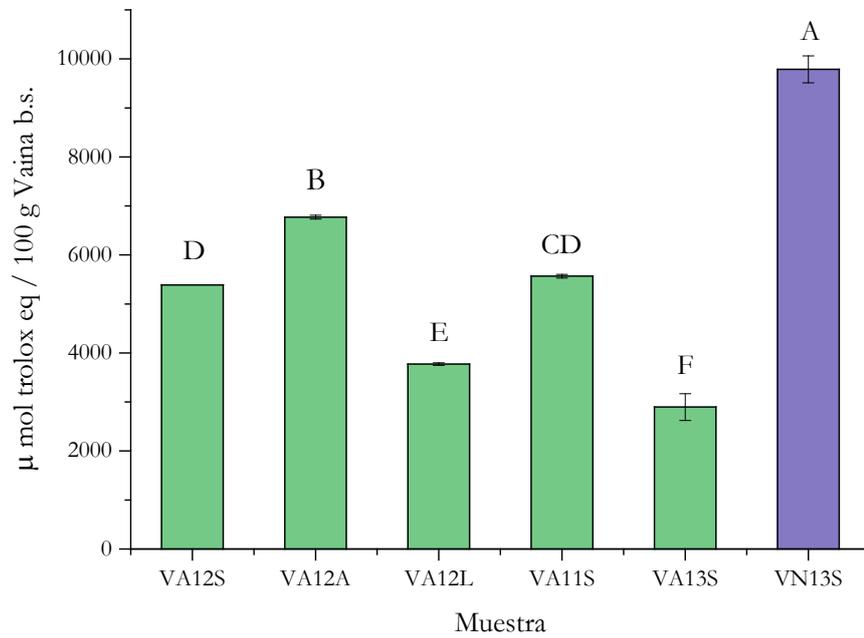


Figura 1.21. Actividad antioxidante para las diferentes vainas.

3.8.4 Comparación de los atributos entre vainas y sus respectivas harinas

3.8.4.1 *Análisis de los macro-componentes y compuestos antioxidantes*

Las vainas se muelen y posteriormente se tamizan para obtener una harina con una granulometría aceptable o adecuada para su uso como ingrediente alimentario. Esta harina, generalmente con menor contenido de partículas de gran tamaño, asegura la calidad tecnológica de los productos. Por esta razón, en esta sección se intenta realizar una comparación de los parámetros de composición de las harinas y las respectivas vainas de las cuales se obtuvieron estas harinas, tanto para *P. alba* como *P. nigra* (Tabla 1.7). La harina de *P. alba* con la que se elaboraron los diferentes productos estudiados en los Capítulos II y III, presentó menor contenido de proteínas y lípidos y fibra dietaria total aunque mayor contenido de azúcares solubles, alcanzando valores de sacarosa superiores al 50%. Las diferencias en las variables de composición se deben al proceso de tamizado para la obtención de harina. La vaina de las especies de *Prosopis* spp. que contiene en su interior las semillas es el pericarpio que a su vez está constituido por una fina capa de epicarpio, el mesocarpio de consistencia corchosa y un endocarpio duro que rodea a las semillas (Grados y Cruz, 1996) Figura 1.22. La harina evidentemente contiene menor proporción de endocarpio o parte interna de la vaina que conduce a una harina de menor contenido de fibra y mayor contenido de azúcares solubles. El mayor contenido de proteína de la vaina se debería a que gran parte de la proteína está en la semilla por lo tanto una parte de la misma se pierde durante el proceso de obtención de la harina.

Para un mejor análisis comparativo de los valores de la (Tabla 1.7), se realizaron cuadros comparativos en dos dimensiones en los que se incluyeron las letras resultantes del análisis estadístico de la comparación de medias. Las letras en sentido vertical, tanto en la columna derecha como izquierda, comparan cada harina con su respectiva vaina, mientras que las letras al pie del cuadro comparan las harinas de *P. alba* y *P. nigra* entre sí (Figura 1.23).

En el caso de la humedad, se encontraron diferencias significativas tanto entre vainas y harinas como entre las 2 harinas, aunque esta variación probablemente no dependa de la composición de las muestras sino del diferente tiempo de almacenamiento en cámara a 4°C. El otro parámetro en el que se detectaron diferencias significativas fue el contenido de lípidos, que resultó mayor para las muestras de *P. nigra*. La harina de *P.*

alba presentó menor contenido de lípidos que su respectiva vaina, mientras que *P. nigra* presentó el comportamiento opuesto. Este comportamiento sugiere que los lípidos de *P. nigra* se encuentran no sólo en la semilla sino también en el mesocarpio. En cuanto a proteínas, sólo se observó diferencia significativa entre harina y vaina de *P. nigra*.

Debido a que la fibra dietaria se encuentra principalmente en el endocarpio que queda retenido en el tamiz, se obtuvieron valores significativamente diferentes entre cada harina y su vaina como también entre las dos harinas estudiadas, resultando la harina de *P. nigra* con menor contenido de fibra. También se observaron diferencias significativas en el nivel de sacarosa entre las harinas y las vainas, aunque ambas harinas presentaron igual valor de este parámetro. En cuanto a los polifenoles y la capacidad antioxidante, sólo se observaron diferencias significativas entre las harinas, presentando *P. nigra* valores considerablemente mayores, aproximadamente el doble.

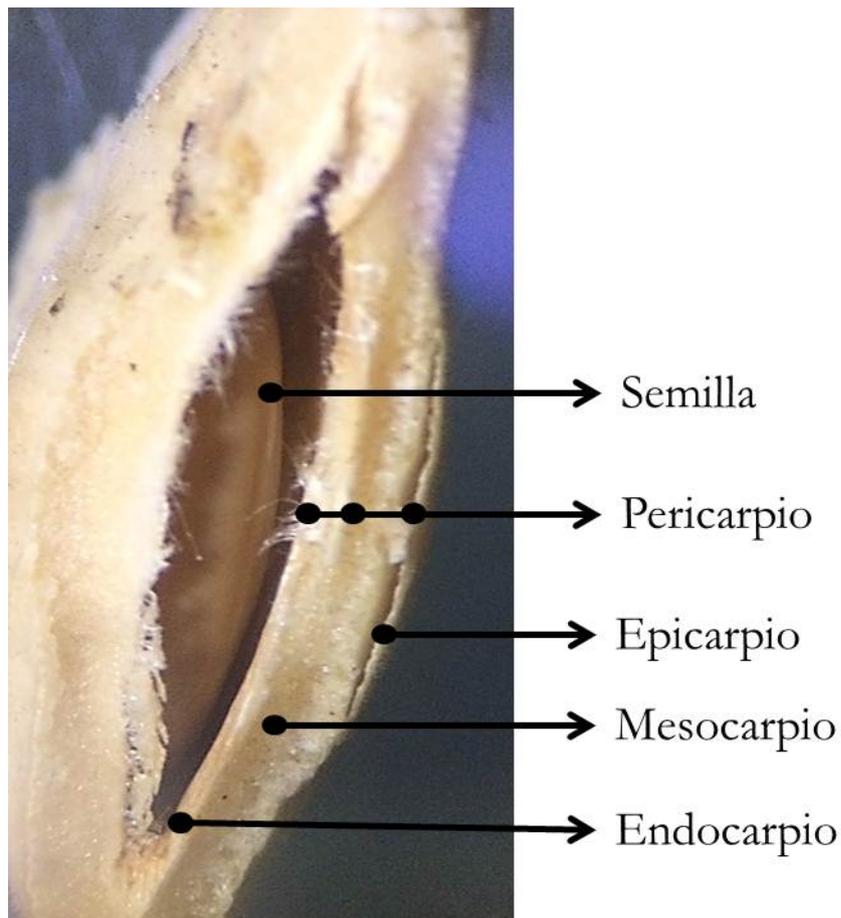


Figura 1.22. Corte transversal de la vaina de *P. alba*, magnitud: 20X.

Tabla 1.7. Valores de composición de vainas y sus respectivas harinas.

	VA11S	HA11S	VN13S	HN13S
Humedad	3,98 ± 0,012	4,76 ± 0,09	7,44 ± 0,08	6,72 ± 0,002
Lípidos	1,51 ± 0,15	0,67 ± 0,03	3,40 ± 0,11	6,59 ± 0,63
Proteínas	9,26 ± 0,66	7,73 ± 0,12	9,51 ± 0,18	8,06 ± 0,06
Fibra dietaria total	36,24 ± 4,26	23,27 ± 0,52	31,69 ± 4,54	20,06 ± 0,83
Cenizas	3,05 ± 0,08	3,09 ± 0,14	3,22 ± 0,06	3,31 ± 0,17
Sacarosa	38,71 ± 1,00	52,11 ± 0,03	42,23 ± 2,06	55,09 ± 1,83
Glucosa	0,43 ± 0,22	1,63 ± 0,19	N/D	N/D
Fructosa	2,31 ± 0,68	3,02 ± 0,35	1,93 ± 0,27	2,03 ± 0,18
Azúcares totales	41,45	56,76	43,46	57,12
Polifenoles	0,603 ± 0,002	0,625 ± 0,001	1,20 ± 0,03	1,15 ± 0,015
Antioxidantes	5566 ± 37	5451 ± 109	9786 ± 274	10024 ± 268

(a) g H₂O / 100 g muestra b.h.; (b) g analito / 100 g muestra b.s.; (c) g ácido gálico / 100 g muestra b.s.; (d) μmol troloxeq / 100 g muestra b.s.

Las harinas y vainas de *P. alba* son apreciadas por su aroma, sabor y propiedades nutricionales. Se utilizan en la zona del Noroeste argentino (NOA) para consumo humano en diferentes alimentos tradicionales. A pesar de la gran posibilidad de su uso, esta harina no ha sido utilizada a nivel comercial a gran escala.

El pericarpio de las especies de *Prosopis* spp., como mencionamos anteriormente, está formado por una fina capa de epicarpio, el mesocarpio de consistencia corchosa y el endocarpio duro que rodea a las semillas. Las semillas a su vez están compuestas por episperma o cubierta denominada testa, endosperma formado por la goma y el germen que contienen mayoritariamente los lípidos y las proteínas como lo informaran Grados y Cruz (1996) y como se mostró previamente en la Figura 1.13. Gharnit y col. (2006) detectaron que las semillas de *Ceratonia siliqua* L. están formadas por una cubierta (30%) rica en antioxidantes, endospermo (45%) y germen (25%).

Grados y Cruz (1996) encontraron para vainas de *Prosopis pallida* y *Prosopis juliflora* que la sacarosa, el principal azúcar de este fruto, está presente en el pericarpio en un 46% aproximadamente. El polisacárido del endosperma es un galactomanano con una relación 1:1,36 galactosa:manosa. La fibra del mesocarpio y endocarpio constituye básicamente fibra dietaria insoluble.

B	VA11S	Humedad	VN13S	A
A	HA11S		HN13S	B
	B		A	
A	VA11S	Lípidos	VN13S	B
B	HA11S		HN13S	A
	B		A	
A	VA11S	Proteínas	VN13S	A
B	HA11S		HN13S	B
	A		A	
A	VA11S	FDT	VN13S	A
B	HA11S		HN13S	B
	A		B	
A	VA11S	Cenizas	VN13S	A
A	HA11S		HN13S	A
	A		A	
B	VA11S	Sacarosa	VN13S	B
A	HA11S		HN13S	A
	A		A	
A	VA11S	Fructosa	VN13S	A
A	HA11S		HN13S	A
	A		A	
A	VA11S	Polifenoles	VN13S	A
A	HA11S		HN13S	A
	A		B	
A	VA11S	Antioxidantes	VN13S	A
A	HA11S		HN13S	A
	A		B	

Figura 1.23. Esquema comparativo de los resultados estadísticos del análisis de composición. Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras (α 0,05).

Meyer y col. (1986) estudiaron la composición química y nutricional de las diferentes fracciones de la vaina de *Prosopis velutina*. El exo y mesocarpio contiene la mayor parte del azúcar y componentes aromáticos de la vaina lo que haría de esta harina un material útil para la elaboración de jarabes y panificados libres de gluten. El endocarpio está constituido principalmente por fibra. El mucílago que cubre al germen de las semillas es la goma que tiene una relación galactosa:manosa de 1:1,55 de aplicaciones semejantes a la goma guar (Bravo y col., 1994). La goma (galactomanano) derivada de *Prosopis* spp. (goma mezquite) tiene potencial aplicación como sustituto de otras gomas (arábiga, guar, LBG) ampliamente usadas como aditivos en alimentos dietéticos y para personas diabéticas (Ibañez y Ferrero, 2003).

El pericarpio de *P. alba* presentó mayor contenido de azúcares totales y de azúcares reductores que los reportados por (Bravo y col., 1994) para *P. pallida*. Choge y col. (2007) encontraron para vaina entera de *P. juliflora* de Kenia (África) un contenido de azúcares totales considerablemente menor que el de *P. alba*, con menor contenido de glucosa (8%) y mayor cantidad de fructosa (7,5%) y mayor nivel de fibra dietaria (48%). Da Silva y col. (2007) encontraron para vaina entera de *P. juliflora* del nordeste de Brasil, mayores valores de azúcares totales (56,5 %) y azúcares reductores (4,6%). Estos resultados demuestran que la cantidad y proporción de los distintos glúcidos es variable y probablemente dependiente de factores tanto intrínsecos como ambientales y de molienda. Si se compara el algarrobo americano con el europeo (*C. siliqua*), que pertenece a otro género, Bravo y col. (1994) encontraron para pericarpio tanto de *P. alba* como de *C. siliqua*, un contenido de azúcar de aproximadamente 50%, siendo la sacarosa el principal constituyente de esta fracción (95% de los azúcares totales) y los menores constituyentes, glucosa, fructosa, galactosa y arabinosa. Saura Calixto (1987) reportó para *C. siliqua* un 70% de sacarosa en la fracción de azúcares solubles, que en nuestro caso fue de 93%.

Respecto de la fibra dietaria total (FDT), las harinas presentaron menores contenidos que las respectivas vainas, lo que sugiere que parte del pericarpio que contiene la fibra insoluble, quedó retenido en el tamiz. Los valores de fibra dietaria total de vaina de *P. alba* fueron mayores a los de *P. pallida* (31%) y a los de *C. siliqua* (14,0 %) (Bravo y col., 1994). Estévez y col. (2014) encontraron para *Prosopis chilensis* valores bastante mayores de FDT (41,8%) que los obtenidos para *P. alba*. En el caso de *Prosopis glandulosa*

cultivada en Texas (USA), la vaina entera presentó similares valores de humedad, cenizas y FDT que *P. alba*, aunque un contenido doble de lípidos (Zolfaghari y col., 1986).

El alto contenido de fibra obtenido para *P. alba* y *P. nigra*, pero especialmente para *P. alba*, hace de sus harinas un ingrediente funcional con potencial aplicación en formulaciones panarias enriquecidas en fibra.

3.8.4.2 ***Análisis de los minerales presentes en vainas y harinas***

La Figura 1.24 muestra en forma comparativa los minerales contenidos en la vaina y harina de *Prosopis alba*. Se puede observar que las muestras presentaron alto contenido de potasio y calcio, y en menor proporción de magnesio y sodio. A excepción del Na, la vaina presentó mayor contenido de minerales. La OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda una ingesta diaria de sodio menor a 2 g, esto equivale a 5 g de NaCl, las harinas de ambas especies, HA11S y HN13S tienen muy bajo contenido de sodio: 67,42 mg/100g y 72,98 mg/100g respectivamente, por lo que serían aptas para personas que sufran problemas de hipertensión (OMS, 2013b). Respecto al contenido de potasio, la ingesta diaria recomendada por la OMS es de 3510 mg por día en personas adultas, por lo que las harinas HA11S y la HN13S, cuyos niveles de este mineral son 903,05 mg/100g y 1068,12 mg/100g respectivamente, podrían contribuir apreciablemente con los niveles requeridos en la dieta (OMS, 2013a).

El contenido de hierro de la harina resultó mayor que el de la vaina, sugiriendo que este mineral se encuentra mayoritariamente en semilla, ya que parte de la fracción externa de la vaina queda retenida en el tamizado y algunos componentes de la semilla están concentrados en la harina. Para el cinc se observó el comportamiento opuesto.

La comparación de los niveles de minerales de vaina y harina de *P. nigra* se muestra en la Figura 1.25. En el caso de esta variedad, los niveles de K de la harina resultaron considerablemente mayores que los de la vaina y que los de harina de *P. alba*. A su vez se detectó, a diferencia de *P. alba*, un contenido significativamente menor de Fe en harina; sugiriendo que para *P. nigra* habría una gran proporción de Fe en el epicarpio y/o mesocarpio.

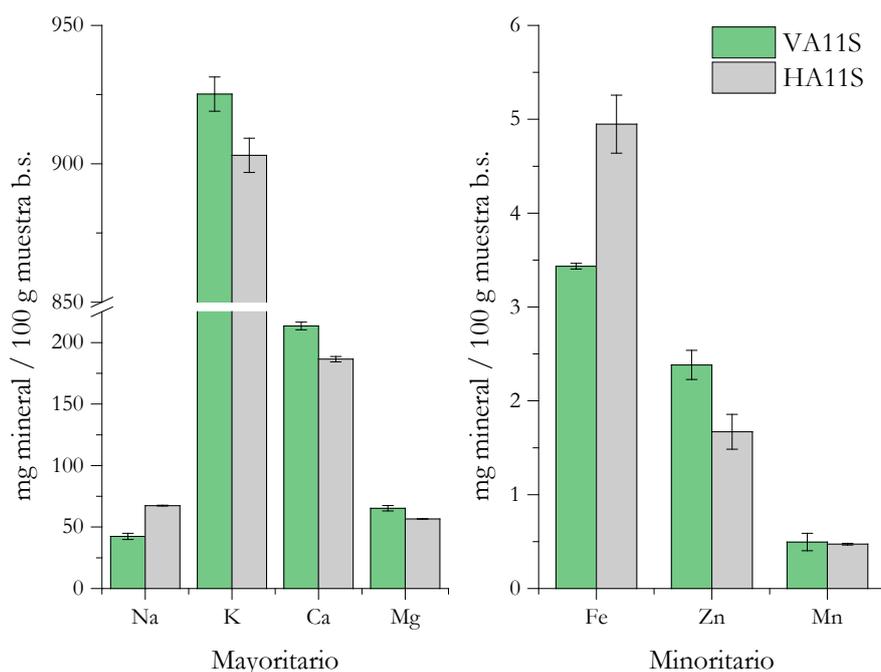


Figura 1.24. Composición mineral de vaina y harina de *Prosopis alba*.

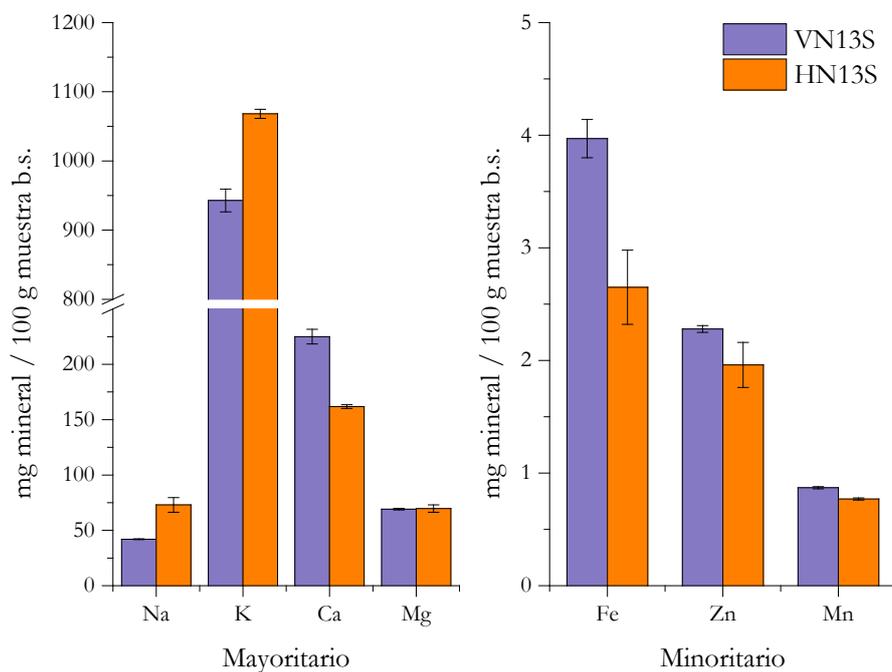


Figura 1.25. Composición mineral de vaina y harina de *Prosopis nigra*.

Comparando ambas vainas (Figura 1.26) se puede observar que prácticamente no se observaron diferencias en el contenido de minerales, presentando la vaina de *P. nigra* mayor contenido de Fe y Mn. En el caso de las harinas (Figura 1.27), la proveniente de

algarrobo blanco con la que se elaboran la mayoría de los productos regionales, presentó mayor contenido de K, Mg y Fe, pero menor contenido de Ca, Zn y Mn.

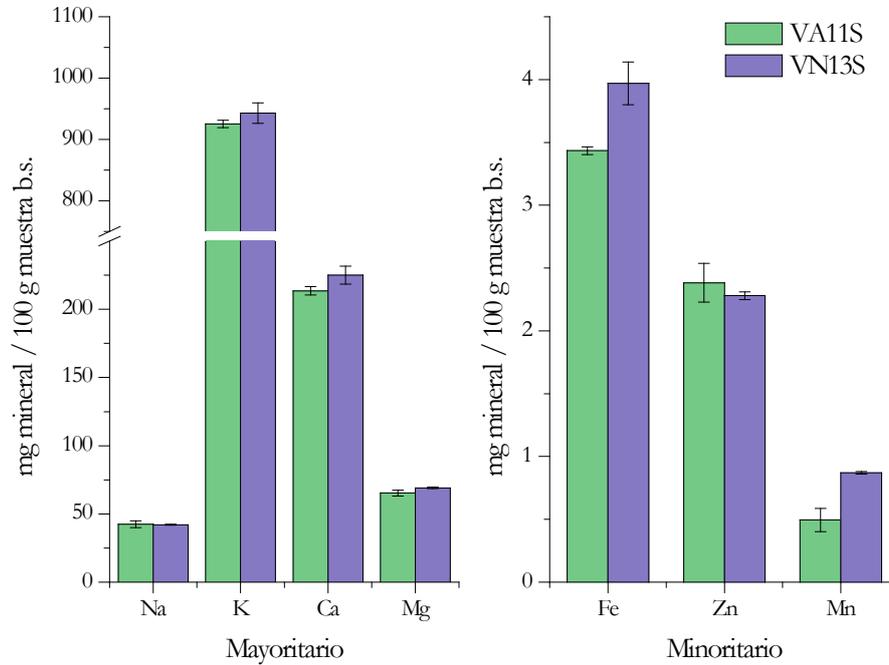


Figura 1.26. Comparación de la composición mineral de vainas.

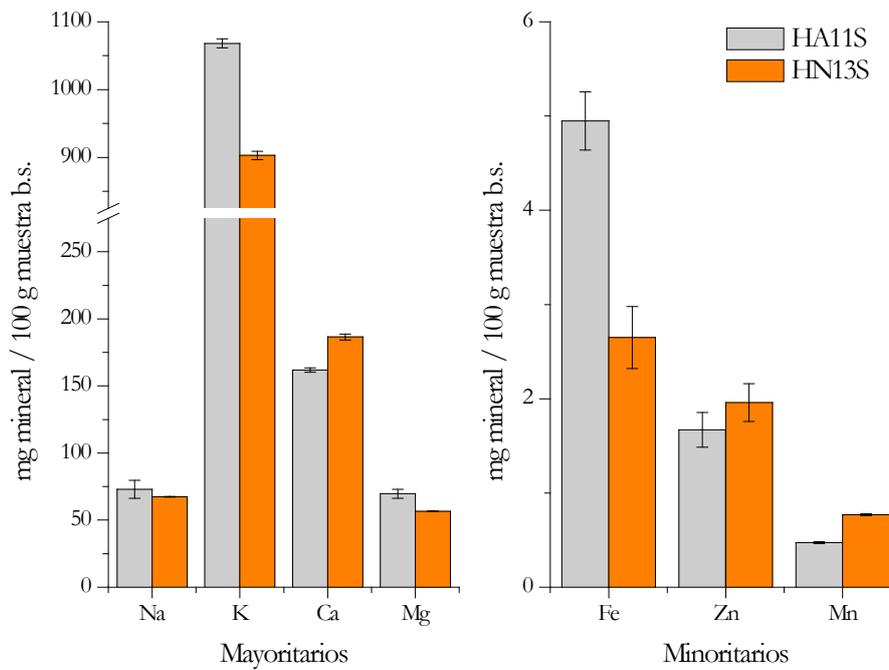


Figura 1.27. Comparación de la composición mineral de harinas.

El contenido de Ca de las harinas de algarroba (Figura 1.27) osciló entre 160 y 180 mg/100 g harina (b.s.). Estos valores resultaron mayores a los informados por USDA (USDA 2015) para harinas de cereales, específicamente en harina de trigo es 15 mg/100 g harina b.s. Comparando con otras leguminosas, el contenido de Ca de las harinas de *P. alba* fue casi el doble que el obtenido por Martínez Meyer y col. (2013) para harina de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) y semejante al de harina de lupino (*Lupinus albus* L.) (176 mg /100g harina). El calcio es un macronutriente importante ya que una ingesta adecuada de este mineral puede reducir el riesgo de osteoporosis en personas mayores (Cashman y Flynn, 1999). La ingesta diaria recomendada (IDR) de calcio, basada en una dieta de 2000 calorías para mujeres entre 30 y 50 años de edad, es 1000 mg (USDA, 2015). En Argentina, el calcio resulta un nutriente deficiente: el 94% de mujeres entre 10 y 49 años presenta una ingesta menor a la IDR; por lo que altos niveles de este mineral convierten a las harinas de *P. alba* y *P. nigra* en potenciales ingredientes para suplementar calcio en la dieta.

El contenido de magnesio de estas harinas fue similar al de *C. siliqua* (54 mg /100g harina b.s.), mayor que el de *Triticum aestivum* L. (25 mg /100g harina b.s.) aunque menor que el de *L. albus* (198 mg /100g harina b.s.).

Las deficiencias de minerales más comunes en el mundo son las de hierro y cinc; éstas conducen a disfunciones en los sistemas nervioso e inmune (House, 1999, Martínez Meyer y col., 2013). La harina de *Prosopis alba* presentó un valor de $4,95 \pm 0,91$ mg Fe/100 g harina, superior al encontrado en *C. siliqua* (2.94 mg /100g) y en harina de trigo (*T. aestivum* L.) blanca que es de 0,9 mg /100g y de 3 mg/100 g la enriquecida con este mineral por Ley 25.630. Con el objetivo de prevenir enfermedades como anemia y malformación del tubo neuronal (anencefalia y espina bífida) en niños, en nuestro país, desde el año 2003, las harinas de trigo blancas para panificación se complementan (Ley 25.630) con hierro como sulfato ferroso, ácido fólico y vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina). El contenido de cinc de la harina de *P. alba* ($1,67 \pm 0,19$ Zn/100 g harina) resultó mayor que el de harina de *T. aestivum* (USDA 2015) (0,85 mg/100 g) y también que de *C. siliqua* (0,92 mg/100 g) (Ayaz y col., 2009).

Comparando con otras leguminosas, el contenido de Fe de *P. alba* fue semejante al de *P. vulgaris* (6,4-8,1 mg /100g harina) (Martínez Meyer y col., 2013) y *L. albus* (4,4 mg

/100g harina) (USDA, 2015). En cuanto al Zn, *L. albus* presentó valores mayores (4,75mg /100g harina) y *P. vulgaris* valores semejantes (2,1-2,5 mg /100g harina) al de *P. alba*.

3.8.4.3 Análisis de los ácidos grasos presentes en harinas

Los valores de lípidos de la Tabla 1.7 muestran que para *P. alba*, la harina presentó menor contenido de lípidos que la vaina ($0,67 \pm 0,03$ vs. $1,51 \pm 0,15$), mientras que *P. nigra* presentó el comportamiento opuesto ($3,40 \pm 0,11$ para vaina y $6,59 \pm 0,63$ para harina). Los lípidos usualmente se encuentran en el germen (cotiledones) de la semilla, por lo que estos valores sugieren que la harina de *P. alba* contendría menor proporción de semilla, mientras que la *P. nigra* presentaría mayor cantidad de lípidos en el epicarpio y mesocarpio del fruto. El perfil de ácidos grasos que constituyen los lípidos de las harinas se muestra en la Figura 1.28. Los ácidos grasos mayoritarios para ambos extractos fueron el palmítico (16:0), oleico (18:1 n-9) y el linoleico (18:2 n-6) y los minoritarios presentes en mayor proporción fueron esteárico (18:0), araquídico (20:0), α -linolénico (18:3 n-3) y araquidónico (20:4 n-6). El extracto de *P. nigra* presentó mayor cantidad de palmítico, oleico y araquidónico, mientras que el extracto de *P. alba* expresó mayor contenido de linoleico y α -linolénico.

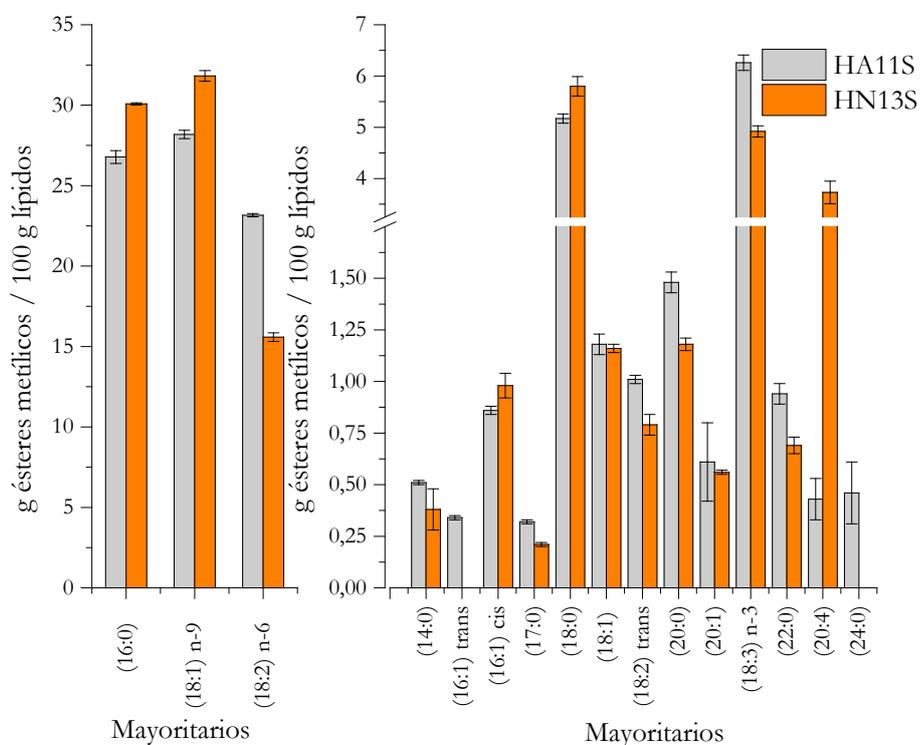


Figura 1.28. Composición porcentual de los diferentes ácidos grasos de *P. alba* y *P. nigra*.

3.8.5 Composición química de las semillas

Muchos de los componentes nutricionalmente importantes de un fruto del tipo leguminosa se encuentran en la semilla, razón por la cual se decidió analizar la composición química de semillas de *P. alba* y *P. nigra*.

Las semillas de *Prosopis alba* (SPA) como las de *Prosopis nigra* (SPN) se presentan en la vaina en una proporción de 12,2 y 14,6 % respectivamente, valores inferiores a los documentados para *Ceratonia siliqua*, especie de la que se obtiene la denominada goma garrofin de forma industrial; esta especie tiene un rendimiento en semilla respecto al total de la vaina en torno a un 20%, presentando 9 semillas por fruto con un tamaño de semilla de 1,84 g. A diferencia de *C. siliqua*, *P. alba* y *P. nigra* tienen 26 y 18 semillas por vaina con una masa de semillas de 0,26 y 0,35 g, respectivamente. Otro dato a tener en consideración es la relación testa:endosperma:germen que para el caso de *C. siliqua* es de 1:2:1 aproximadamente y para el caso de SPA y SPN es de 1:1:2, por lo que SPA y SPN tienen una mayor cantidad de germen (Gharnit y col., 2006). Por la facilidad de manipulación, su mayor tamaño y su mayor cantidad de galactomananos la semilla de *C. siliqua* es la opción utilizada por la industria para la obtención de goma LBG (Locus Bean Gum). En esta sección se describen algunas de las características químicas estudiadas para las SPA y SPN.

La humedad que presentaron las semillas fue de $6,11 \pm 0,03\%$ y $8,03 \pm 0,01\%$ para SPN y SPA respectivamente, presentando diferencias significativas entre ellas. Lamarque y col. (1994) por su parte presentaron valores similares para diferentes especies de *Prosopis* spp., entre ellas *P. alba*, con valores entre 7,4 y 8,3%.

Los valores de ceniza fueron de $3,20 \pm 0,18\%$ y $2,95 \pm 0,07\%$ para SPN y SPA respectivamente, no presentando diferencias significativas entre ellos; Becker y Grosjean (1980) encontraron valores similares para *Prosopis glandulosa* y *Prosopis velutina* de 3,42 % y 3,83%, respectivamente.

Los valores para los minerales de las semillas de ambas especies se muestran en Figura 1.29. El mineral mayoritario en la semilla al igual que en los frutos es el potasio, este mineral es bien conocido que interviene en el transporte de hidratos de carbono Mengel y Viro (1974), por lo que es abundante en estos frutos con alto contenido de azúcares y fibra. Se puede observar también que gran parte del magnesio es aportado por las semillas, ya que el contenido en vaina está en relación directa con la proporción de

semilla presente. Este hecho es esperable ya que este mineral es esencial para la formación de clorofila, molécula participante en el proceso de fotosíntesis que se origina en los cotiledones.

Entre los minerales minoritarios de SPA el que se encontró en mayor proporción es el hierro seguido por zinc, aunque para el SPN el comportamiento fue opuesto; ambas semillas contienen menor cantidad de manganeso en comparación con los otros minerales. Se pudo observar que tanto para SPA como SPN el zinc se encuentra en mayor cantidad en las semillas. Por su parte Barminas y col. (1998) en *Prosopis africana* (PAf) encontraron valores menores para K 278, Ca 118,73, Fe 5,63 y Zn 3,46 (mg /100 g semilla b.s.) aunque para *Prosopis glandulosa* se informaron mayores valores respecto a *P. alba* y *nigra*, de K 700, Ca 280, Mg 370, Fe 9,4, Zn 7,4 y Mn 2,3 (mg /100g semilla b.s), a excepción del Zn para SPN y del Fe para SPA que resultaron menores (Becker y Grosjean, 1980). En cuanto a *Prosopis Velutina* se reportaron valores similares de K (680) y mayores para Ca (260), valores de Mg (180) intermedios entre los observados para SPA y SPN, y menor cantidad de Zn (4,9) y Fe (4,6). El Mn se encontró en mayor proporción que para SPA y SPN (Becker y Grosjean, 1980). Desde el punto de vista de los minerales, la harina de vaina entera de *P. alba* resultaría adecuada por el mayor contenido de Ca, Mg y Fe de sus semillas.

El endosperma de la semilla, mostrado en la Figura 1.13, es la fracción comúnmente llamada goma compuesta por un galactomanano. El análisis de la composición de estos galactomananos tanto de SPA como SPN se muestran en la Tabla 1.8 El análisis de los resultados indica que ambas gomas de las dos especies están constituidas mayoritariamente por manosa y galactosa. Las fracciones poseen además glucosa y arabinosa y pequeñas proporciones de ramnosa. Por espectroscopia de masa se determinó que los pequeños picos presentes en los cromatogramas no correspondían a monosacáridos neutros, por lo que no fueron identificados. Sin embargo, se observó una pequeña diferencia en la composición de los monómeros de estas gomas que condujo a una relación molar Man/Gal de 1,35 para *Prosopis nigra* y 1,56 para *Prosopis alba*.

Meyer y col. (1986) estudiaron la composición química y nutricional de diferentes fracciones de la vaina de *Prosopis velutina*. Encontraron, al igual que en nuestro caso para *Prosopis alba*, que el mucílago o goma que recubría las semillas estaba compuesto por manosa y galatosa en una relación Man/Gal de 1,55. Ibañez y Ferrero (2003) encontraron

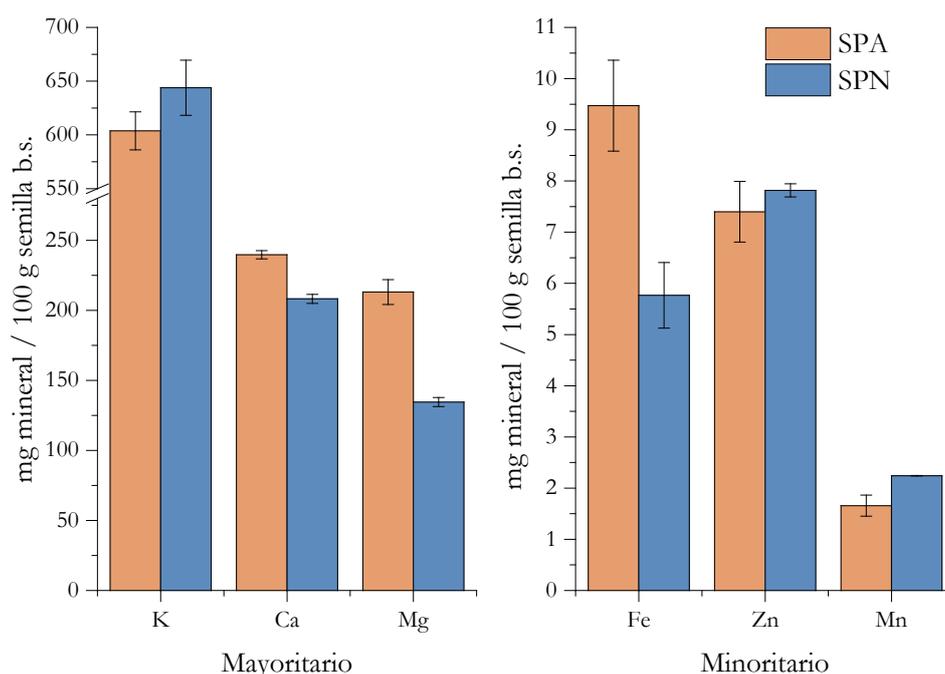


Figura 1.29. Composición mineral de semillas de algarrobo blanco y negro.

para la goma de *Prosopis flexuosa* una relación Man/Gal de 2,1, un poco mayor a los obtenidos en este trabajo.

Las gomas de las especies de *Prosopis* spp., comúnmente llamadas gomas mesquite, han sido estudiadas por su aplicación como aditivos alimentarios (Bravo y col., 1994, Ibañez y Ferrero, 2003) en alimentos dietéticos y en alimentos para personas diabéticas. Esta goma puede utilizarse como sustituto de la goma arábica, goma guar, goma garrofín (LBG) en caramelos gomosos (gomitas) o como carriers de microencapsulación de aceites esenciales y moléculas bioactivas.

Tabla 1.8. Componentes de la goma de semilla de *Prosopis alba* (SPA) y *P. nigra* (SPN).

	SPA	SPN
Glucosa	6,03±0,59 ^A	4,07±1,10 ^A
Galactosa	38,07±1,64 ^A	35,60±3,10 ^A
Manosa	51,80±1,93 ^A	55,17±2,85 ^A
Arabinosa	3,20±1,00 ^A	3,97±1,10 ^A
Ramnosa	0,90±0,10 ^A	1,13±0,35 ^A

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a las proteínas, SPN y SPA presentaron valores de $37,70 \pm 0,25$ y $32,90 \pm 0,25\%$ (g proteína / 100 g semilla b.s.) respectivamente, presentando diferencias significativas entre los mismos; en tanto Becker y Grosjean (1980) reportaron valores de 31,19 % para *P. glandulosa* y 29,44% para *P. velutina*. Lamarque y col. (1994) documentaron para *Prosopis alba* valores de 30,9% y de 31% para *Prosopis nigra*. Para el germen de *P. alba* y *P. nigra*, GPA y GPN, se obtuvieron valores de $66,69 \pm 0,85\%$ y de $64,65 \pm 0,12\%$, respectivamente, no presentando diferencias significativas entre los mismos. Escobar y col. (2009) encontraron para *Prosopis chilensis* valores de 63,6% de proteína en el germen.

No solamente es importante la cantidad, sino también la calidad de la proteína, la proporción de los diferentes aminoácidos especialmente los esenciales y su relación con el requerimiento nutricional en humanos. Cattaneo y col. (2014) encontraron que los aminoácidos presentes en mayor proporción en *P. alba* fueron glutamina, arginina y asparagina, seguidos de leucina y serina. Felker y Bandurski (1977) encontraron previamente una composición de aminoácidos similar a la de *Prosopis alba* para *Prosopis chilensis* y *juliflora*. Meyer y col. (1986) descubrieron que los aminoácidos limitantes para *Prosopis velutina* resultaron ser tirosina y metionina+cisteína. El alto contenido de glutamina y arginina del germen convierten a esta fracción en un ingrediente potencialmente útil para alimentos para deportistas, debido a que contribuye con el incremento de la masa muscular, síntesis de colágeno y producción de glicógeno. Escobar y col. (2009) determinaron en harina de germen de *Prosopis chilensis* un contenido de lisina disponible de 6,2% en tanto que Felker y Bandurski (1977) encontraron para *Prosopis stephania* un contenido de lisina disponible de 5,61% y Marangoni y Alli (1988) encontraron para *Prosopis juliflora* un contenido de 4,94%. Para la complementación de la calidad proteica de una dieta, la proteína complementaria deberá tener como mínimo 5,8% de lisina disponible o 2,5% metionina+cisteína o 1,1% triptófano disponible (FAO, 2007), por lo que las proteínas de *Prosopis* spp. pueden complementar la harina de trigo en productos horneados.

Se ha encontrado documentación de la proporción de aminoácidos de algunas especies de *Prosopis* spp., entre ellas *P. alba*, sin embargo a fin de conocer la calidad proteica de la materia prima con la que se elaboraron los productos, resultó necesario determinar el contenido de aminoácidos y el/los aminoácidos limitantes de estas proteínas.

La Tabla 1.9 muestra que para ambas especies, los aminoácidos mayoritarios obtenidos fueron ácidos aspártico y glutámico, arginina y leucina. Sin embargo se observaron algunas diferencias en el contenido de aminoácidos de las proteínas de germen de *P. alba* y *P. nigra*. No hubo diferencias significativas en el contenido de aminoácidos esenciales de ambas especies a excepción de la cisteína que resultó significativamente mayor para GPA; de esta forma, el contenido de aminoácidos azufrados (Cys+Met) resultó sustancialmente mayor para proteínas de *Prosopis alba*; mientras que el contenido de aminoácidos aromáticos (Trp+Phe) resultó similar para ambas proteínas. Entre los aminoácidos no-esenciales, GPA presentó una proporción significativamente mayor de Arg y significativamente menor de Pro y Tir en comparación con GPN. Nuestros resultados difirieron un poco en cuanto a los porcentajes de algunos aminoácidos de las proteínas de germen de *P. alba*, respecto a los informados por Cattaneo y col. (2014). En nuestro trabajo se obtuvieron mayores contenidos de Arg, Gly, Ala, Val, Hys, Ile, Leu, Lys y Phe. Las diferencias más significativas estuvieron en el contenido de aminoácidos azufrados (Met+Cys) que en nuestro ensayo fue superior (6,01 vs. 2,39). En general, los valores bajos encontrados en bibliografía para aminoácidos azufrados se debe que los mismos fueron derivatizados con o-ftalaldehído (OPA) para su determinación, que no fue el caso del presente trabajo. A su vez, se obtuvo menor proporción de Pro, Met.

El cálculo del puntaje químico (Chemical Score, CS) de los aminoácidos limitantes se realizó teniendo en cuenta el patrón de aminoácidos esenciales de la FAO/WHO (2008) para personas adultas y niños. Este parámetro se calculó como el cociente entre el porcentaje del aminoácido de la muestra y el recomendado por la FAO/WHO o estándar, calculado en base 1 (uno). El menor número obtenido por debajo del límite 1 corresponde al aminoácido limitante. Para el caso de adultos, tanto para las proteínas de *Prosopis alba* como *P. nigra* el aminoácido limitante resultó ser la metionina con un score < 1. Analizando los aminoácidos limitantes para niños, no se obtuvo para ninguna de las dos proteínas un Chemical Score <1, sugiriendo que las proteínas de algarrobo no posee aminoácidos que limiten la nutrición de esta franja de la población; sin embargo, los aminoácidos con menor Chemical Score resultaron ser Val para GPA e Ile para GPN. Si bien Cattaneo y col. (2014) determinaron el porcentaje de aminoácidos de un aislado proteico de *P. alba*, con valores muy bajos de Met+Cys, no identificaron el aminoácido

limitante. Marangoni y Alli (1988) analizaron la composición aminoacídica de las semillas de *Prosopis juliflora*, encontrando también alto contenido de ácidos aspártico y glutámico también mayores valores de Tyr+Phe, aunque un valor menor de Arg.

Bengoechea y col. (2008), desestimando los bajos valores de aminoácidos azufrados (Met+Cys) obtenidos, encontraron para proteínas de un aislado proteico de *Ceratonia siliqua* L. como aminoácidos limitantes la fenilalanina y la tirosina; mientras que Dakia y col. (2007) encontraron al triptófano como aminoácido limitante. Comparando con otras leguminosas, por ejemplo para soja el aminoácido limitante es valina y Met+Cys (Seligson y Mackey, 1984), mientras que para lupino, Sujak y col. (2006), encontraron Met+Cys y triptófano. De todos modos, hay que tener cuidado a la hora de evaluar los aminoácidos limitantes, ya que bajos valores de Met+Cys no sugieren que estos son los limitantes, debido a que pudo haber ocurrido una oxidación incompleta luego de la hidrólisis que se traduce en una degradación parcial de los mismos y por ende una subestimación en su cuantificación.

Del análisis de resultados se puede deducir que las proteínas de *Prosopis* spp., tanto *P.alba* como *P.nigra*, no fueron deficientes en lisina ni en aminoácidos azufrados, como ocurre con otras proteínas vegetales, lo que las convierte en un buen complemento nutricional. Asimismo, el alto contenido de ácidos aspártico y glutámico como de arginina hacen de estas proteínas, y de la harina de algarroba, un ingrediente adecuado para alimentos para deportistas. Estos aminoácidos cumplen un rol importante en el incremento de la masa muscular, la síntesis de colágeno y la producción de glicógeno (Varnier y col., 1995, Flynn y col., 2002).

El análisis mediante anticuerpos policlonales de las harinas de *Prosopis alba* (HA11S) y *P. nigra* (HN13S), dio como resultado ausencia de prolaminas, según el método de Chirido y col. (1995) (Ver Anexo Capítulo I). Esto significa que la harina de algarrobo es un ingrediente apto para productos libres de gluten destinados a personas con enfermedad celíaca. La enfermedad celíaca es un desorden del intestino delgado, siendo en principio desencadenada en un grupo de individuos por la ingestión de un grupo de proteínas conocidas como prolaminas, las que se encuentran en trigo, avena, cebada, centeno y triticale. La cantidad exacta de proteína que causa el daño depende del paciente aunque mínimas dosis pueden producir una severa respuesta inmune en la mucosa intestinal. Asimismo, estas harinas no presentaron actividad antitriptica, quizá

porque las proteínas responsables de la inhibición de la tripsina, enzima asociada a la digestibilidad, se han desnaturalizado con el tratamiento térmico durante el secado.

Tabla 1.9. Composición de aminoácidos (AAC, g aminoácido/100 g proteína) y Chemical Score (CS, % respecto a FAO) de germen de *Prosopis alba* (GPA) y *Prosopis nigra* (GPN).

Aminoácidos	GPA	GPN	FAO/WHO*		Chemical Score			
					Adultos		Niños	
Esenciales	AAC (g/100 g proteína)		Adultos	Niños	Alba	Nigra	Alba	Nigra
Histidina-His	5,099±0,088 ^A	5,328±0,066 ^A	1,5	1,2	3,40	3,55	4,25	4,44
Treonina-Tre	3,723±0,072 ^A	3,627±0,002 ^A	2,3	1,8	1,62	1,58	2,07	2,02
Valina-Val	4,504±0,432 ^A	4,851±0,331 ^A	3,9	2,9	1,15	1,24	1,55	1,67
Isoleucina-Ile	3,556±0,012 ^A	3,557±0,132 ^A	3,0	2,2	1,19	1,19	1,62	1,62
Leucina-Leu	9,733±0,146 ^A	10,063±0,045 ^A	5,9	4,4	1,65	1,71	2,21	2,29
Lisina-Lys	5,952±0,063 ^A	5,841±0,004 ^A	4,5	3,5	1,32	1,30	1,70	1,67
Triptófano-Trp	0,949±0,019 ^A	0,996±0,003 ^A	0,6	0,48	1,58	1,66	1,98	2,08
Metionina-Met	0,041±0,010 ^A	0,031±0,003 ^A	1,6		0,03	0,02		
Cisteína-Cys	5,973±0,110 ^A	3,551±0,085 ^B	0,6		9,96	5,92		
Tyr + Phe	6,665	6,429	3,8	3,0	1,75	1,69	2,22	2,14
Met + Cys	6,014	3,582	2,2	1,7	2,73	1,63	3,54	2,11
No esenciales	AAC (g/100 g proteína)							
Aspártico-Asp + Glutámico-Glu	24,802±0,868 ^A	27,304±0,213 ^A	-	-	-	-	-	-
Arginina-Arg	22,274±0,492 ^A	19,094±0,039 ^B	-	-	-	-	-	-
Glicina-Gly	6,523±0,210 ^A	6,739±0,033 ^A	-	-	-	-	-	-
Serina-Ser	6,073±0,051 ^A	6,232±0,070 ^A	-	-	-	-	-	-
Alanina-Ala	6,061±0,176 ^A	6,031±0,019 ^A	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina-Phe	5,716±0,153 ^A	5,433±0,018 ^A	-	-	-	-	-	-
Tirosina-Tyr	3,071±0,008 ^B	3,266±0,014 ^A	-	-	-	-	-	-
Prolina-Pro	0,480±0,043 ^B	2,803±0,233 ^A	-	-	-	-	-	-

Letras diferentes en una misma fila de las dos primeras columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

* Estándares FAO/WHO 2008.

La ausencia de factores antinutricionales y de respuesta inmune hace de esta harina un ingrediente valioso para la elaboración de diferentes productos horneados.

Es bien conocido que la naturaleza de las proteínas (globulares o fibrilares) como así su estructura (secundaria y terciaria) son factores importantes a tener en cuenta

cuando se analizan las propiedades funcionales de un alimento. El tipo de proteínas presentes en el GPA y GPN fue estudiado mediante electroforesis en gel desnaturizante, que se muestra en la Figura 1.30.

El buffer de pH 8 extrajo mayoritariamente proteínas de 85, 60, 58, 15 y 13 kDa, y en menor proporción de 32, 23 y 18 kDa. La fuerza iónica del buffer no resultó suficiente para solubilizar agregados de alta masa molecular. La incorporación de un agente desnaturizante como el SDS, que rompe uniones no covalentes principalmente hidrofóbicas, permitió solubilizar gran cantidad de agregados de alta masa molecular (> 100 kDa) y de proteínas de 38 y 18 kDa. La banda de 38 kDa estuvo ausente en ausencia de SDS, mientras que la de 18 kDa se vio intensificada. Este perfil sugiere que estas proteínas estaban unidas por uniones hidrofóbicas y/o puente hidrógeno entre sí y/o a otras proteínas insolubles. Se observaron algunas diferencias menores entre los perfiles de ambas muestras, GPN presentó una banda a 95 kDa que estuvo ausente en GPA y con prácticamente ausencia de la banda de 23 kDa.

El agregado de un agente reductor, que disocia uniones disulfuro (S-S) como el DTT, permitió seguramente extraer agregados proteicos que antes eran insolubles como también la disociación de los agregados solubles de alta masa molecular (> 140 kDa) que con SDS solamente no habían entrado al gel. Se obtuvieron para ambas especies bandas definidas y en muy elevada proporción de proteínas de 137, 133, 82, 63, 38, 18 y 13 kDa. Nuevamente la banda de 95 kDa, y en este caso en mayor proporción, se observó en GPN y estuvo ausente en GPA, sugiriendo que las proteínas de ambas especies son diferentes. Se puede observar que en ambas muestras apareció una banda de 133 kDa y desapareció la banda de 117 kDa. Resulta interesante destacar que se obtuvo para ambas especies mucha mayor proporción de la proteína de 38 kDa lo que sugiere que ésta se encontraba unida por S-S a agregados proteicos de alta masa molecular o unida a la proteína de 82 kDa formando la proteína de 117-120 kDa. Asimismo, la proteína de 18 kDa presentó la misma intensidad que en ausencia de DTT, lo que indica que estaba unida a dichos agregados sólo por uniones no-covalentes. La banda de 15 kDa prácticamente desapareció del perfil con DTT lo que sugiere que esa proteína es un dímero de dos proteínas unidas por uniones S-S, una de ellas posiblemente de 13 kDa, como se deduce de la mayor intensidad de esta última banda.

Las proteínas del *Prosopis alba* resultaron diferentes a las observadas en *Ceratonía siliqua*, o *Glycine max* (soja). Bengoechea y col. (2008) extrajeron agregados solubles de alto peso molecular y una proteína de 70 kDa, luego le agregaron β -mercaptoetanol, agente reductor de puentes disulfuro al igual que el DTT, y la banda de 70 kDa desapareció, obteniéndose dos monómeros de 24 kDa y 48 kDa. La semilla de soja presenta dos tipos de globulinas (Puppo y col., 1995) una llamada 7S y la otra 11S. La globulina 7S es una glicoproteína trimérica de 150 kDa compuesta de tres subunidades α' , α y β de 85, 80 y 50 kDa respectivamente; las mismas se encuentran asociadas por uniones hidrofóbicas, mientras que la globulina 11S está compuesta por dos anillos hexagonales opuestos conteniendo cada uno tres subunidades asociadas constituidas por pares de 55 kDa que a su vez están formados por dos polipéptidos: uno ácido de 35 kDa y otro básico de 20 kDa. De la Figura 1.30 se puede observar que las proteínas de GPA ni las de GPN no presentan las globulinas 11S ni 7S típicas que se observan en soja. Si bien *Ceratonía siliqua*, *Glycine max*. Y *Prosopis* spp. pertenecen a la misma familia, presentan grandes diferencias entre sus composiciones polipeptídicas.

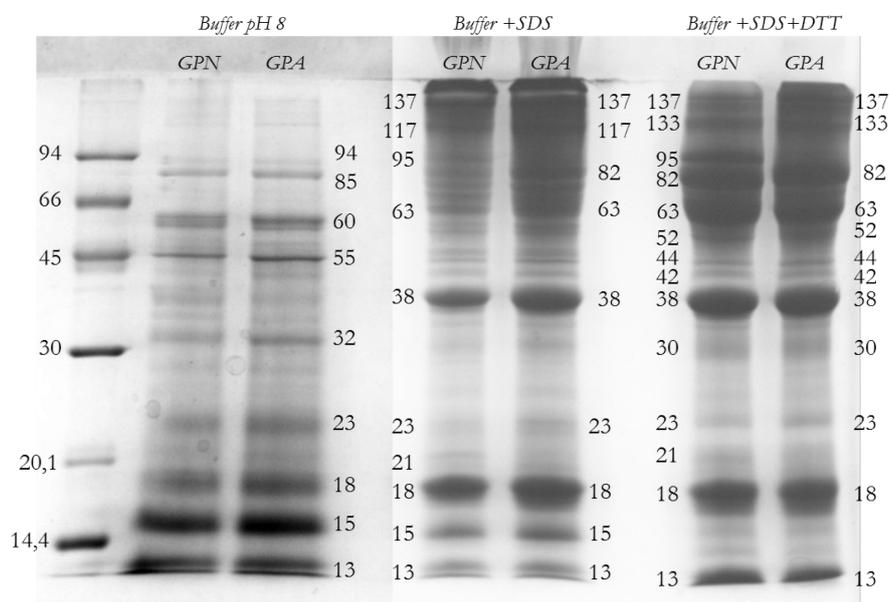


Figura 1.30. SDS-PAGE de las proteínas extraídas de la fracción GPN y GPA.

Lamarque y col. (1994) reportaron un 12,7% w/w de lípidos en la semilla de *Prosopis alba*, con una composición de 27,6 y 52,5% de ácidos oleico y linoleico,

respectivamente. Escobar y col. (2009) observaron un valor un poco menor de lípidos (10,2%) en semilla de *Prosopis chilensis*.

La Figura 1.31 muestra la comparación entre ácidos grasos presentes en los lípidos de ambas semillas. Se identificaron 13 ácidos grasos para SPA y 14 para SPN. El ácido graso predominante fue el linoleico tanto para SPA como para SPN con valores de 44,6 y 47,7%, respectivamente; seguido por el ácido oleico con un 26,5 y un 25,7%, siendo el ácido palmítico el de mayor cantidad entre los ácidos grasos saturados con valores de 13,6 y 13,2% para SPA y SPN, respectivamente. Estos valores resultaron similares a los obtenidos por Lamarque y col. (1994) para las diferentes especies de algarrobo. Marangoni y Alli (1988) encontraron también una relación similar en la composición de *Prosopis juliflora*, en tanto que Balogun y Fetuga (1985) mostraron que no sólo para las semillas del genero *Prosopis* spp., sino que también otras semillas de leguminosas tienen similar composición, pudiéndose apreciar que el ácido graso más abundante en las semillas sería el linoleico.

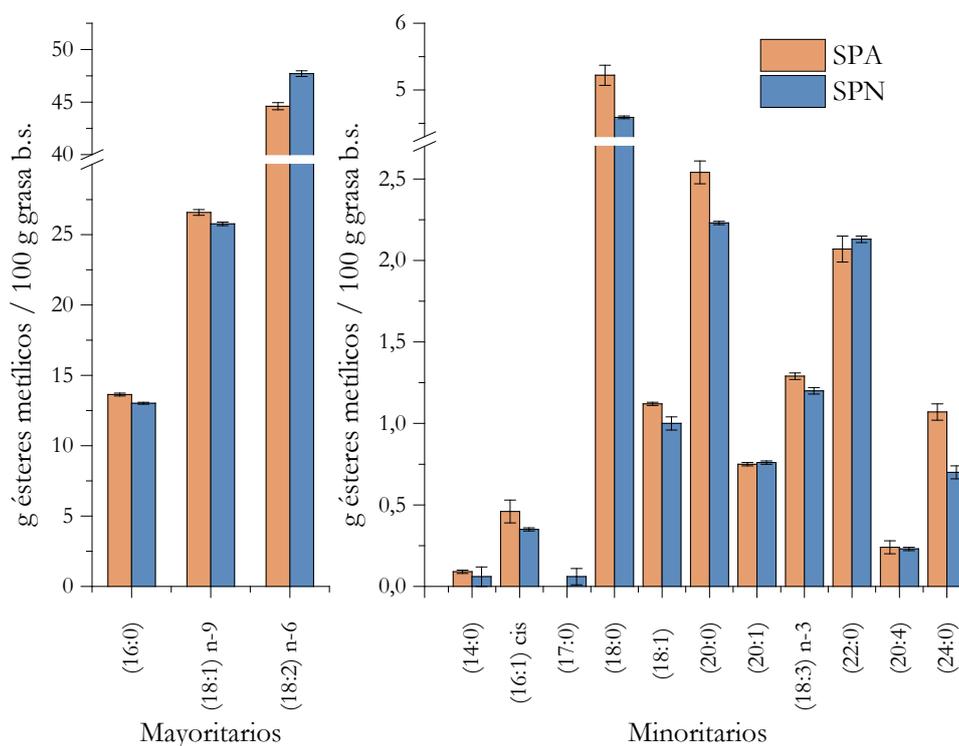


Figura 1.31. Ácidos grasos presentes en los lípidos de SPA y SPN.

3.8.5.1 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de las semillas

La Figura 1.32 muestra el contenido de polifenoles de semillas enteras de algarrobo blanco (SPA) y algarrobo negro (SPN) y de las diferentes partes de las semillas. El contenido de polifenoles resultó significativamente mayor en semillas de *P. nigra*, resultando un valor del doble con respecto al observado para *P. alba*. El mayor nivel de polifenoles de SPN respecto de SPA también fue observado en las diferentes fracciones. Para ambas semillas, los polifenoles se encontraron principalmente en el episperma o testa. Si bien el contenido de polifenoles es bajo en el endosperma, el contenido del EPN fue 4 veces mayor que el de EPA. El germen de *P. alba* (GPA) presentó el doble de polifenoles que el endosperma (EPA).

La actividad antioxidante (Figura 1.33) siguió el mismo comportamiento que el contenido de polifenoles, lo que indica que los polifenoles son los principales responsables de la actividad antioxidante tanto de las semillas como de sus diferentes partes.

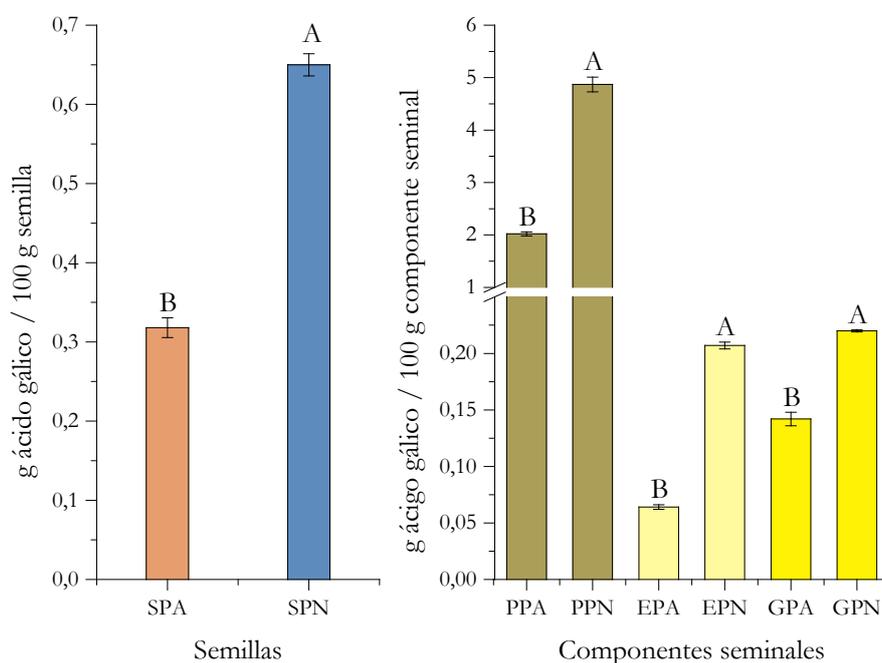


Figura 1.32. Contenido de polifenoles de semillas enteras SPA y SPN y de sus diferentes componentes: P episperma, E endosperma, G germen. PA: Prosopis alba, PN: Prosopis nigra.

3.8.6 Comparación de harina de vaina entera y harina de vaina sin semillas

3.8.6.1 Composición química y análisis de minerales

El objetivo de esta sección fue estudiar aspectos químicos y nutricionales de las diferentes fracciones obtenidas a partir de las vainas del fruto del algarrobo, para lo cual se utilizó la muestra VA10F de *Prosopis alba*. Las harinas obtenidas, de forma ya detallada, fueron la harina de vaina entera, con semilla (H10EF) y la harina de vaina sin semilla (H10SSF) denominada comúnmente harina de pulpa. Con este estudio se pretendió analizar la importancia que puede llegar a tener la semilla dentro del fruto de algarrobo.

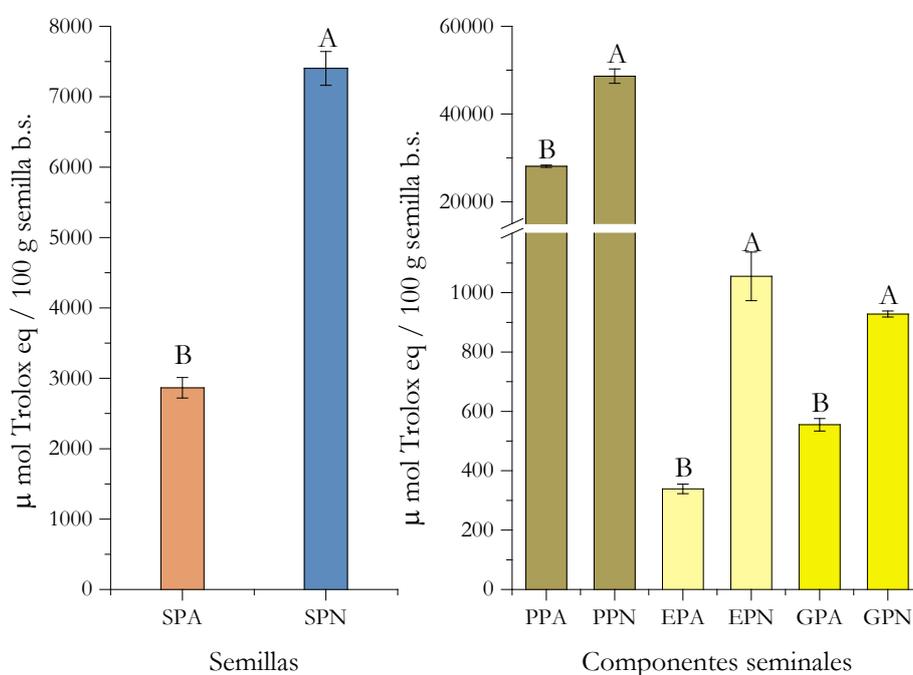


Figura 1.33. Actividad antioxidante de semillas enteras SPA y SPN y de sus diferentes componentes: P episperma, E endosperma, G germen. PA: Prosopis alba, PN: Prosopis nigra.

Un aspecto importante de las harinas es el color. Las harinas H10EF y H10SSF presentaron diferentes propiedades de color. H10EF presentó $L^* = 70 \pm 0,8$; $a^* = 7 \pm 0,2$ y $b^* = 21 \pm 0,5$ y H10SSF $L^* = 75 \pm 1,2$; $a^* = 5 \pm 0,3$ y $b^* = 20 \pm 0,8$. Los parámetros L^* y a^* exhibieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras. H10EF presentó un color más marrón concordando con un valor mayor de a^* y con menor luminosidad L^* , esto puede ser atribuido a la presencia de semillas en H10EF.

Se llevó a cabo el análisis de composición de estas dos harinas a fin de establecer la calidad nutricional de ambas. Los parámetros se muestran en la Tabla 1.10. El contenido de azúcares solubles fue mayor en H10SSF como así también el de todos sus componentes (sacarosa, fructosa y glucosa), sugiriendo que estos componentes se encuentran en la parte externa del fruto que rodea a las semillas, es decir, en la pulpa o que estarían ausentes en la semilla. Da Silva y col. (2007) informaron para harina de vaina entera de *Prosopis juliflora* del noreste de Brasil un valor menor en el contenido de azúcares totales (56,5%). La fibra dietaria total fue significativamente mayor en la harina de vaina con semilla (H10EF) aunque no se evidenciaron diferencias en el contenido de fibra dietaria insoluble. Estos resultados sugieren que la semilla contribuye a la fibra dietaria, especialmente con fibra soluble aportada por los galactomananos del endosperma. Choge y col. (2007) encontraron para harina de vaina entera de *Prosopis juliflora* de Kenia (África) un valor de azúcares totales considerablemente menor (13% b.s.) que el observado para H10EF (62,7% b.s.), con menor contenido de glucosa (0,8% b.s.) y sacarosa (7,5% b.s.). Sin embargo, el contenido de fibra dietaria total encontrada por estos autores para esa especie fue de aproximadamente el doble (48% b.s.). Bravo y col. (1994) informaron para pulpas de *Prosopis pallida* y de *Ceratonia siliqua* un contenido de azúcares totales de alrededor de 50%, siendo la sacarosa el constituyente mayoritario (95% del total de azúcares). La glucosa, fructosa, galactosa y arabinosa fueron los componentes minoritarios. En nuestro caso, la sacarosa representó el 66 y 62 % de los azúcares para H10EF y H10SSF, respectivamente. El alto contenido de fibra convierte a cualquiera de estas dos harinas en buenos ingredientes para panificados enriquecidos en fibra.

No se ha encontrado hasta el momento información respecto al valor nutricional de los frutos de las especies de *Prosopis* spp. evaluado en ensayos con humanos; sin embargo *Ceratonia siliqua* ha sido mayormente estudiada. Zunft y col. (2003) encontraron que una pulpa de *Ceratonia siliqua* enriquecida en fibra disminuyó el colesterol total y el LDL en pacientes hipercolesterolémicos. Gruendel y col. (2006) demostraron que el consumo de una bebida con pulpa de algarroba (*C. siliqua*) enriquecida en fibra dietaria insoluble y polifenoles disminuyó el nivel de LDL y triglicéridos, especialmente en mujeres; estos efectos beneficiosos en el perfil lipídico de sangre humana pueden resultar efectivos en la prevención y tratamiento de la hipercolesterolemia.

Un componente importante desde el punto de vista nutricional es la proteína. El nivel de nitrógeno total en harina de vaina entera (H10EF) fue significativamente superior, en un 48%, al de la harina de pulpa (H10SSF) (Tabla 1.10). Calculando el contenido de proteína ($N_{total} \times 6,25$) usando el factor 6,25 considerado previamente por Cattáneo y col. (2014) para estas proteínas, H10EF presentó mayor cantidad de proteína que H10SSF, con valores de $7,85 \pm 0,12$ y $5,51 \pm 0,06\%$, respectivamente. Esta diferencia sugiere que la semilla realiza un aporte importante al valor proteico, como ya fue señalado anteriormente. González Galán y col. (2008) reportaron valores de proteína entre 8,8 y 11,0% para diferentes especies de *Prosopis*, correspondiendo el último valor a *P. alba*.

Sin embargo Zolfaghari y col. (1986) encontraron para el fruto de *Prosopis glandulosa* un mayor contenido de N-no proteico en vaina y de N-proteico en semilla por lo que a estas harinas se les determinó N-no proteico. Este parámetro resultó ser un 26 y 36% del N-total para harina de vaina y de pulpa, respectivamente (Tabla 1.10), no observándose diferencias significativas en el contenido de N-no proteico de las harinas, sugiriendo que la semilla (ausente en H10SSF) no aporta N-no proteico y sólo contribuye con el N-proteico. Sí se obtuvieron diferencias significativas en el N-total, con valores superiores para la harina con semilla. Calculando el contenido de proteína con el valor de N-proteico, la harina de vaina entera presentó un contenido apreciablemente mayor al de la harina de pulpa, sugiriendo un aporte importante de proteínas de la semilla. Las semillas presentaron un contenido de proteína de $29,3 \pm 0,48\%$ calculado a partir de un contenido de N-total de $4,68 \pm 0,07\%$ (base semilla). Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Zolfaghari y col. (1986). Estos autores encontraron contenidos de N-total de 1,7% y 0,84% y de N-no proteico de 0,41% y 0,31% para las vainas y pericarpio, respectivamente. También estudiaron el contenido de N de las semillas y propusieron que la mayor parte del nitrógeno no proteico de la vaina se encuentra en el pericarpio, mientras que el N-proteico es aportado por la semilla. El N-no proteico del pericarpio es principalmente nitrógeno inorgánico en forma de NO_3^- y NH_4^+ (Becker y Grosjean, 1980). De estos resultados se deduce la importancia de la evaluación del N-no proteico a la hora de establecer el contenido real de proteína de una harina proveniente de un fruto entero.

El análisis mediante anticuerpos policlonales de estas harinas, al igual que para HA11S y HN13S, dio como resultado ausencia de prolaminas (Chirido y col., 1995), lo

que confirma que tanto una harina de vaina entera como una sin semilla puede utilizarse como ingrediente libre de gluten en alimentos para celíacos. Asimismo, estas harinas no presentaron actividad antitriptica, quizá porque las proteínas responsables de la inhibición de la tripsina, enzima asociada a la digestibilidad, se han desnaturalizado con el tratamiento térmico durante el secado.

El contenido de cenizas fue similar para ambas harinas, H10EF y H10SSF, y no se observaron diferencias significativas. Las cenizas contienen minerales que son esenciales para la nutrición humana. Los minerales de estas dos muestras se presentan en la Figura 1.34.

Tabla 1.10. Composición de harinas de vaina entera (H10EF) y vaina sin semilla (H10SSF) de Prosopis alba.

g/100 g harina (b.s.)*	H10EF	H10SSF
Humedad	10,7±0,25 a	7,83±0,37 b
Cenizas	3,373±0,001 a	3,263±0,081 a
Nitrógeno total	1,26±0,02 a	0,88±0,10 b
Nitrógeno no-proteico	0,326±0,001 a	0,316±0,04 a
Proteína (N proteico x 6,25)	5,81	3,53
Lípidos	1,51±0,28 a	1,11±0,07 a
Sacarosa	41,4±0,63 a	44,1±0,32 a
Glucosa	9,60±0,13 a	12,5±0,32 b
Fructosa	11,7±0,11 a	14,1±0,42 a
Azúcares totales**	62,7	70,7
Fibra dietaria total	25,1±0,33 a	22,6±0,54 b
Fibra dietaria insoluble	20,9±0,64 a	22,1±0,45 a

* Para todos los macrocomponentes excepto humedad que se expresa como base húmeda. ** Azúcares totales: glucosa+fructosa+sacarosa. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras.

Entre los minerales estudiados, el de mayor proporción fue el potasio seguido de calcio y magnesio; además H10EF presentó mayor contenido que H10SSF de estos minerales. El contenido de calcio, si bien fue menor que el de K, resultó mayor que el de los cereales (USDA, 2015), como habíamos mencionado previamente. Las semillas contribuyen considerablemente al contenido de calcio de la vaina y casi todo el magnesio también lo aportan las semillas, ya que como se mencionó anteriormente, los cotiledones

lo utilizan para la síntesis de clorofila. El calcio resulta importante para la reducción de riesgo de osteoporosis, constituyendo en Argentina un nutriente deficiente con niveles por debajo de la ingesta diaria recomendada (Durán y col., 2007). Como ya mencionáramos anteriormente, el nivel de calcio de estas harinas es superior al de otras leguminosas, convirtiendo a las mismas en ingredientes potenciales para la suplementación de la dieta con calcio. Entre los minerales minoritarios, como observamos previamente, el de mayor proporción fue el hierro, no observándose diferencias significativas entre harina con y sin semilla. Debido a la gran diferencia del contenido de cinc entre H10EF y H10SSF, se puede deducir que casi todo el Zn se encuentra en semilla.

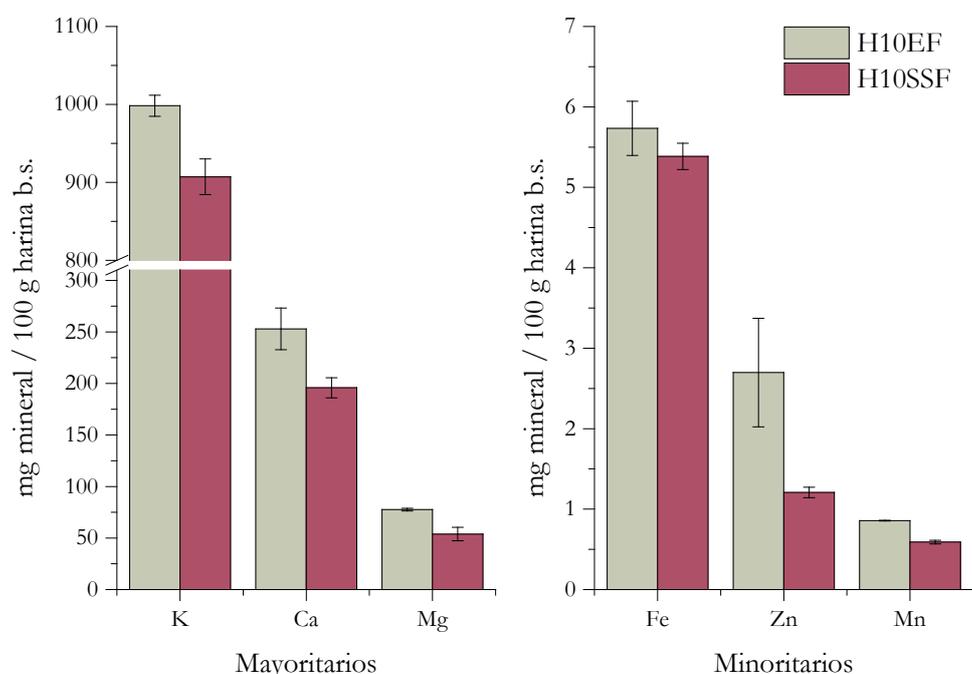


Figura 1.34. Minerales presentes en las cenizas de H10EF H10SSF.

3.8.6.2 Polifenoles y actividad antioxidante

Los polifenoles son componentes importantes de los ingredientes alimenticios, ya que contribuyen a la capacidad antioxidante. El contenido de polifenoles de harina de vaina entera, pulpa y semilla de *Prosopis alba* se muestran en la Figura 1.35. No se observaron diferencias significativas en el contenido de polifenoles de harina con y sin semilla. Este resultado sugiere que, debido a la baja proporción de las semillas en la vaina

(10%), los polifenoles están presentes principalmente en la parte externa del fruto. De todos modos, la actividad antioxidante de las semillas (2445 μ mol Trolox/100 g b.s.) resultó significativa y aproximadamente tres veces superior a la detectada en las harinas (801 y 984 μ mol Trolox/100 g b.s, para H10SSF y H10EF, respectivamente), sugiriendo que en la semilla existen otros componentes responsables de esta actividad. En la Tabla 1.10 se puede observar que el contenido de lípidos de la vaina entera (1.51 \pm 0.28 g/100 g b.s.) fue superior al de la vaina sin semilla (1.11 \pm 0.07 g/100 g b.s.) confirmando la contribución de las semillas al nivel de lípidos del fruto.

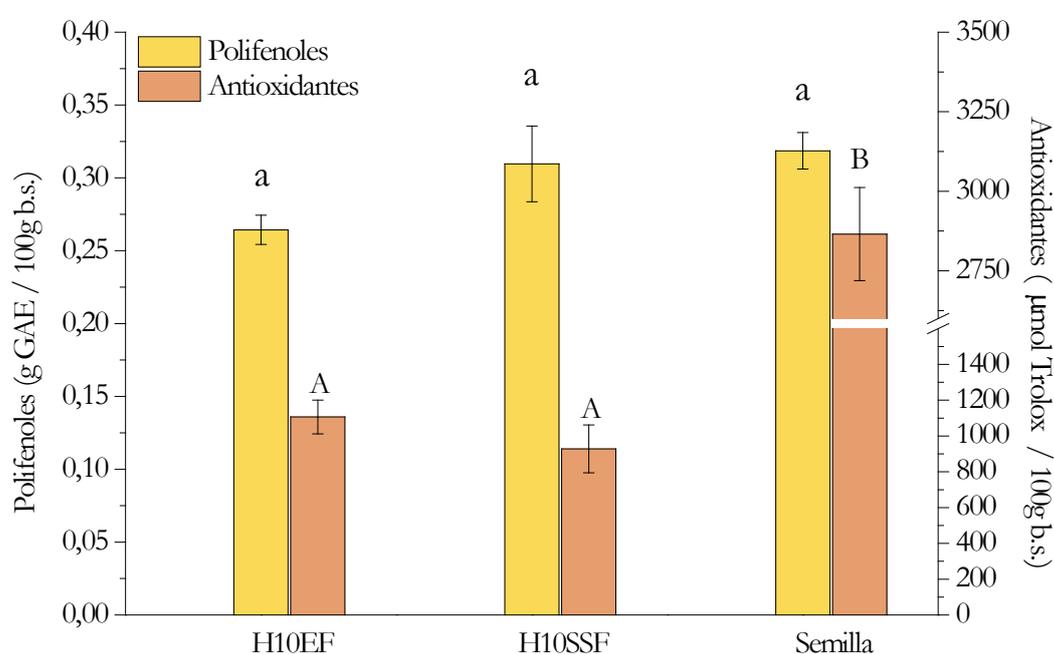


Figura 1.35 Polifenoles y actividad antioxidante de harina de vaina entera (H10EF), sin semilla (H10SSF).

Los resultados obtenidos en esta sección sugieren que se podría utilizar la semilla para la obtención de gomas y proteínas y el subproducto que queda, una harina de vaina sin semilla, podría igualmente ser utilizado en la elaboración de productos alimenticios, sin que se pierdan sustancialmente sus propiedades nutricionales.

3.8.7 Características físicas de las harinas de *Prosopis alba* y *Prosopis nigra*

Como la harina que se utilizó en la elaboración de los productos, bocaditos (Capítulo II) y panificados aptos para celíacos (Capítulo III), es la de *Prosopis alba* HA11S

y sus características químicas y nutricionales se compararon detalladamente con la harina de *Prosopis nigra* HN13S, es que se decidió estudiar para estas dos harinas, algunas propiedades físicas relacionadas con la calidad de esta materia prima y que se describen a continuación.

3.8.7.1 Color de las harinas

El aspecto de las harinas se muestra en la Figura 1.36. A simple vista no se evidencia diferencia de color, por lo que es necesario comprobarlo mediante un método óptico. La muestra HA11S presentó valores de L*, a* y b* de 76,82, 3,46 y 22,64 respectivamente, mientras que HN13S presentó valores de 78,29, 2,34 y 20,62, para los mismos parámetros. Los resultados sugieren que la harina HA11S al tener menor L* (menos luminosidad) y mayor a* (mayor tendencia al rojo) y b* (mayor tendencia al amarillo) que la HN13S posee un color con tonalidad levemente tendiente al rojizo.



Figura 1.36. Harinas de algarrobo negro (HN13S-*Prosopis nigra*) y algarrobo blanco (HA11S-*Prosopis alba*).

3.8.7.2 Actividad acuosa (a_w) de las harinas

Los valores de humedad inicial fueron de 0,0669 kg agua/kg materia seca para el HA11S y 0,01011 kg agua/ kg de materia seca para HN13S. La diferencia de humedad entre la muestra original y la muestra llevada a una determinada humedad de equilibrio en función de a_w se muestra en la Figura 1.37. Las regresiones lineales obtenidas fueron para HA11S $\Delta h = -0,0309 + (0,08824 * a_w)$ con $r^2 = 0,991$ y para HN13S $\Delta h = -0,0155 + (0,112 * a_w)$ con $r^2 = 0,995$. De la intersección a diferencia cero de humedad se determinó la actividad acuosa inicial de la muestra. Los valores de actividad acuosa a 20°C fueron de 0,351 y 0,138 para harina de algarrobo blanco y negro, respectivamente. Estos valores sugieren

que bajo las condiciones de secado y molienda, la HN13S tendría menor posibilidad de deterioro durante el almacenamiento debido a su menor a_w .

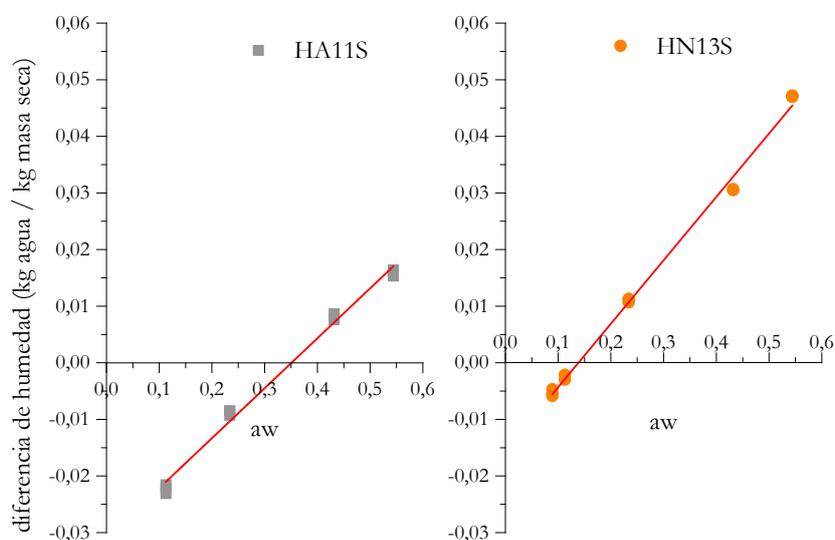


Figura 1.37. Determinación de la actividad acuosa de harinas de algarrobo.

3.8.7.3 *Determinación de las isoterms de adsorción*

La actividad acuosa (a_w) es una variable importante en la evaluación de la estabilidad de los alimentos. Valores menores a 0,7 facilitan, desde el punto de vista de la estabilidad microbiana, una mayor vida útil a temperatura ambiente. Por esta razón un $a_w < 0,7$ está generalmente asociada a un contenido “seguro” de humedad. Estos valores están bien determinados para cereales, oleaginosas y varios productos alimenticios (Chirife y Buera, 1994) y son utilizados para establecer el punto final de secado, lo que determina el tiempo asociado a dicho proceso.

El conocimiento de la relación del contenido de humedad en base seca- a_w a una determinada temperatura, puede contribuir a identificar el estado en que se encuentra el agua asociada a las diferentes moléculas en un alimento. El comportamiento frente a la adsorción de agua permite además determinar la fuerza impulsora para el secado y permite deducir la energía requerida para la operación Jovanovich y col. (2003), es decir, para desorber el agua de una muestra.

Se construyeron las isoterms de adsorción para las dos harinas a 10, 20 y 40°C. Las harinas de algarrobo llegaron a la humedad de equilibrio a los dos meses para 10°C y

entre los 25 y 30 días para 20°C y 40°C. Una vez que las muestras alcanzaron la humedad de equilibrio a cada a_w , se obtuvieron los puntos que relacionan esos dos parámetros. La forma de las isotermas es de tipo exponencial, características de los productos con elevado contenido de azúcar, y se las suele identificar como isotermas tipo “J”, o tipo III en la clasificación de BET.

Estos datos se modelaron con las ecuaciones descritas previamente en la sección Materiales y Métodos, y los parámetros de ajuste se resumen en la Tabla 1.11.

Tabla 1.11 Parámetros para cada modelo a las tres temperaturas estudiadas para HA11S y HN13S.

Modelo	Parámetro	HA11S			HN13S		
		10°C	20°C	40°C	10°C	20°C	40°C
BET	M_0	0,071±0,003	0,070±0,005	0,101±0,011	0,053±0,001	0,006±0,002	1,022±0,895
	C_{BET}	0,379±0,055	0,334±0,065	0,372±0,107	1,253±0,155	0,986±0,161	0,020±0,018
	r^2	0,993	0,986	0,974	0,995	0,992	0,997
	ECM (%)	1,14	1,19	2,27	0,88	1,0	0,43
Halsey	A_H	0,070±0,001	0,070±0,002	0,095±0,005	0,057±0,0013	0,061±0,002	0,137±0,002
	B_H	0,736±0,013	0,710±0,018	0,697±0,041	0,884±0,017	0,848±0,027	0,507±0,009
	r^2	0,997	0,992	0,967	0,995	0,989	0,997
	ECM (%)	0,8	0,9	2,54	0,88	1,23	0,38
Iglesias	A_I	0,059±0,002	0,054±0,002	0,081±0,003	0,054±0,0001	0,055±0,001	0,078±0,004
	B_I	-0,01±0,004	-0,01±0,004	-0,02±0,007	0,01±0,002	-2x10 ⁻⁴ ±0,003	-0,02±0,005
	r^2	0,984	0,973	0,967	0,995	0,991	0,952
	ECM (%)	1,7	1,6	2,56	0,84	1,0	1,62
Leiva	C_1	0,020±0,004	0,017±0,003	5,33x10 ⁻⁷ ±0,0001	0,018±0,003	0,011±0,003	0,007±0,002
	C_2	4,39±0,14	4,54±0,16	15,63±14,48	3,977±0,133	4,403±0,265	5,813±0,145
	C_3	2,762±0,261	2,720±0,300	0,492±0,371	1,942±0,154	1,580±0,191	1,791±0,183
	r^2	0,993	0,986	0,985	0,994	0,992	0,995
	ECM (%)	1,15	1,17	1,72	0,92	1,0	0,51

Las isotermas de adsorción de agua obtenidas para los puntos experimentales de HA11S se adaptaron al modelo de Halsey para 10°C y 20°C, y para el de Leiva a 40°C; en tanto, para HN13S resultó ser el modelo de Iglesias a 10°C, el modelo de Leiva a 20°C y el modelo de Halsey a 40°C. Si bien los ajustes de los otros modelos resultaron satisfactorios, los modelos mencionados anteriormente tuvieron un mejor ajuste al realizar una comparación con la opción compare models del programa OriginPro 9[®] de OriginLab[®].

Los modelos ajustados se muestran en la Figura 1.38, Figura 1.39 y Figura 1.40 para cada una de las temperaturas, se puede observar que para las dos especies estudiadas hay muy poca dispersión en los datos experimentales y que a 10 y 20°C los datos de HA11S se encuentran por debajo de los de HN13S, esto quiere decir que para una misma actividad acuosa las muestras de HA11S van a retener una menor cantidad de humedad a la misma temperatura. En el caso de 40°C los valores de HA11S se encuentran por encima de los de HN13S hasta una actividad acuosa de 0,4 aproximadamente y luego se ubican por debajo a mayores valores de a_w , se considera que este fenómeno sucede porque a mayores temperaturas los azúcares presentes en las muestras se solubilizan y cambian su capacidad de captar la humedad.

El efecto de la temperatura (Figura 1.41 y Figura 1.42) es “convencional” a bajas a_w , en coincidencia con las isothermas de productos no solubles, es decir, a una dada a_w , las isothermas realizadas a menores temperaturas tienden a retener más agua; de hecho como la adsorción es un fenómeno exotérmico, está favorecido a menores temperaturas. No obstante, a mayores a_w , ya hay azúcar solubilizada y esa otra característica es favorecida por mayores temperaturas. Al haber más azúcar soluble a temperaturas más altas, se puede retener más agua invirtiendo así el efecto de la temperatura, lo que determina el cruce de las isothermas (Johnson y Brennan, 2000). Es un fenómeno sutil que en este caso puede observarse satisfactoriamente por las ecuaciones ajustadas a los datos.

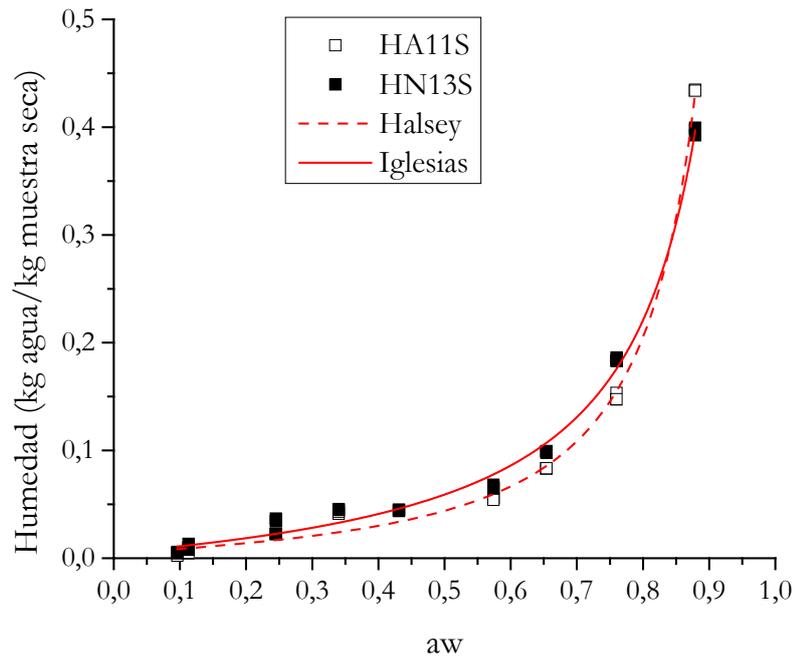


Figura 1.38. Isotermas de adsorción a 10°C para HA11S y HN13S

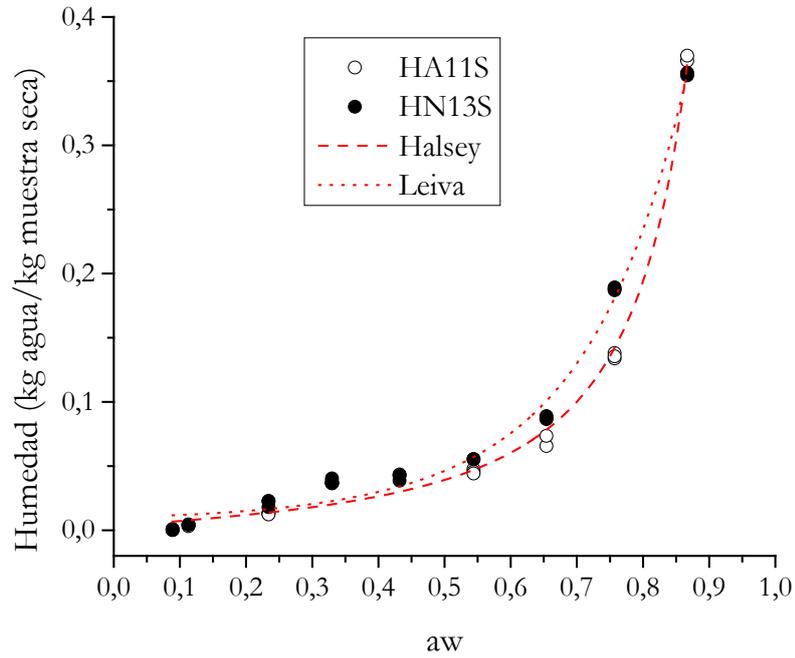


Figura 1.39. Isotermas de adsorción a 20°C para HA11S y HN13S.

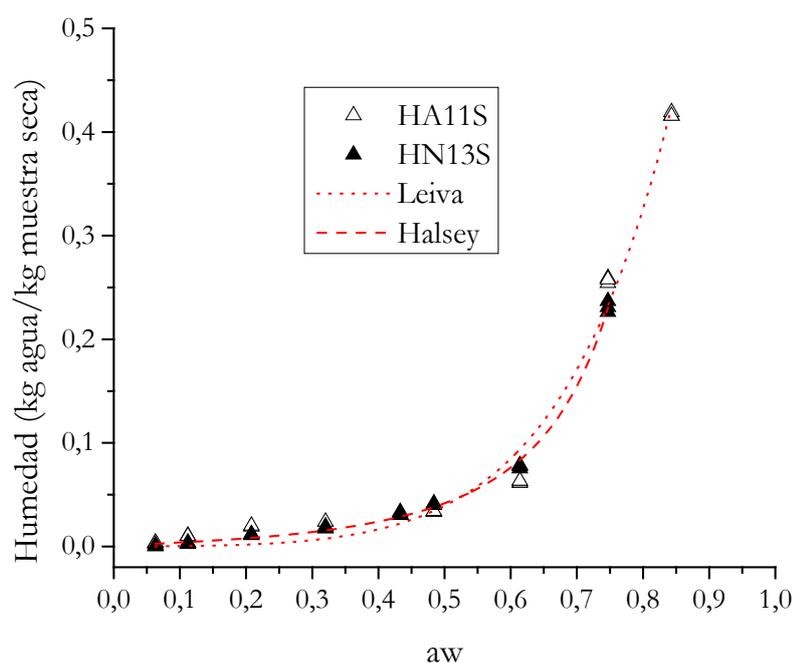


Figura 1.40. Isotherma de adsorción a 40°C para HA11S y HN13S.

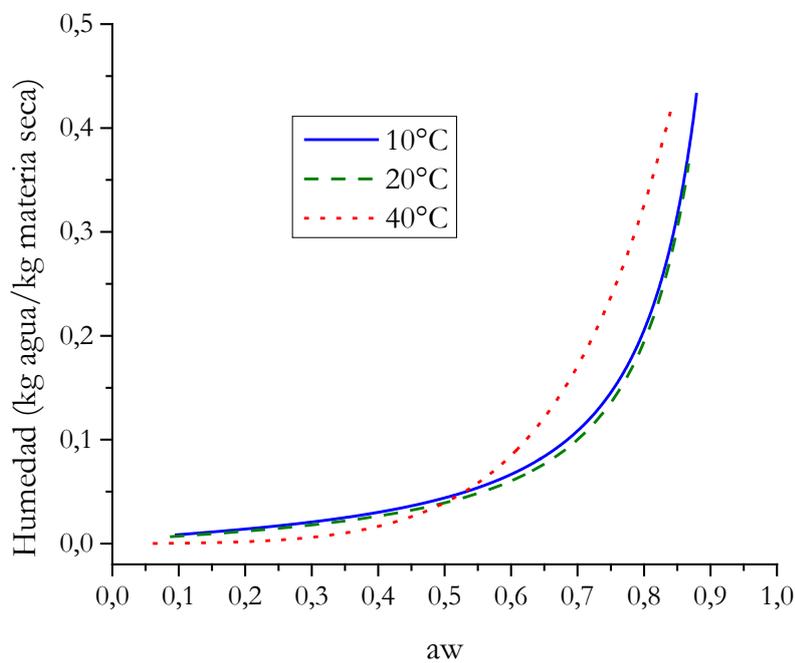


Figura 1.41. Isothermas de adsorción de harinas de *Prosopis alba*, HA11S a 10°C, 20°C y 40°C, las líneas representan los mejores modelos de ajuste en cada caso.

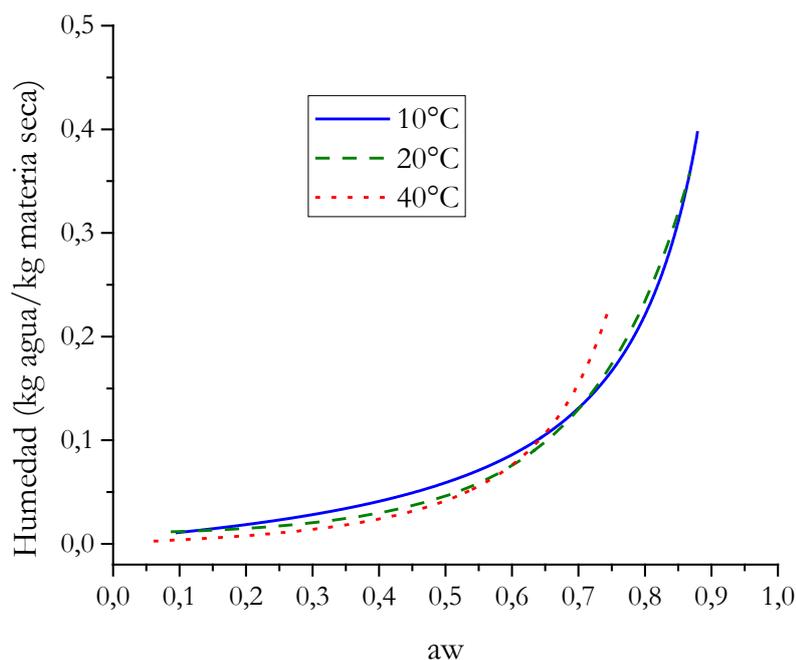


Figura 1.42 Isotermas de adsorción de harinas de *Prosopis nigra*, HN13S a 10°C, 20°C y 40°C, las líneas representan los mejores modelos de ajuste en cada caso.

A partir de los modelos matemáticos ajustados para cada condición y tomando un a_w de seguridad de 0,7 se calcularon las humedades en el equilibrio para esa actividad acuosa las mismas se muestran en la Tabla 1.12, de la que se puede apreciar que la humedad conveniente para almacenar la harina siempre debe ser menor a 0,100 kg H₂O/ kg muestra seca para HA11S y 0,130 kg H₂O/ kg muestra seca para HN13S.

Tabla 1.12 Humedades de almacenamiento calculadas a partir de los modelos para una a_w de 0,7.

	Temperatura	Modelo ajuste	Humedad (kg H ₂ O/ kg muestra seca.)
HA11S	10°C	Halsey	0,108
	20°C	Halsey	0,100
	40°C	Leiva	0,171
HN13S	10°C	Iglesias	0,131
	20°C	Leiva	0,130
	40°C	Halsey	0,155

3.9 Conclusiones parciales

Las harinas de *Prosopis alba* y *P. nigra* presentaron ciertas similitudes y diferencias en composición. En forma resumida, las de *P. alba* tienen mayor contenido de azúcares solubles y fibra, mientras que las de *P. nigra* tienen mayor contenido de proteínas, lípidos y polifenoles y también mayor actividad antioxidante. A pesar de las diferencias en los componentes de las semillas de ambas especies, es muy poco lo que se vería afectado el perfil nutricional de un alimento si se usa harina de vaina entera o harina de pulpa sin semillas; pudiendo de esta forma las semillas ser utilizadas para otros fines, como la obtención de suplementos dietarios proteicos o goma como fibra soluble destinadas a aplicaciones como ingredientes alimentarios. La fracción resultante de la extracción de la semilla puede complementar la harina de trigo, o per sé, en alimentos panificados u horneados dulces.

Capítulo

II

Elaboración de un
bocadito dulce con
base en semillas
nativas americanas y
harina de algarrobo
blanco

La del Gualicho

*Cruzando los arenales me vine hasta aquí.
En cuanto el sol amanezca tendré que partir.
Algarrobo de mi tierra, vainas doradas.
Así don Ricardo Rojas te lo cantaba.*

*Amalhaya china yuya me supo olvidar.
Gualicho me lo hace falta pa hacerla llorar.
Tarareo... La chacarera...
Gualicho me lo, hace falta pa hacerla llorar.*

*Mañana cuando me vaya por el salitral
Consuelos tendrá que darme la chacarera.
Guitarrita caspi sonko vámosnos los dos.
Adiós mi tierra shalaca, Telares, adiós...*

*Amalhaya china yuya me supo olvidar.
Gualicho me lo hace falta pa hacerla llorar.
Tarareo... La chacarera...
Gualicho me lo hace falta pa hacerla llorar.*

Letra y música: Atahualpa Yupanquí

1 Introducción

Las barras de cereal son productos listos para comer que suman a su buen perfil nutricional, características organolépticas agradables así como una alta durabilidad en góndola. Las mismas suelen estar fortificadas con vitaminas, minerales y fibra para lograr obtener un alimento nutricionalmente balanceado y son populares como colaciones que pueden transportarse fácilmente y pueden ser consumidas entre comidas o como sustitutos de las mismas. Fueron introducidas a mediados de los 90 como una alternativa saludable a las golosinas y confituras, al mismo tiempo que los consumidores empezaban a tomar conciencia de la importancia de tener una dieta saludable (Bower y Whitten, 2000).

Algunas de las causas por las que las barras de cereal ganaron adeptos fueron:

- a- La disminución de la frecuencia del almuerzo en familia.
- b- El aumento de la conciencia de la alimentación saludable.
- c- Un aumento en el tiempo ocioso en el hogar lo que lleva a un mayor consumo de golosinas.

En el nicho del mercado correspondiente a barras de cereal se pueden encontrar varios segmentos como barras saludables, barras sin conservantes, barras bajas en sodio, barras sin azúcar agregada, barras para deportistas e infinidad de otros rótulos. La franja etaria de mayor consumo se sitúa entre los 15-24 años de edad y aunque la mayoría de los consumidores asocian a las barras de cereal con comida saludable, Boustani y Mitchell (1990) demostraron que la mayoría de los *snacks* son igual o menos saludables que cualquier otra golosina que se encuentre en el mercado, por lo que se debe tener cuidado a la hora de consumir estos productos informándose acerca de su composición, aporte calórico, contenido de sodio, conservantes, entre otros.

Las barras contienen azúcar como ingrediente principal, la cual no sólo endulza el producto sino que cumple la función de aglutinante. Habitualmente las barras están compuestas por una base de avena triturada, miel, aceite de soja, trigo entero, cebada triturada, láminas de arroz entero, suero de leche deslactosado a lo que se le pueden agregar diversas frutas y nueces; como agentes ligantes son utilizados edulcorantes naturales o materias grasas (Cook y col., 1984).

En el presente trabajo se planteó una alternativa a este tipo de producto, utilizando un formato cilíndrico y de pequeño tamaño; como aglutinantes una mezcla de azúcar refinado, miel y harina de algarrobo blanco y como elementos aglutinados semillas; por lo que se decidió en lugar de utilizar el término barra de cereal, apropiado para denominar aquellos productos que tienen como constituyente uno o varios tipos de cereales y forma de barra, utilizar el de “bocadito”, más adecuado para describirla.

Se utilizaron semillas de diferentes especies botánicas de origen americano, ampliamente difundidas y hoy revalorizadas y utilizadas con diversos fines gastronómicos, como la chía (*Salvia hispánica*), la quinua (*Chenopodium quinua*) y el amaranto (*Amaranthus caudatus*) (Figura 2.43).

La combinación de la harina de algarroba con semillas enteras en la formulación de bocaditos dulces permitiría la obtención de un producto de alto valor nutricional, muy versátil agregando así valor a este fruto subutilizado y otorgando a los productores una opción más para la elaboración de un producto de consumo muy masivo. En general son productos livianos, ocupan poco volumen y resultan estables durante el almacenamiento. Este producto aportaría fibra dietaria, minerales, vitaminas, ácidos grasos ω -6 y ω -9, entre otros componentes.

Las semillas de chía, (*Salvia Hispanica*) provienen de una planta herbácea de la familia de las *Lamiáceas* nativa del centro y sur de Méjico y Guatemala. La semilla de forma oval de entre 1 y 2 mm, contiene entre un 25 a un 40% de lípidos; de ese porcentaje el 60% corresponde a ácidos grasos ω -3 y ω -6 este último en menor proporción. Estos dos ácidos grasos son esenciales para la nutrición del cuerpo humano ya que éste no los puede sintetizar. La composición aproximada de esta semilla es de 15-25% de proteínas, 26-41% de carbohidratos, 18-30% de fibra, 4-5% de ceniza, además de los lípidos mencionados; aunque también tiene propiedades antioxidantes y vitaminas y no posee gluten (Mohd Ali y col., 2012).

El Amaranto (*Amaranthus caudatus*) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las *Amarantáceas* cuyo origen son los andes peruanos teniendo un desarrollo óptimo entre los 1400 a los 2400 msnm. Se siembra como cultivo menor en América Central y América del Sur como también en algunos países de África y Asia. Es una planta muy resistente a la sequía de la que se obtienen muy buenos rendimientos en

semillas. Sus hojas también son comestibles, sus semillas tienen muy variados usos como harina o como grano inflado con las que se realizan las más diversas preparaciones. El grano tiene entre 6-10% de humedad, entre 15-18% de proteína, entre 5,6-8,2 % de lípidos, entre 3,2-5,8 % de fibra y entre 2,8-3,8 % de ceniza. El 62% del grano está compuesto por almidón, encontrándose valores bajos de sacarosa, rafinosa, estaquiosa, maltosa e inositol. El amaranto posee un valor de lisina disponible del 6,3% (Becker y col., 1981).

La quinua (*Chenopodium quinua*) también tiene su centro de diversificación en lo que es la zona de Bolivia y Perú, siendo cultivada actualmente en todos los andes sudamericanos. Es una planta herbácea perteneciente a la familia de las *Chenopodeaceae*, su crecimiento óptimo está dado entre 0 y 4000 msnm, siendo más común a los 2500 msnm. El cultivo de quinua cayó a principios del siglo XX aunque actualmente esta planta se encuentra en el foco de atención ya que representa el redescubrimiento del “grano madre de los Incas”. El mismo está compuesto por un 6,8-20% de humedad, un 1,8-9,3% de lípidos, 7,5-22,1% de proteínas, 2,2-9,8% de cenizas, 1,1-16,3% de fibra y de un 38,7-71,3% de carbohidratos. La quinua tiene un contenido de lisina disponible del 6,0%. (Kozioł, 1992).

Las tres especies son pseudocereales, se denomina de esta forma a todas las plantas de hoja ancha no gramínea que son utilizadas de igual forma que los cereales ya que son molidas para la obtención de harinas. Se definió utilizar estas tres semillas ya que las tres son de origen americano, las mismas se cultivan dentro del territorio argentino en la región del NOA (Noroeste Argentino). Las tres semillas son utilizadas por los pobladores para su venta directa a acopiadores y en menor medida para la preparación y venta artesanal de productos regionales, por lo que la obtención de productos novedosos en base a este tipo de semillas podría llegar a ser de ayuda para pequeños productores de alimentos para incorporar nuevos productos a los que venden habitualmente.



Figura 2.43. Productos a base de Chía y Quinoa que se venden en Perú.

2 Objetivos

El objetivo central de este capítulo fue evaluar la aplicabilidad de la harina de algarrobo blanco en la elaboración de un bocadito dulce.

Como objetivos específicos se fijaron:

- Determinar el tiempo óptimo de cocción como así también el tratamiento adecuado de las semillas para su correcto uso en la formulación.
- Determinar los principales parámetros de textura del bocadito.
- Realizar un panel sensorial no entrenado para definir la mejor formulación entre los consumidores.
- Obtener un producto tecnológicamente sencillo de realizar cuya transferencia al pequeño y mediano productor sea fácil poner en práctica.

3 Materiales y Métodos

3.1 Obtención del producto inicial

Luego de una prolongada búsqueda de diferentes formulaciones de barras de cereal comerciales se optó por una formulación base de barras naturales sin aditivos ni conservantes, cuya composición se puede ver en la Tabla 2.13. A partir de la misma se diseñó preliminarmente una formulación, en la que la materia grasa de la barra de cereal se cambió totalmente por semillas de chía. La granola (copos de avena, nueces y miel) en conjunto con los copos de arroz se cambiaron por semillas de amaranto y quinoa en

proporciones equivalentes. Los aglutinantes que en el caso de la formulación naturista eran azúcar y miel se conservaron a lo que se les agregó harina de algarrobo (como fuente de sacarosa y fibra) con el propósito de reducir los azúcares aportados por la miel y la sacarosa agregada. De esta forma se obtuvo una formulación preliminar que se puede ver en la Tabla 2.14.

Tabla 2.13. Formulación naturista utilizada de punto de partida para la formulación de la tesis.

Formulación base	g / 100 g Formulación
Azúcar (sacarosa)	42,89
Manteca	2,89
Miel	5,572
Arroz en copos	9,749
Granola (copos de avena, nueces y miel)	38,9

Tabla 2.14. Formulación preliminar utilizada de punto de partida para realizar los bocaditos dulces.

Formulación propuesta	g / 100 g Formulación
Azúcar (sacarosa)	4,1
Miel	29,1
Harina de Algarroba	15
Semillas de Chía	7,8
Semillas de Amaranto	22
Semillas de Quinoa	22

3.2 Obtención del modelo

Con el fin de estudiar el comportamiento de los aglutinantes se ingresaron los mismos (miel, sacarosa y harina de algarrobo) en un diseño de mezclas pero con restricciones; la restricción del modelo fue que ninguno de los puntos podía tener un 100% de harina de algarrobo como aglutinante ya que la miel y la sacarosa son necesarias para la aglutinación. Utilizando el programa Design expert 7.0, se obtuvo un diseño de mezclas con restricciones para los aglutinantes que se muestra en la Tabla 2.15. El gráfico correspondiente al diseño se muestra en la Figura 2.44. El contenido de chía, quinoa y amaranto se mantuvo constante para todo el ensayo (51,8 g totales).

Tabla 2.15. Diseño de mezcla del aglutinante.

Formulación	Variables Codificadas			Variables Decodificadas (g/48,2g)		
	Miel	Azúcar	Algarroba	Miel	Azúcar	Algarroba
A	0,333	0,333	0,333	16,07	16,07	16,07
B	0	0,333	0,666	0	16,08	32,12
C	1	0	0	48,2	0	0
D	0,333	0	0,666	16,08	0	32,12
E	0	1	0	0	48,2	0

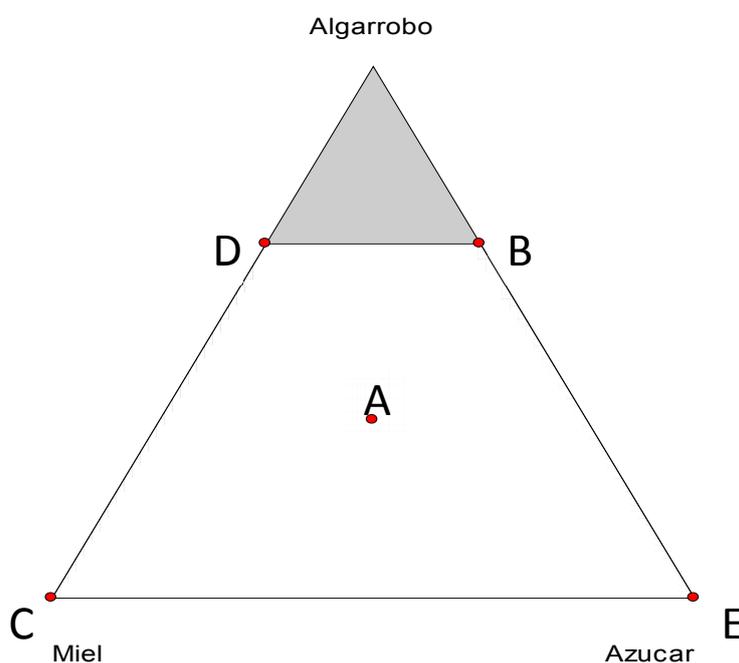


Figura 2.44. Diseño de mezclas de aglutinantes.

3.3 Tratamiento de los ingredientes

Los aglutinantes para la elaboración del bocadito se utilizaron en la formulación de la forma en la cual se obtienen: el azúcar y la harina de algarrobo en su forma sólida y la miel en su forma líquida. Para el caso de las semillas, a las mismas se las debió tratar para que junto a los aglutinantes se obtenga un resultado armónico ya que las semillas tienen ciertas características de dureza y componentes que afectan la calidad nutricional u organoléptica que impiden su uso de forma directa en cualquier tipo de alimento.

3.3.1 Tratamiento de la quinua

Las semillas de quinua fueron previamente tratadas ya que las mismas presentan saponinas que son glicósidos triterpénicos que se encuentran en la cubierta de la semilla (pericarpio) (Ma y col., 1989), que le confieren sabor amargo y deben ser eliminadas antes de su consumo. Hay varias formas de eliminarlas; la que se utilizó para este trabajo consistió en mezclar las semillas con agua en una proporción 1:8 y enjuagar las semillas por agitación hasta eliminar la espuma. Las saponinas son compuestos espumígenos y cuando la espuma desaparece se asume que el grano está limpio (Koziol, 1992).

Una vez eliminadas las saponinas el paso siguiente fue determinar el tiempo de cocción de la quinua. La cocción consistió en poner la quinua en un recipiente con una proporción quinua:agua de 1:3, llevar a ebullición; mantener 3 minutos a ebullición y luego retirar del fuego. Se coló luego la mezcla y se guardó hasta su utilización. Este proceso se repitió tres veces para evaluar su reproducibilidad. En la Tabla 2.16 se muestra la humedad y la actividad acuosa de las semillas de quinua para las tres cocciones. Como se puede observar, si bien hay diferencia significativa entre las humedades, todas están en el rango de entre 64 a 67%; se remarca que con la humedad de la quinua es suficiente para realizar la formulación sin necesidad de agregar más agua.

La formulación llevó 22 g de quinua seca cada 100 g; como se la debe humedecer para sacar las saponinas y luego cocinar para lograr un grano blando, lo que se obtiene es quinua húmeda; luego de la cocción se le determinó el contenido de humedad a las muestras por pesada en estufa infrarroja. Una vez determinada la humedad utilizando la Ecuación 2.14, Ecuación 2.15, Ecuación 2.16 y Ecuación 2.17 se calcularon los gramos de quinua húmeda equivalentes a 22 g de quinua seca.

Tabla 2.16. Humedad y actividad acuosa de la quinua antes y después de la cocción.

	Humedad	a_w 25°C
Antes de cocción	13,60 ± 0,08	0,686 ± 0,008
Cocción 1	64,12 ± 0,56 ^B	0,993 ± 0,002 ^A
Cocción 2	64,52 ± 2,41 ^{AB}	0,992 ± 0,003 ^A
Cocción 3	67,31 ± 0,24 ^A	0,992 ± 0,003 ^A

$$g H_2O = \frac{(Pf - Pi)}{Pi} * 100 \quad \text{Ecuación 2.14}$$

$$g ms = 100 - g H_2O \quad \text{Ecuación 2.15}$$

$$W_f = \frac{g H_2O}{g ms} \quad \text{Ecuación 2.16}$$

$$m_f = \frac{m_0 * (1 + W_f)}{1 + W_0} \quad \text{Ecuación 2.17}$$

P_f Peso final de la muestra

P_i Peso inicial de la muestra

g H₂O Gramos de agua

g ms Gramos de materia seca

m₀ Masa de quinua seca necesaria para la formulación

W₀ Humedad de la quinua seca expresada en g H₂O / g ms

m_f Masa final de quinua húmeda a agregar a la formulación

3.3.2 Tratamiento de la chía y el amaranto

La chía y el amaranto se calentaron en porciones sucesivas de 10 g cada una y por vez, de modo de asegurar un calentamiento homogéneo a cada porción. La chía se tostó mediante calentamiento en hornalla a fuego medio durante tres minutos, mientras que el amaranto se sometió a calentamiento seco para lograr el “popeo”. El “popeo” es un proceso por el cual los granos que tienen una cáscara dura y un relleno amiláceo como el grano de amaranto, sellan esa humedad dentro del mismo y al calentarse aumenta la presión desde el centro hasta romper violentamente la cáscara. La finalidad de tratar térmicamente los granos fue la de disminuir su dureza, ya que ambos granos son muy duros si no se les aplica ningún tratamiento. A los granos también se les determinó la humedad y la actividad acuosa antes y después del tratamiento térmico, valores que se muestran en la Tabla 2.17.

Tabla 2.17. Valores de humedad y a_w para las semillas de chía y amaranto antes y después de sus procesos térmicos.

		Humedad	a_w 25°C
Chía	Antes de tostado	9,30±0,07	0,680±0,001
	Después de tostado	1,32±0,02	0,076±0,020
Amaranto	Antes de “popeo”	12,09 ±0,13	0,676 ± 0,005
	Después de “popeo”	2,07 ± 0,27	0,087 ± 0,009

3.3.3 Preparación de los bocaditos

Los bocaditos se prepararon colocando la quinua húmeda en un recipiente de acero inoxidable, luego se agregó la miel, el azúcar y por último la harina de algarrobo, mezclando los ingredientes con cuchara de madera. Luego se agregó la chía y el amaranto hasta obtener un producto homogéneo. La mezcla se dejó equilibrar 24 h a 4°C.

Una vez equilibradas las muestras se introdujeron en moldes de cobre circulares de 27,32 mm de diámetro interno y 9,08 mm de altura (Figura 2.45); el llenado al ras albergó entre 6 y 8 g de mezcla. Las muestras se colocaron en bandejas de chapa precalentadas en horno y se cocinaron a 160±10°C.



Figura 2.45. Moldes utilizados para la elaboración de los bocaditos.

3.3.4 Determinación del tiempo de cocción

Para determinar el tiempo de cocción, se puso como objetivo bajar el a_w de cada formulación a menos de 0,7; siendo esta actividad acuosa la que se seleccionó como límite de seguridad. Para llevar a cabo el ensayo se prepararon seis bandejas, cada una de ellas contenía las 5 formulaciones arrojadas por el diseño de mezcla. Las 6 bandejas se ingresaron al horno y se las retiró del mismo a intervalos regulares de 5 minutos cada

uno, por lo que la primera bandeja cocinó las cinco formulaciones cinco minutos, la segunda 10 minutos y así sucesivamente hasta los 30 minutos. Este ensayo se realizó por triplicado, por lo tanto de cada una de las formulaciones se obtuvieron tres muestras en cada tiempo para determinar color, a_w y humedad. Una vez determinados los tiempos de cocción se hornearon 10 bocaditos más de cada formulación a los tiempos determinados en el ensayo previo, con el fin de medir la textura de los mismos. Para todos los casos, los bocaditos una vez cocidos se los guardó envueltos en film de nylon durante 24 horas a temperatura ambiente (20°C) para lograr la estabilización de la humedad de la formulación. Luego de 24 horas los bocaditos estuvieron aptos para realizar los ensayos.

3.4 Ensayos de calidad del producto

3.4.1 Humedad

La masa de quinua húmeda a utilizar en la formulación se determinó mediante pesada en una balanza termo-gravimétrica Metler (Metler Toledo, Suiza) a 105°C hasta peso constante.

La humedad del resto de los componentes y de los bocaditos se determinó también en forma gravimétrica secando el producto en estufa de convección forzada San Jor (San Martín, Buenos Aires) a 105°C hasta peso constante, tomando el peso constante como la variación entre pesadas menor al 3% del peso final. El contenido de humedad se calculó de la misma forma que la expresada en el Capítulo I.

3.4.2 Actividad acuosa (a_w)

La actividad acuosa (a_w) se determinó en un equipo AQUALAB serie 3 que emplea el método de determinación de punto de rocío. En este equipo, la muestra es equilibrada con el aire presente en una cámara sellada que contiene la muestra, un espejo, un sensor óptico, un micro-ventilador y un termómetro infrarrojo. El ventilador interno genera una circulación de aire que reduce el tiempo de equilibrio entre la muestra y el aire de la cámara. El equilibrio se logra sin pérdida ni ganancia considerable de humedad para la muestra en virtud de que su masa es mucho mayor que la del aire y sobre todo, que la del vapor contenido en él. El rango de medición de a_w se encuentra entre 0,03 y 1, con una

resolución de $\pm 0,001$. La medición normalmente se logra en 5 minutos. El equipo exhibe los datos de actividad acuosa y temperatura de equilibrio en un visor digital.

3.4.3 Color

El color se midió de igual forma que en el Capítulo I, determinándose los parámetros L^* , a^* y b^* del espacio de color CIELAB. La variación de color durante el horneado se realizó transformando los parámetros L^* , a^* y b^* en los parámetros C^* y h^* que posibilitaron el cálculo de la diferencia de color ΔE_{2000} (CIEDE 2000), establecida por la comisión internacional de iluminación (CIE, por sus siglas en francés) y relacionada con la diferencia de color antes y después del horneado. Esta nueva fórmula considera algunos parámetros, además de los ya mencionados, para mejorar la diferenciación en la escala de los azules y de los grises.

Para el cálculo del valor ΔE_{2000} se divide en 4 pasos el procesamiento de los datos (Luo y col., 2001, Sharma y col., 2005) teniendo para el tiempo inicial L^*_0 , a^*_0 , b^*_0 :

Paso 1: medir L^* , a^* , b^* y calcular C^*_{ab}

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ecuación 2.18}$$

Paso 2: Calcular a' , C' y h'

$$L' = L^* ; b' = b^* \quad \text{Ecuación 2.19}$$

$$\overline{C^*_{ab}} = \frac{C^*_{ab0} + C^*_{ab}}{2} \quad \text{Ecuación 2.20}$$

$$G = 0,5 * \left(1 - \sqrt{\frac{\overline{C^*_{ab}}^7}{\overline{C^*_{ab}}^7 + 25^7}} \right) \quad \text{Ecuación 2.21}$$

$$a' = (1 + G) * a^* \quad \text{Ecuación 2.22}$$

$$h' = \tan^{-1} \left(\frac{b'}{a'} \right) \quad \text{Ecuación 2.23}$$

$$C' = \sqrt{a'^2 + b'^2} \quad \text{Ecuación 2.24}$$

Paso 3: Calcular $\Delta L'$, $\Delta C'$, $\Delta H'$

$$\Delta L' = L' - L'_0 \quad \text{Ecuación 2.25}$$

$$\Delta C' = C' - C'_0 \quad \text{Ecuación 2.26}$$

$$\Delta h' = h' - h'_0 \quad \text{Ecuación 2.27}$$

$$\Delta H' = 2 * \sqrt{C' * C'_0} * \sin\left(\frac{\Delta h'}{2}\right) \quad \text{Ecuación 2.28}$$

Paso 4: Calcular ΔE_{2000} , donde \bar{L}' , \bar{C}' , \bar{h}' son las medias aritméticas de los pares L' , C' y h' .

$$\Delta E_{2000} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{K_L * S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C * S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H * S_H}\right)^2 + R_T * \left(\frac{\Delta C'}{K_C * S_C}\right) * \left(\frac{\Delta H'}{K_H * S_H}\right)} \quad \text{Ecuación 2.29}$$

$$S_L = 1 + \frac{0,015 * (\bar{L}' - 50)^2}{\sqrt{20 + (\bar{L}' - 50)^2}} \quad \text{Ecuación 2.30}$$

$$S_C = 1 + 0,045 * \bar{C}' \quad \text{Ecuación 2.31}$$

$$S_H = 1 + 0,015 * \bar{C}' * T_{\Delta E} \quad \text{Ecuación 2.32}$$

Dónde:

$$T_{\Delta E} = 1 - 0,17 * \cos(\bar{h}' - 30^\circ) + 0,24 * \cos(2\bar{h}') + 0,32 * \cos(3\bar{h}' + 6^\circ) - 0,20 * \cos(4\bar{h}' + 63^\circ) \quad \text{Ecuación 2.33}$$

$$\Delta\theta = 30 * \exp\left\{-\left[\frac{(\bar{h}' - 275^\circ)}{25}\right]^2\right\} \quad \text{Ecuación 2.34}$$

$$R_C = 2 * \sqrt{\frac{\bar{C}'^7}{\bar{C}'^7 + 25^7}} \quad \text{Ecuación 2.35}$$

$$R_T = -\sin(2 * \Delta\theta) * R_C \quad \text{Ecuación 2.36}$$

3.4.4 Textura de los bocaditos

La textura es una de las características más importantes que determinan la preferencia de los consumidores en este tipo de productos; el análisis de TPA es utilizado como estándar para evaluar las características sensoriales de alimentos sólidos, este ensayo intenta imitar la masticación y sus parámetros derivados (Kim y col., 2009).

La textura de los bocaditos fue evaluada directamente en las muestras tal cual como se obtuvieron de los moldes, utilizando un texturómetro (TA.XT2i Stable Micro Systems, UK). Los bocaditos fueron sometidos a dos ciclos de compresión del 40%, las curvas de fuerza vs. tiempo fueron obtenidas a una velocidad de 0,5 mm/s con una probeta plana de 75 mm de diámetro (SMSP/75). Se determinó la fuerza, consistencia,

cohesividad, resiliencia, elasticidad y masticabilidad en 10 replicados de cada muestra. En la Figura 2.50 se muestra dividido con líneas verticales un análisis del perfil de textura típico de un bocadito. Las líneas verticales numeradas con números azules definen las áreas que se tuvieron en cuenta y los tiempos de análisis. La letra F indica la fuerza máxima para el 40% de compresión e indica la dureza. Las Ecuación 2.37 a Ecuación 2.42 detallan cómo se calculó cada parámetro de textura.

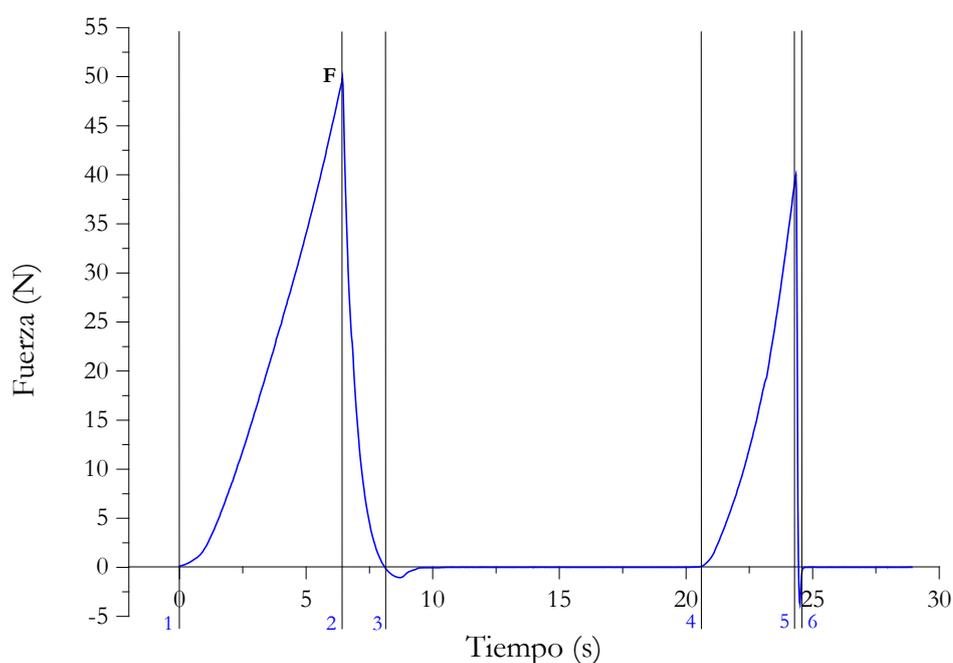


Figura 2.46 Perfil de textura típico de un bocadito, los números indican los intervalos de tiempo para el cálculo de las áreas correspondientes.

$$\text{Dureza} = F \text{ (N)} \quad \text{Ecuación 2.37}$$

$$\text{Consistencia} = \text{Area } 1:2 + 2:3 + 4:5 + 5:6 \text{ (Ns)} \quad \text{Ecuación 2.38}$$

$$\text{Cohesividad} = \frac{\text{Area } 4:5 + 5:6}{\text{Area } 1:2 + 2:3} \quad \text{Ecuación 2.39}$$

$$\text{Resiliencia} = \frac{\text{Area } 2:3}{\text{Area } 1:2} \quad \text{Ecuación 2.40}$$

$$\text{Elasticidad} = \frac{\text{Tiempo } 4:5}{\text{Tiempo } 1:2} \quad \text{Ecuación 2.41}$$

$$\text{Masticabilidad} = \text{Fuerza} * \text{Cohesividad} * \text{Elasticidad} \text{ (N)} \quad \text{Ecuación 2.42}$$

3.5 Análisis sensorial

Se utilizaron dos métodos para medir aceptabilidad sensorial, un ordenamiento por preferencia que fue utilizado con el objetivo de discriminar una serie de muestras según un atributo. El segundo método utilizado fue el de escala hedónica, este método se utilizó para saber cuál fue el grado de aceptabilidad de los bocaditos para los diferentes atributos seleccionados (Civille y col., 1999).

3.5.1 Ordenamiento de preferencia

El objetivo de este primer panel fue que los evaluadores ordenen las formulaciones de izquierda a derecha, desde la que *gusta más* a la que *gusta menos*; para lo que a cada evaluador se le entregó una bandeja con cinco muestras ordenadas en forma aleatoria. Cada una de las bandejas contaba con cinco números de tres dígitos elegidos al azar, cada uno de esos números correspondía a una muestra, y para cada bandeja el orden de las muestras cambiaba ya que se realizó una aleatorización. A cada evaluador conjuntamente con la bandeja se le entregó una planilla (Ver Anexo Capítulo II). El panel sensorial se realizó entre las 15 y las 17 horas, horario recomendado ya que se encuentra lejos de las comidas. Para la prueba se utilizaron 55 panelistas no entrenados. Una vez obtenidos los resultados se calcularon las sumas de los ordenamientos para cada muestra y se evaluó estadísticamente con la ayuda del test de Friedman. Este test determina si las sumas de los ordenamientos totales para cada muestra difieren significativamente (Ecuación 2.43).

Hay diferencias significativas si el valor de F es mayor a los valores tabulados para determinados valores de N y k. En el caso de que existan diferencias significativas entre los valores se realiza un ensayo de múltiple comparación con lo que se calculan las diferencias de todos los pares de muestras utilizando la Ecuación 2.44.

$$F = \frac{12}{Nk(k+1)} (R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_n^2) - 3N(k+1) \quad \text{Ecuación 2.43}$$

N número de evaluadores

k número de muestras

R1, R2 sumatoria de los ordenamientos de las muestras

$$|M_u - M_v| \geq Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{Nk(k+1)}{6}} \quad \text{Ecuación 2.44}$$

$|M_u - M_v|$ Diferencia de los valores absolutos de los puntajes

Z para una significancia de 0,05 es de 1,96

N número de evaluadores

k número de muestras.

3.5.2 Escala hedónica

El objetivo del segundo panel fue caracterizar las dos muestras de mejor preferencia seleccionadas de entre las cinco muestras totales, de acuerdo a cinco atributos y plantear dos hipótesis: 1) la hipótesis nula que plantea que no hay diferencias significativas entre las muestras y 2) la hipótesis alternativa que postula que entre las muestras se encuentran diferencias significativas. Para realizar este panel se utilizaron sesenta panelistas no entrenados y se le presentó a cada uno una planilla (ver Anexo Capítulo II) con cinco atributos a evaluar que fueron: aceptabilidad general, apariencia, cohesividad, aroma, dulzor y astringencia.

A cada evaluador se le presentaron dos muestras en una bandeja, codificadas con números de tres cifras al azar, y cada bandeja en orden aleatorio. A cada uno de los atributos de las planillas con la respuesta de los evaluadores se les asignó un puntaje de 1 al 9, siendo para el 1 *no gusta* y para el 9 *gusta*. Una vez decodificadas las planillas se realizó un ANOVA para cada atributo utilizando una significancia de 0,05 y se compararon las medias con el test de Fisher.

3.6 Análisis cuantitativo

Los ensayos cuantitativos se realizaron sobre bocaditos de la formulación seleccionada mediante análisis sensorial. Los mismos se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante, luego se molieron en molino de laboratorio (IKA® Heavy-Duty Analytical Mill, Cole-Parmer, USA). Al polvo obtenido se le determinó proteína por el método de Kjeldahl, lípidos por el método de Soxhlet, cenizas por calcinación a 550°C y humedad hasta peso constante a 105°C. Todas las técnicas mencionadas se aplicaron de

la misma forma que en el Capítulo I. El contenido de hidratos de carbono se obtuvo por diferencia.

4 Resultados y Discusión

4.1 Tratamiento de las semillas

Para la preparación de los bocaditos las semillas sufrieron diferentes tratamientos térmicos, en la Figura 2.47 a Figura 2.49 se muestra el aspecto antes y después de los tratamientos térmicos para cada tipo de semilla.



Figura 2.47. Quinoa antes (izquierda) y después (derecha) de la cocción.



Figura 2.48 Amarantho antes (izquierda) y después (derecha) del proceso térmico “popeo”.



Figura 2.49. Chía antes (izquierda) y después (derecha) del proceso térmico.

4.2 Tiempo de horneado

En la Figura 2.50 a Figura 2.54 se muestran las gráficas de humedad y actividad acuosa en función del tiempo de horneado para cada formulación. Se puede observar que las formulaciones A y B tienen un tiempo de cocción de 25 minutos y que las formulaciones C, D y E tienen un tiempo de cocción de 30 minutos, esto es esperable dado a que las formulaciones A y B parten de una menor humedad debido a que la formulación A tiene menor cantidad de miel y tanto el azúcar como el harina de algarrobo no aportan humedad, mientras que la formulación B solamente tiene azúcar y harina de algarrobo. Por otro lado, en las formulaciones D y C (ambas sin azúcar) la miel aporta humedad y son las formulaciones con mayor humedad de partida. La formulación E presenta con el tiempo una disminución de humedad menos pronunciada. En la Tabla 2.18 se muestran los tiempos finales de cocción para cada punto, su humedad y actividad acuosa y en la Figura 2.55 se muestran los bocaditos antes y después del horneado. No se observaron diferencias significativas en los valores de a_w de los diferentes bocaditos. Por otro lado, para aproximadamente la misma a_w , la muestra con miel fue la de mayor humedad, mientras que la muestra con azúcar resultó la de menor contenido de agua.

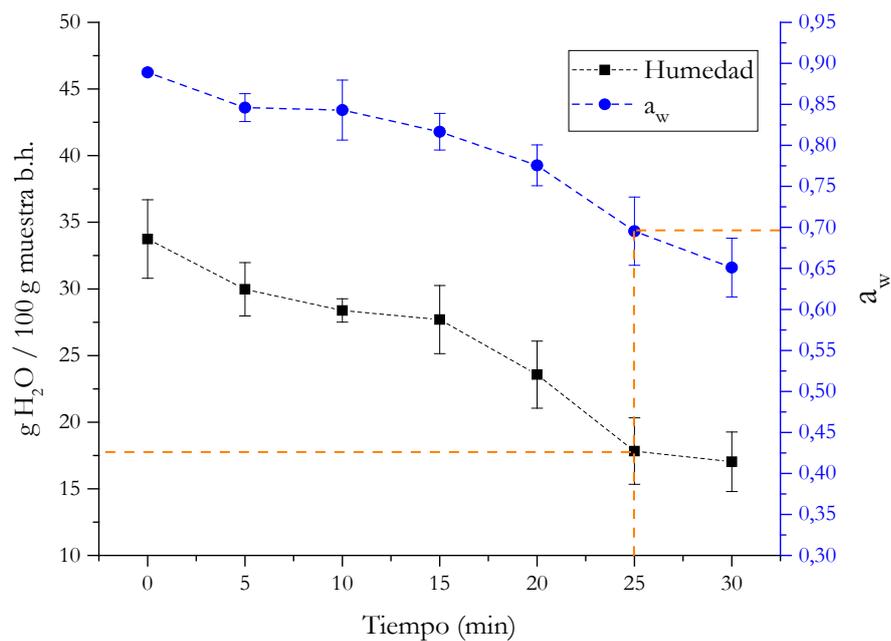


Figura 2.50. Determinación del tiempo de cocción para la formulación A.

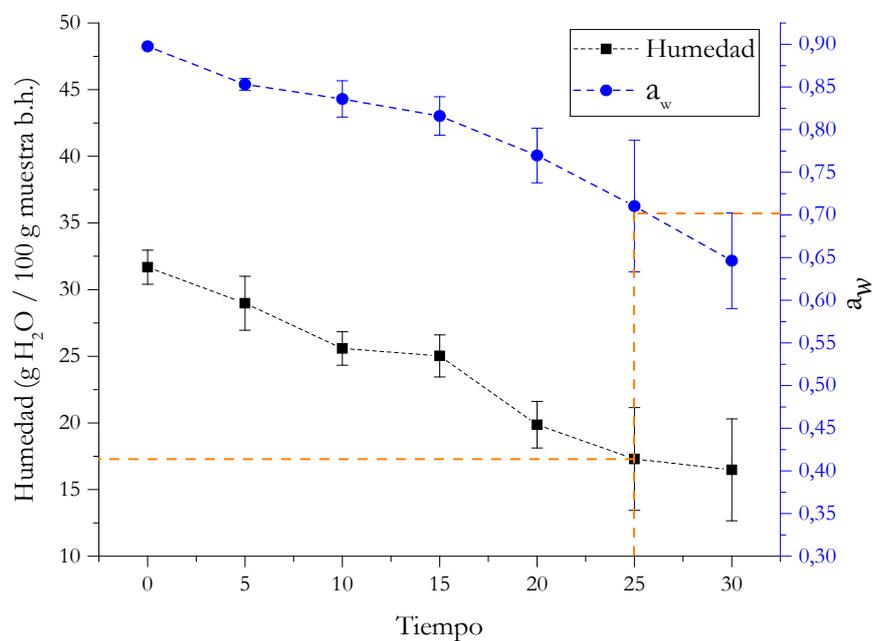


Figura 2.51. Determinación del tiempo de cocción para la formulación B.

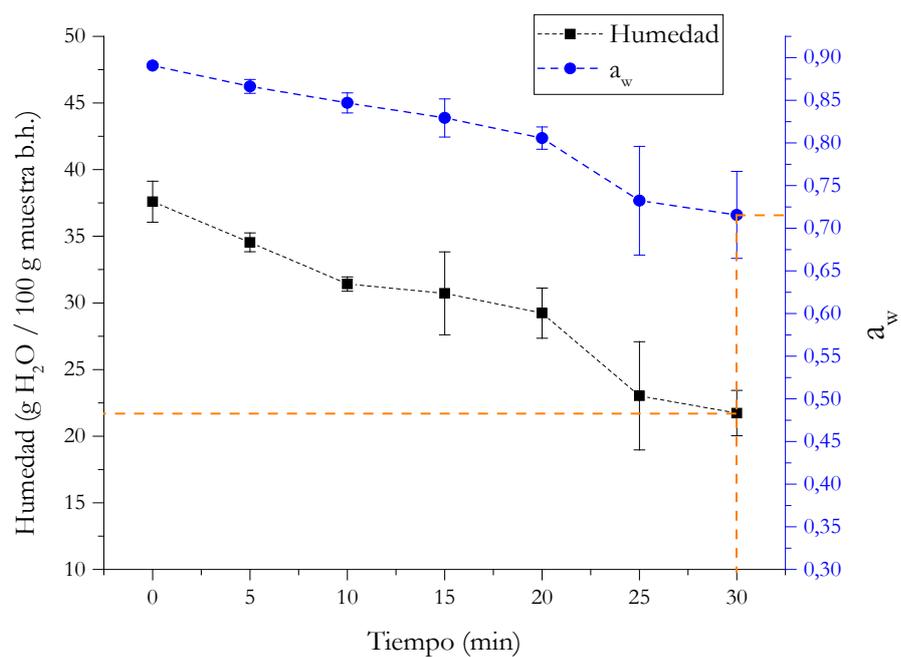


Figura 2.52. Determinación del tiempo de cocción para la formulación C.

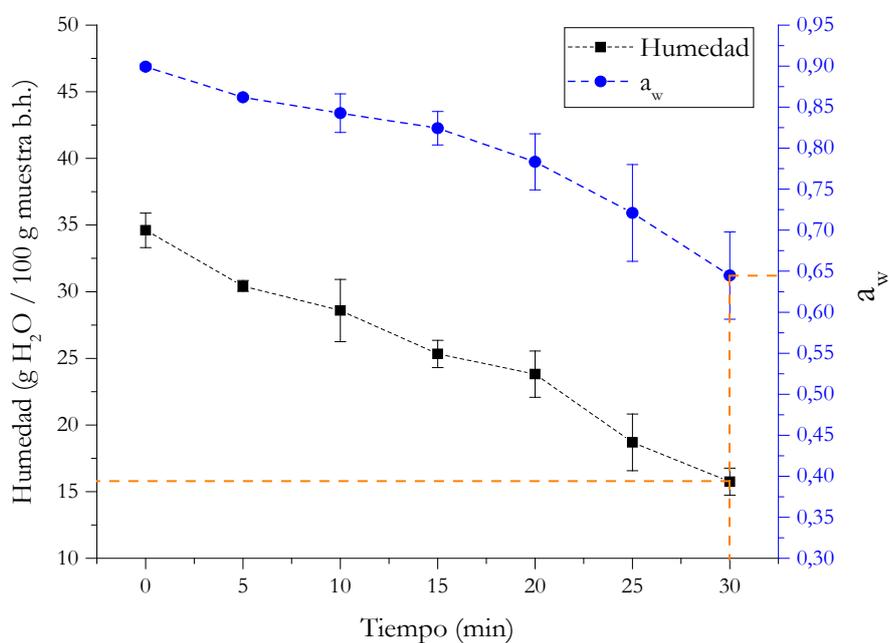


Figura 2.53. Determinación tiempo de cocción para la formulación D.

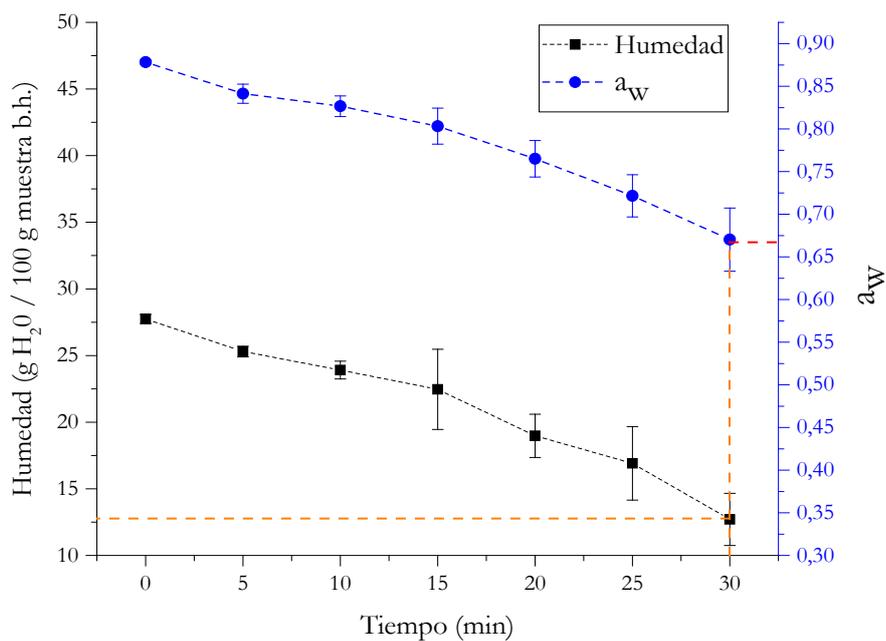


Figura 2.54 Determinación del tiempo de cocción para la formulación E.

Tabla 2.18. Tiempos de cocción y valores de humedad y a_w para cada formulación.

Formulación	Tiempo (min)	Humedad Final	a _w Final
A	25	17,83±2,50 ^{AB}	0,695±0,042 ^A
B	25	17,30±3,86 ^B	0,710±0,077 ^A
C	30	21,73±1,70 ^A	0,716±0,051 ^A
D	30	15,75±1,01 ^{BC}	0,645±0,053 ^A
E	30	12,70±1,96 ^C	0,670±0,037 ^A

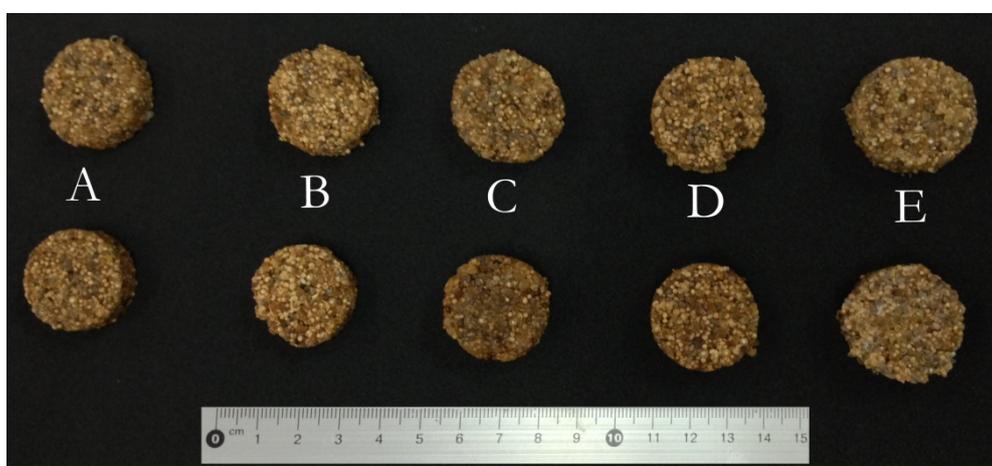


Figura 2.55. Diferentes formulaciones de bocaditos. Parte superior: antes de hornear, parte inferior: después del horneado.

4.3 Color de los bocaditos

Una característica importante para los consumidores de barras de cereal es el color superficial de las mismas, el que indica la magnitud de la energía calórica aplicada durante el proceso de horneado; una exposición prolongada a altas temperaturas puede tener una seria influencia en el color de los productos horneados. La comparación entre el tiempo cero de horneado con los puntos posteriores se relaciona con las interacciones entre los diferentes componentes de la formulación, las que influyen no solo en las características físicas sino también en las sensoriales. El ΔE es una medida de la variación del color global de la formulación durante el proceso de horneado. En este trabajo se estableció un ΔE de 3,7 (Sun-Waterhouse y col., 2010) para afirmar que se puede ver diferencia de color entre el t_0 y el tiempo correspondiente al final del horneado.

La Figura 2.56 muestra los valores de ΔE de las muestras en función del tiempo. El ΔE varió con el tiempo de horneado, observándose para todas las formulaciones excepto para la A un ΔE mayor a 3,7 lo que demostraría que a simple vista se pueden encontrar diferencias de color entre el tiempo cero y el tiempo final de horneado dependiendo de la formulación.

El cambio de color en los bocaditos fue un proceso dinámico en los que ciertas transiciones de color ocurrieron durante el proceso de horneado, los diferentes ΔE sugieren que las diferencias en el color están determinadas por las diferentes formulaciones. De hecho, analizando el ΔE final, para el mismo contenido de miel (0,33%), el bocadito con algarroba (D) presentó un valor de ΔE mucho más alto que el que contenía partes iguales de algarroba y azúcar (A), sugiriendo que el azúcar para la reacción de Maillard no está igualmente disponible, y es dependiente de si está libre o interaccionando con otras moléculas como es en el caso de la harina de algarrobo.

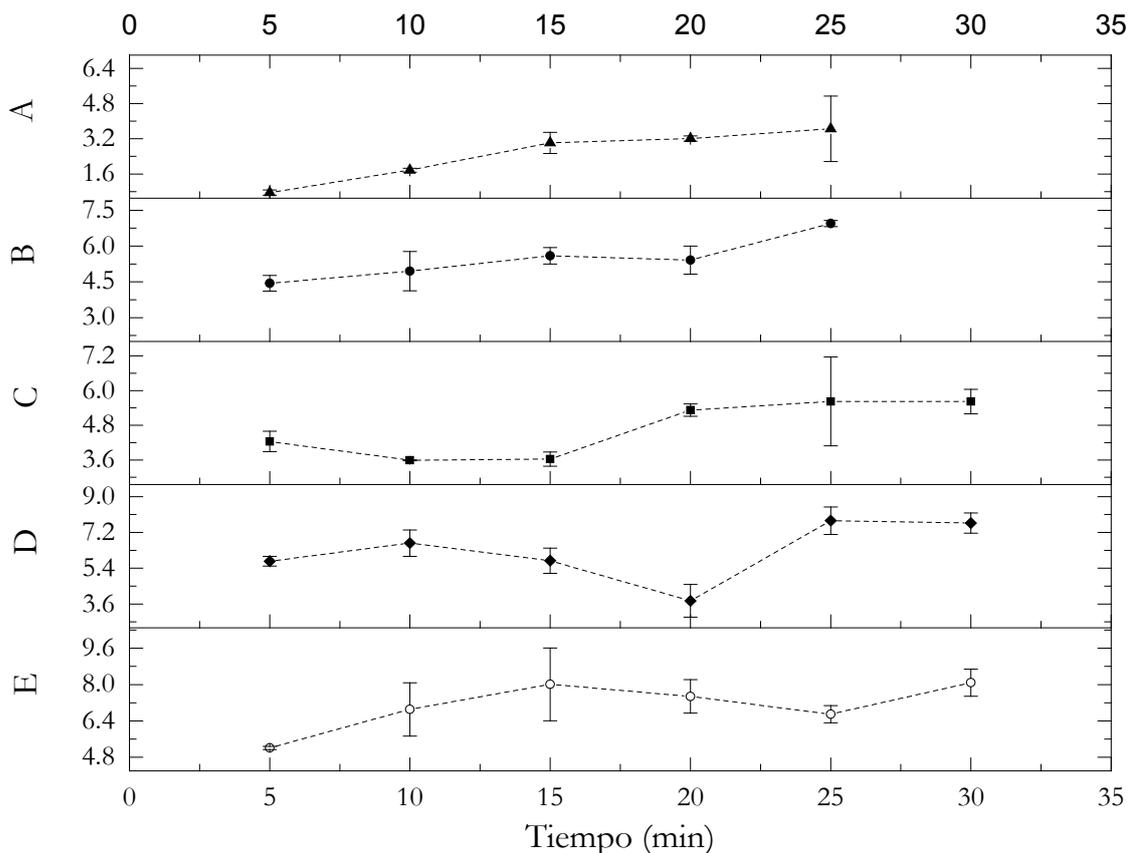


Figura 2.56. Valores de ΔE para cada formulación horneadas a diferentes tiempos.

4.4 Determinación de la textura del bocadito

4.4.1 Textura de los bocaditos horneados

En la Tabla 2.19 se muestran los valores de textura determinados para los bocaditos después de hornear. Las formulaciones de mayor dureza, consistencia y masticabilidad resultaron ser las de mayor contenido de harina de algarrobo (B y D), mientras que la más blanda fue la que contiene solamente miel (C) la que no presentó diferencias significativas con la que solo tuvo azúcar como aglutinante (E). Los bocaditos con mayor nivel de harina de algarrobo presentaron mayor cohesividad, resiliencia y elasticidad.

Todos los parámetros de textura a excepción de la dureza ajustaron con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$) a modelos lineales con r^2 mayores a 0,9. En la Tabla 2.20 se pueden ver los parámetros de ajuste y los modelos matemáticos para cada parámetro.

La Figura 2.57 muestra la superficie de contorno para la consistencia, en la que se observa un aumento de dicho parámetro a medida que aumenta el contenido de harina de algarroba (desplazamiento hacia el rojo).

En la Figura 2.58 se muestra la superficie de contorno para la cohesividad, la que indica que el azúcar conjuntamente con la harina de algarrobo (formulación B) genera un producto más cohesivo y aunque si bien no tiene diferencia significativa con la formulación D, se puede ver una tendencia hacia una mayor cohesividad para los bocaditos que se formularon con harina de algarrobo y azúcar. Este comportamiento podría deberse a que la fibra que aportó la harina de algarrobo, un 7,47% para las formulaciones B y D, absorbería agua y de esa forma los bocaditos quedarían con una estructura más compacta, más armados, por lo que se necesita más fuerza para desintegrarlos. El caso contrario fueron las formulaciones C y E que presentaron diferencias significativas siendo la menos cohesiva la formulación C, comportamiento que podría deberse a que los componentes mayoritarios de la miel, fructosa y glucosa, no cristalizan; mientras que la sacarosa de la formulación E cristaliza impidiendo la desintegración del bocadito.

La Figura 2.59 muestra la resiliencia de los bocaditos, la misma es la capacidad que tiene el bocadito de volver a su forma original luego de la primera compresión. Se puede observar que los valores de resiliencia resultaron muy bajos para todos los puntos, aunque aquellos con una mayor cantidad de harina de algarroba mostraron tener una mayor resiliencia que el resto.

La Figura 2.60 muestra que tan elásticos son los bocaditos, la elasticidad está definida como la altura que recupera el bocadito entre el segundo ciclo de compresión y el primero; la harina de algarrobo les aporta mayor elasticidad a las formulaciones.

Por último la Figura 2.61 muestra el diagrama de contorno para la masticabilidad. Este parámetro está directamente ligado a la dureza, a la cohesividad y a la elasticidad, todos estos parámetros aumentan de manera lineal con el agregado de harina de algarrobo a la formulación por lo que la masticabilidad sigue la misma tendencia, encontrando un producto que ofrece mayor resistencia a la masticación cuanto mayor es la cantidad de harina de algarrobo en la formulación.

Estos resultados demuestran que la harina de algarrobo, probablemente por su composición rica en fibra y azúcares, puede mejorar las propiedades texturales de un producto tipo “barra de cereal” logrando así una mejor calidad organoléptica.

Tabla 2.19. Parámetros de textura de los bocaditos.

For	Dureza	Consistencia	Cohesividad	Resiliencia	Elasticidad	Masticabilidad
A	38,4±5,7 ^B	144,7±25,4 ^C	0,382±0,019 ^C	0,190±0,011 ^B	0,531±0,035 ^D	2,79±0,49 ^B
B	70,4±21,4 ^A	237,4±95,9 ^B	0,433±0,033 ^A	0,243±0,016 ^A	0,639±0,090 ^B	7,27±1,89 ^A
C	6,6±1,3 ^C	27,0±5,2 ^D	0,334±0,014 ^D	0,121±0,004 ^D	0,457±0,039 ^E	0,27±0,06 ^C
D	67,3±5,5 ^A	283,4±23,2 ^A	0,419±0,012 ^{AB}	0,244±0,008 ^A	0,698±0,033 ^A	6,90±0,72 ^A
E	12,2±1,6 ^C	47,3±5,0 ^D	0,385±0,010 ^C	0,144±0,006 ^C	0,439±0,017 ^E	0,68±0,13 ^C
PC	38,4±6,8 ^B	148,7±29,6 ^C	0,402±0,016 ^B	0,182±0,005 ^B	0,582±0,018 ^C	2,81±0,44 ^B

For: Formulación. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

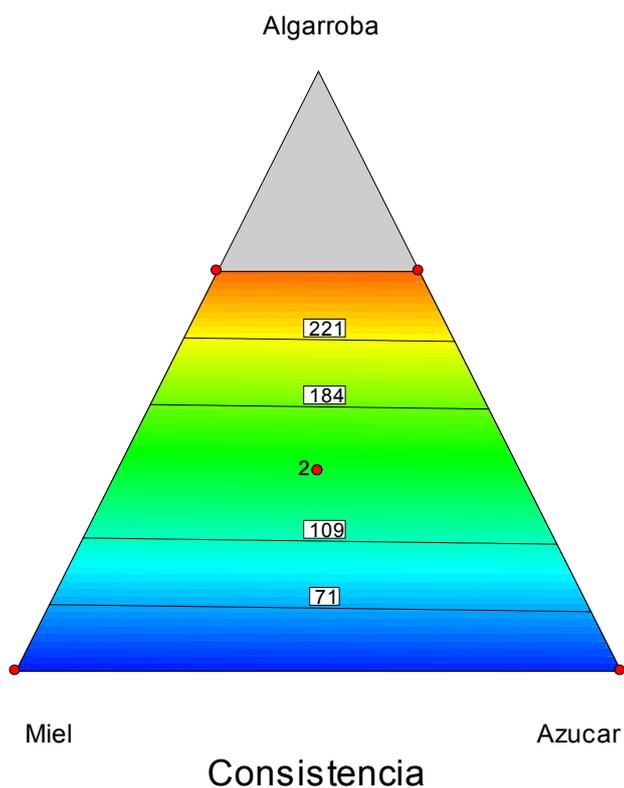


Figura 2.57. Superficie de contorno de la Consistencia de los bocaditos.

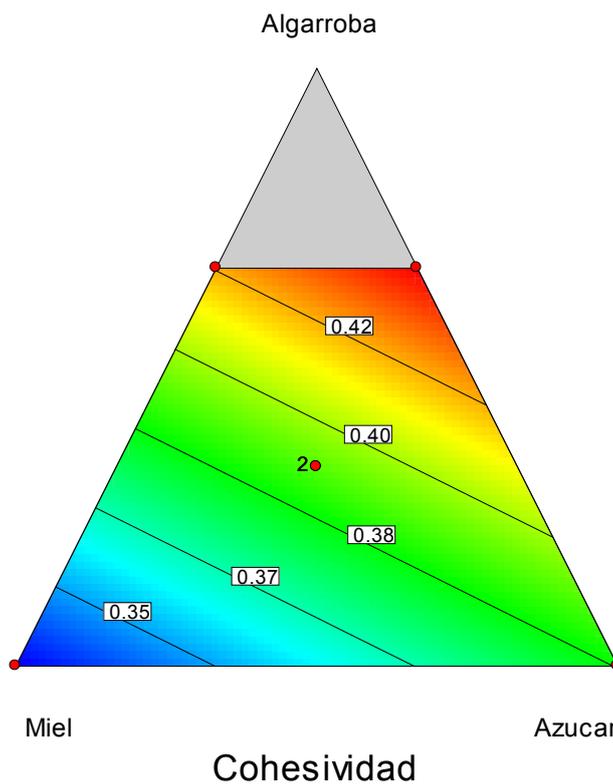


Figura 2.58. Superficie de contorno de la Cohesividad de los bocaditos.

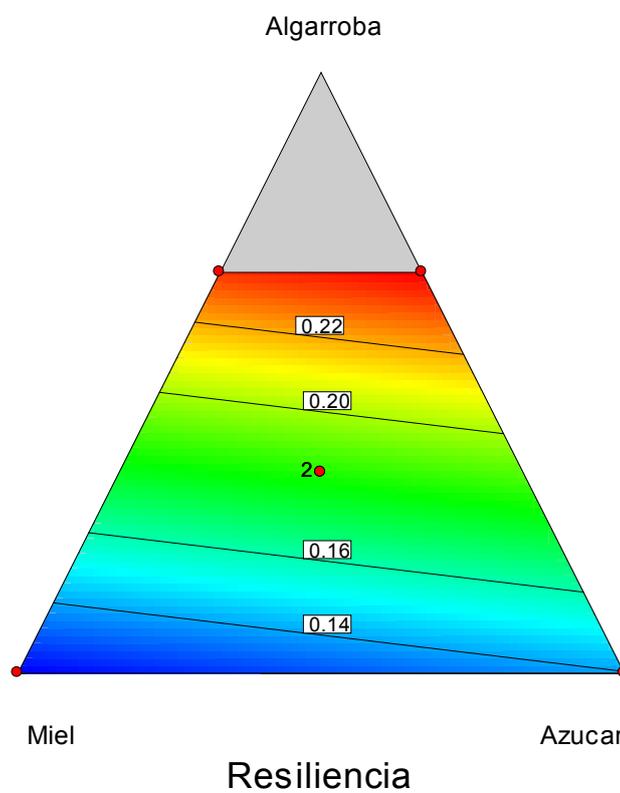


Figura 2.59. Superficie de contorno de la Resiliencia de los bocaditos.

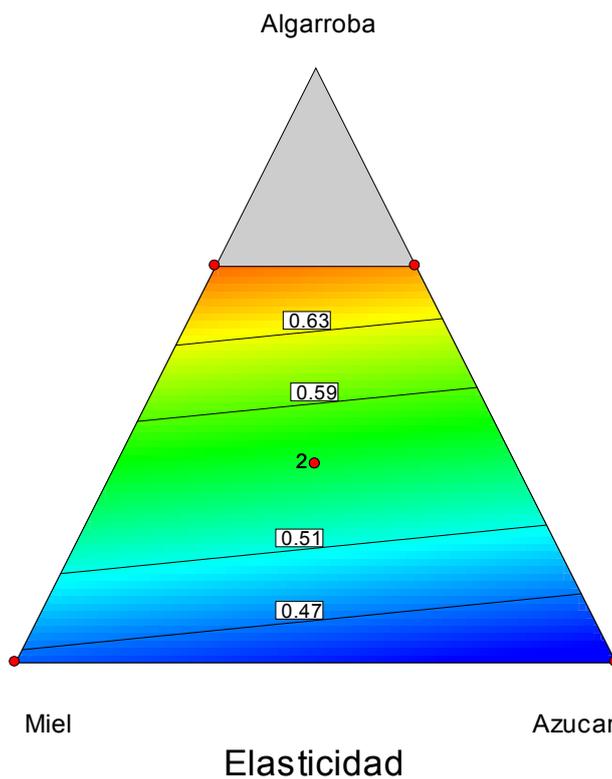


Figura 2.60 Superficie de contorno de la Elasticidad de los bocaditos.

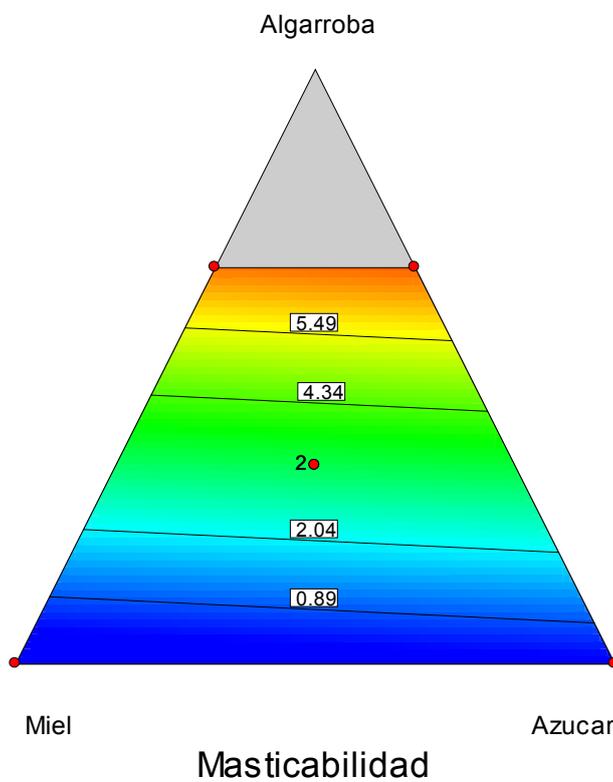


Figura 2.61. Superficie de contorno de la Masticabilidad de los bocaditos.

Tabla 2.20. Valores de ajuste de los parámetros de textura.

Dureza	No presentó ajuste
Consistencia	Modelo de ajuste: Lineal
	Consistencia = +33,91 * Miel + 38,33 * Azúcar + 371,09 * Algarroba
	$r^2 = 0,97$
	p modelo = 0,024
	p falta de ajuste = 0,051
Cohesividad	Modelo de ajuste: Lineal
	Cohesividad = +0,33 * Miel + 0,38 * Azúcar + 0,46 * Algarroba
	$r^2 = 0,96$
	p modelo = 0,034
	p falta de ajuste = 0,90
Resiliencia	Modelo de ajuste: Lineal
	Resiliencia = +0,12 * Miel + 0,14 * Azúcar + 0,30 * Algarrobo
	$r^2 = 0,99$
	p modelo = 0,0051
	p falta de ajuste = 0,4684
Elasticidad	Modelo de ajuste: Lineal
	Elasticidad = +0,46 * Miel + 0,43 * Azúcar + 0,78 * Algarrobo
	$r^2 = 0,950$
	p modelo = 0,0495
	p falta de ajuste = 0,508
Masticabilidad	Modelo de ajuste: Lineal
	Masticabilidad = -0,25 * Miel + 0,23 * Azúcar + 9,91 * Algarrobo
	$r^2 = 0,99$
	p modelo = 0,0005
	p falta de ajuste = 0,0508

4.5 Análisis sensorial

4.5.1 Ordenamiento de preferencia

Como se explicó anteriormente se repartieron las cinco formulaciones y los panelistas ordenaron las muestras desde la que gustó más hasta la que menos gustó. Con los resultados obtenidos se calcularon las sumas para los ordenamientos y se evaluaron con el test de Friedman. Las sumatorias de puntajes obtenidos para cada formulación se

muestran en la Tabla 2.21. Las formulaciones con más aceptabilidad tuvieron puntajes más bajos y las de menos aceptabilidad los puntajes más elevados, es decir las muestras mejormente aceptadas fueron la E en primer lugar y luego la A.

Tabla 2.21. Sumatorias de los puntajes otorgados para cada formulación, teniendo un puntaje menor la que más gustó y un puntaje mayor la que menos gustó.

	A	B	C	D	E
Puntaje	143	198	159	226	98

Aplicando la fórmula de Friedman para un $N = 55$ y un $k = 5$ se obtuvo un valor de $F_{69,01}$ que es superior al valor F tabulado que es de $9,49$, por la tanto se pudo afirmar que hay diferencia significativa entre muestras. Como se encontraron diferencias significativas, se realizó un ensayo de múltiple comparación con lo que se calcularon las diferencias de las sumatorias entre los pares de muestras utilizando la Ecuación 2.44. Aplicada la ecuación y para un nivel de significancia de $0,05$ la diferencia mínima para que exista diferencias significativas entre muestras es de $32,5$, lo que dejó a las muestras en el orden mostrado en la Tabla 2.22.

Tabla 2.22. Ordenes de las muestras de acuerdo a la aceptabilidad.

Muestra	Sumatoria	Diferencia	Nivel de significancia
E	98	A-E = 45	A
A	143	C-A = 16	B
C	159	B-C = 39	B
B	198	D-B = 28	C
D	226		C

De los resultados de la Tabla 2.22 se deduce que la formulación E que no contiene harina de algarrobo, difiere significativamente del resto de las formulaciones; en segundo lugar tenemos la muestra A siendo esta una muestra equilibrada en sus componentes edulcorantes pero sin diferencias significativas con la muestra C que solo contiene miel, dejando para el último lugar y sin diferencias significativas entre ellas a las formulaciones con mayor cantidad de algarrobo. De este primer panel se tomaron las dos mejores muestras, en este caso la muestra E con sólo azúcar y la muestra A equilibrada, para realizar un segundo panel sensorial para evaluar las muestras por atributos.

4.5.2 Panel de aceptabilidad por atributos

Como se describió anteriormente el objetivo del segundo panel fue el de caracterizar las dos muestras de mejor preferencia de acuerdo a cinco atributos. En la Tabla 2.23 se muestran los valores medios con sus desvíos para cada atributo y en la Figura 2.62 se muestra un gráfico de tela araña con los diferentes atributos. En este gráfico se puede ver que si bien solamente en el parámetro “apariencia” hubo diferencia significativa a favor de la muestra A (rechazo de la hipótesis nula), para el resto de los atributos no se encontraron diferencias significativas. Si bien la muestra E tiene una tendencia favorable con el resto de atributos, las muestras entre ellas no presentaron diferencias significativas, por lo tanto se puede apreciar que los bocaditos con azúcar no son estadísticamente superiores a los bocaditos que en su composición tienen harina de algarrobo, sugiriendo se puede reemplazar parcialmente el azúcar por harina de algarrobo y los bocaditos seguirán siendo aceptables.

Tabla 2.23. Puntajes de diferentes atributos sensoriales de los bocaditos.

Muestra	Aceptabilidad global	Apariencia	Cohesividad	Aroma	Dulzor	Astringencia
A	6,20±1,82 ^A	7,00±1,48 ^A	5,45±2,17 ^A	5,75±1,94 ^A	6,07±2,12 ^A	6,18±1,98 ^A
E	6,68±1,57 ^A	5,75±1,90 ^B	5,55±1,97 ^A	6,23±1,53 ^A	6,70±1,89 ^A	6,57±1,93 ^A

Letras diferentes en la misma columna sugieren diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los valores de aceptabilidad y de atributos organolépticos hallados para el bocadito a base de harina de algarrobo son similares a los hallados por otros autores para “snacks” o colaciones de tipo saludable. Estévez y col. (1995) para sus “snacks” compuestos por avena, germen de trigo, nueces y extrudado de trigo y amaranto utilizó como aglutinantes, miel, jarabe de azúcar negra, jarabe de palma y compuestos grasos como aceite de girasol, lecitina y glicerol en proporciones variables; encontrando puntajes en rangos de 5,33-6,50 en apariencia, 4,92-6,30 en aroma, 2,58-3 en astringencia. Estos rangos fueron similares a los obtenidos en este trabajo a excepción de la astringencia en donde nuestro producto mostró mayores valores de este parámetro debido quizá a que la percepción de los polifenoles presentes en la harina de algarrobo (responsables de la astringencia) estuvieron enmascarados por la presencia de otros componentes como los azúcares. En tanto que Azlyn y col. (1989) para sus barras de cereal ricas en fibra

compuestas por fructosa, aceite de maíz, agua, lecitina, leche descremada, sal, goma, salvado de trigo y salvado de maíz tuvieron para su mejor formulación 6 puntos en sabor, 6,74 en apariencia y 6,24 en aceptabilidad general; también estos valores resultaron comparables con los obtenidos en este trabajo. Escobar y col. (2000) en sus barras de cereal elaboradas con cotiledones de algarrobo también obtuvieron valores similares de aceptabilidad de entre 6,22-6,65, aunque un poco más bajos a los presentados en este trabajo para aroma (5,07-5,0), sabor (5,2-5,3) y dulzor (5,25 y 4,85).

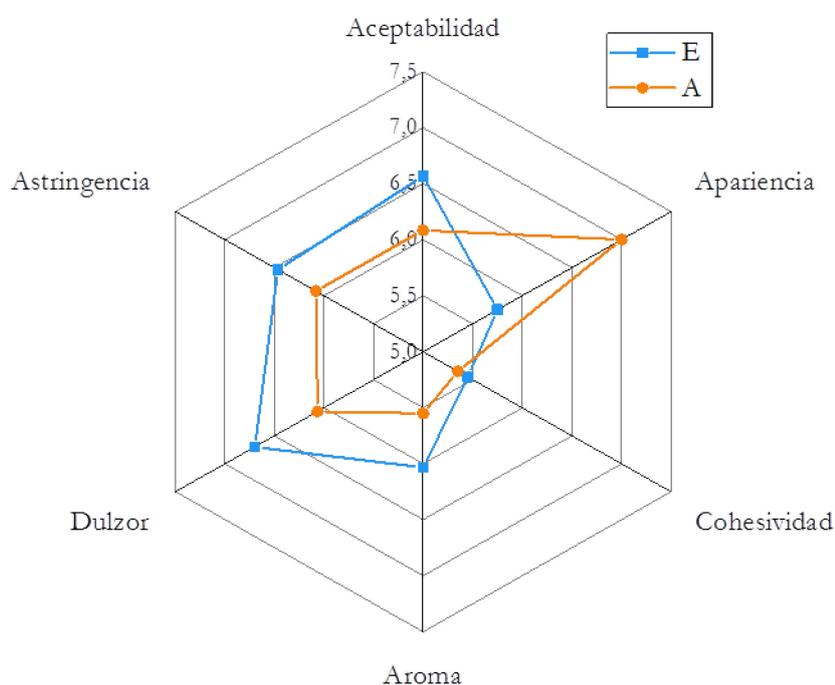


Figura 2.62. Gráfico de tela araña con los puntajes para los diferentes atributos y las dos formulaciones.

De la Figura 2.63 a la Figura 2.68 se muestran los histogramas de frecuencia de elección para cada atributo. Azlyn y col. (1989) tomaron como parámetro de aceptabilidad un puntaje mayor o igual que 5. Todos los atributos tuvieron este puntaje por lo que se puede suponer que los bocaditos fueron aceptables para cada uno de los atributos, sin embargo los histogramas muestran las frecuencias para la elección de cada atributo, para el caso de Figura 2.63 que muestra la aceptabilidad global, un 11,66% de los panelistas rechazaron el producto que contiene solamente azúcar como edulcorante, en tanto que un 21,66% rechazaron el producto que tiene algarroba; tendencias similares se

pueden observar también para el aroma (Figura 2.66) con un 13,33% de los panelistas que rechazan al producto que tiene azúcar y un 26,66% que rechazan al producto que tiene harina de algarrobo. Para el dulzor (Figura 2.67) los consumidores rechazaron en un 15% el producto con azúcar y en un 25% el producto que contiene harina de algarrobo, estos porcentajes denotan que si bien los puntajes son parejos para los atributos, un mayor porcentaje de la gente rechaza la harina de algarrobo. Este hecho puede ser explicado en base a que la harina es un producto novedoso y el sabor es característico, no estando los panelistas habituados al mismo. Resultados similares fueron obtenidos por Hall y col. (2003) que prepararon un *snack* agregando harina de algarrobo a un producto llamado Chex® el que se consume en Estados Unidos; este producto se cubrió con una mezcla de H₂O, almidón de maíz y harina de algarrobo, luego realizaron un panel sensorial de este *snack* y encontraron una tendencia en la cual el producto presentaba mayor rechazo por parte de los panelistas. La explicación dada por el autor fue que al ser un producto novedoso jamás probado antes por la mayoría de los participantes existe un cierto riesgo potencial de rechazo por aversión al sabor de un producto desconocido (harina de algarrobo), aunque la mayoría de los participantes no percibieran el sabor como algo negativo.

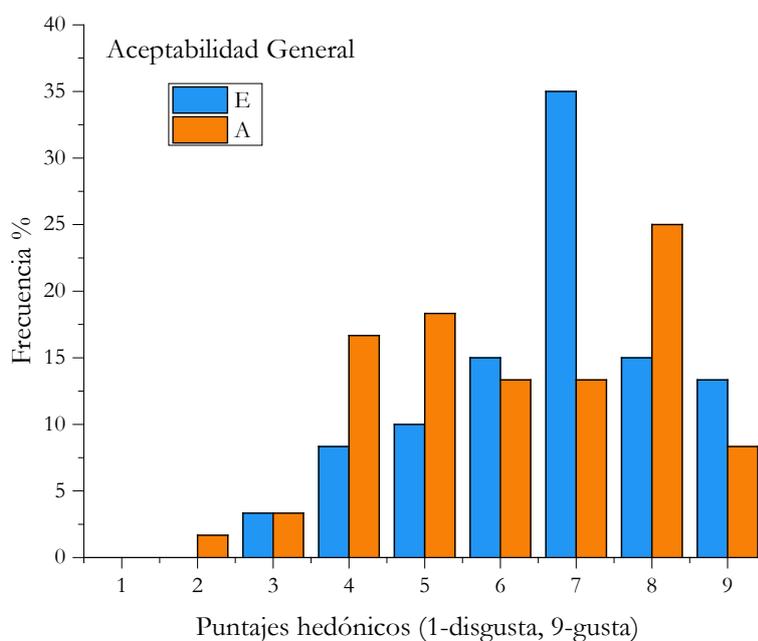


Figura 2.63. Distribución de frecuencia del atributo Aceptabilidad General.

Para parámetros como la cohesividad (Figura 2.65) y la astringencia (Figura 2.68) el rechazo fue de alrededor del 35% para ambas formulaciones en el primer caso y del 17% para ambas formulaciones en el segundo caso, lo que indica para estos parámetros que el rechazo es por un problema de la formulación y no un problema de la harina o el azúcar que se utilizó como aglutinante. Por último la apariencia de los bocaditos que tuvieron como aglutinante azúcar fue rechazada por el 25% de los panelistas, el caso contrario ocurrió para la harina de algarrobo ya que el 95% de los panelistas aceptaron la apariencia de los bocaditos formulados con esta harina, hecho que puede deberse a que luego del desmoldado los bocaditos conservan mejor su forma cilíndrica.

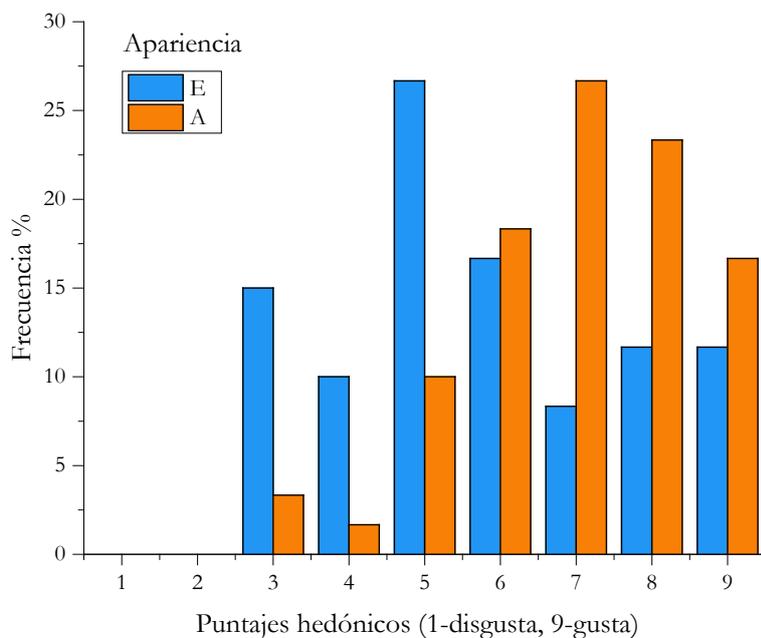


Figura 2.64. Distribución de frecuencia del atributo Apariencia.

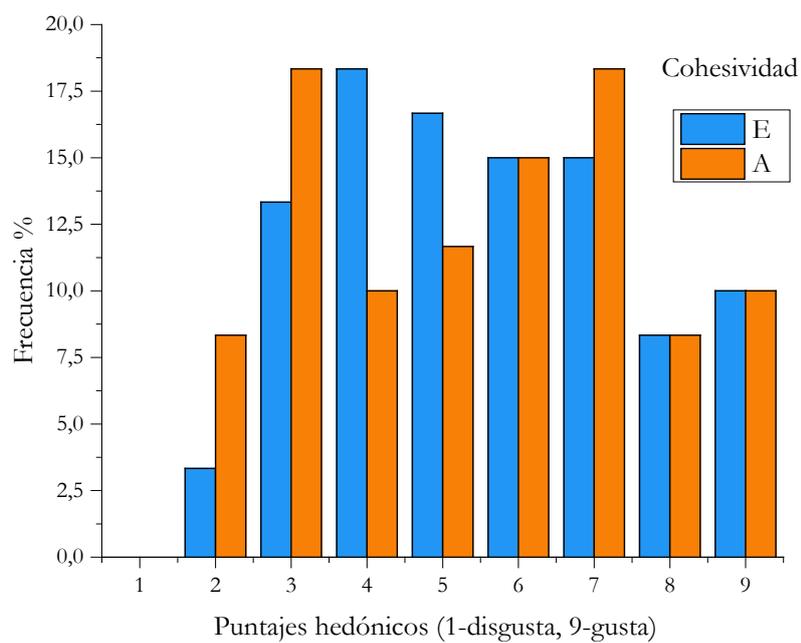


Figura 2.65 Distribución de frecuencia del atributo Cohesividad.

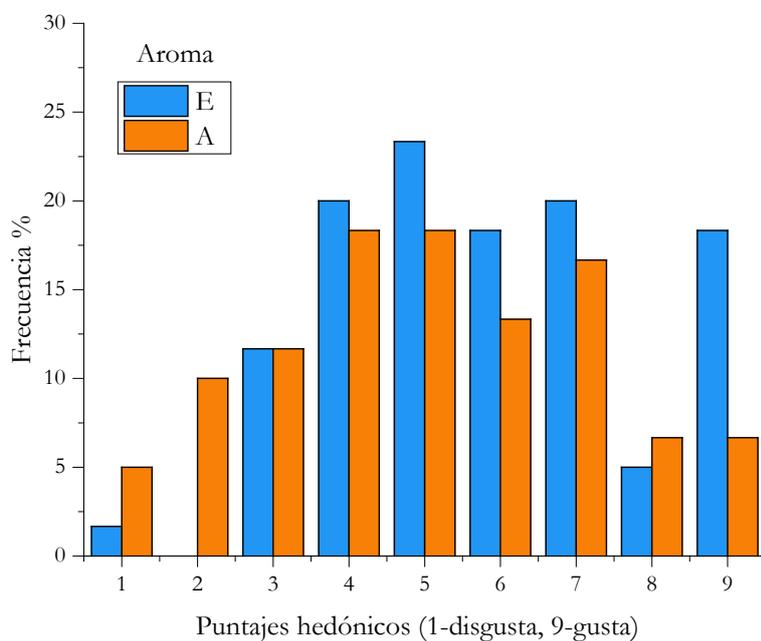


Figura 2.66 Distribución de frecuencia del atributo Aroma.

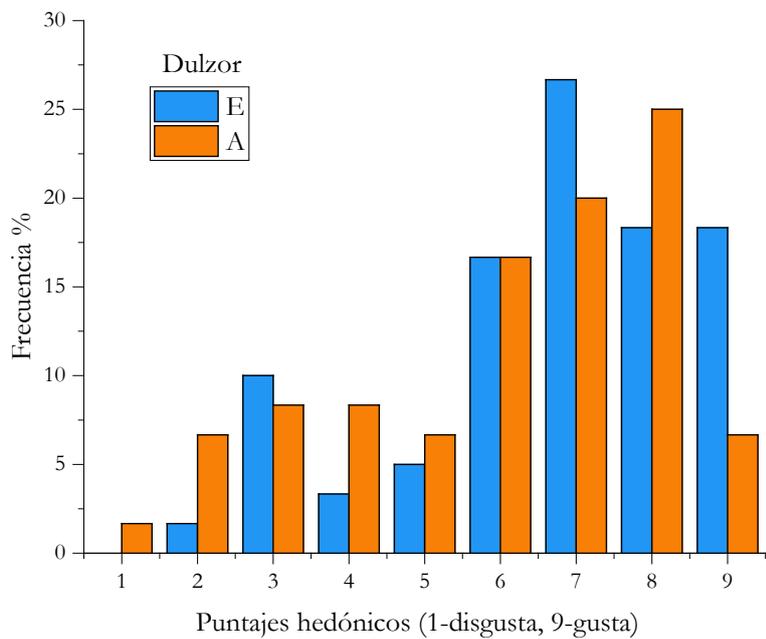


Figura 2.67 Distribución de frecuencia del atributo Dulzor.

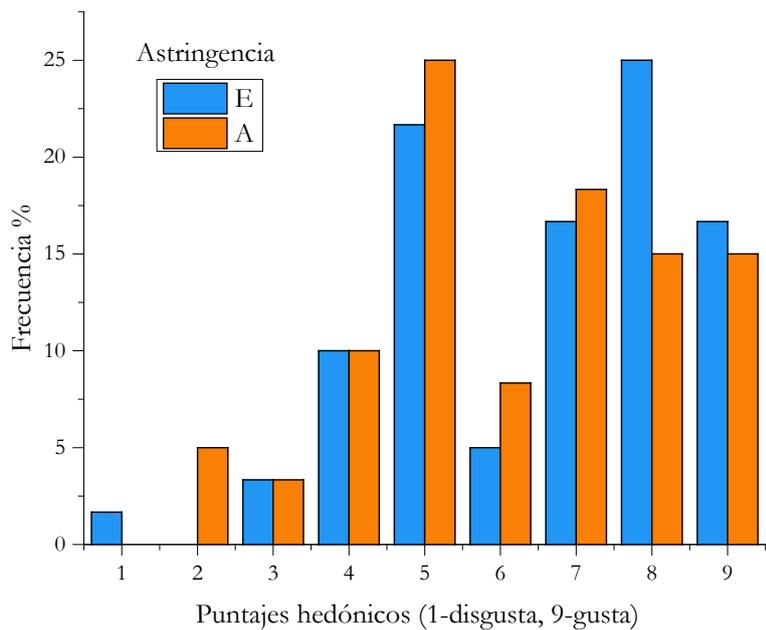


Figura 2.68 Distribución de frecuencia del atributo Astringencia.

4.6 Composición

En la Tabla 2.24 se muestran los resultados obtenidos para la composición de la formulación A, que es la que contiene harina de algarrobo entre las 2 formulaciones más aceptadas (A y E) en los paneles sensoriales.

Tabla 2.24 Composición de la formulación A.

Componente	Porcentaje
Humedad (%)	17,83±2,49
Proteína (% b.s.)	10,78±0,059
Lípidos (% b.s.)	5,24±0,01
Ceniza (% b.s.)	2,28±0,076
Hidratos de carbono*	63,87
a_w	0,651±0,036

***Los hidratos de carbono se calcularon por diferencia.**

Escobar y col. (2000) prepararon barras de cereal con cotiledón de *P. chilensis* tostado, y con distintos agregados de nuez y maní, obteniendo menores valores de humedad en rangos de 7,2 a 11,2 y a_w 0,59-0,65. Sun-Waterhouse y col. (2010) por su parte realizaron barras rellenas para las que utilizaron arroz inflado, jarabe de glucosa, miel, aceite vegetal avena arrollada, glicerol, suero de leche, maltodextrina y pectina para la cubierta y para el relleno utilizaron pectina, azúcar, ácido cítrico, jarabe de glucosa, miel, margarina glicerol y puré de manzana. Estos autores utilizaron gran cantidad de ingredientes para formular sus barras obteniendo porcentajes de proteínas de entre 1,07-3,66% inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo, una mayor concentración de materia grasa de entre 8,48 y 9,97% y una menor cantidad de minerales 0,77 a 1,33; presentando un menor contenido de humedad entre 5,6 y 10,7% y una actividad acuosa de 0,460-0,483. Estévez y col. (1995) en sus barras de cereal encontraron valores de 1,5 a 2,1% de ceniza, 29-30% de materia grasa, valor este último que supera 6 veces a la formulación obtenida en este trabajo, 10-15% de proteína y 49 a 57% de hidratos de carbono reportando valores de a_w de 0,6 a 0,75 similares a los obtenidos en este trabajo. El Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI, 2011) publicó un ensayo en el cual consta el análisis cualitativo a 10 marcas comerciales de barras de cereal y 28 presentaciones de estas marcas, dando como resultados entre un 4,4 a 9,4% de proteínas,

7,7 a 27% de grasas, y entre un 57 a 82% de hidratos de carbono, evidenciando un rango amplio de cada uno de los componentes según el tipo de producto. Un resultado para destacar es que entre todas las barras de fabricación nacional ninguna de ellas superó el porcentaje de proteínas presentado en nuestro trabajo, ni tampoco tuvieron una menor cantidad de lípidos. Si tenemos en cuenta la cantidad de fibra de la formulación A en función de la cantidad aportada por la harina de algarrobo, es un 3,74% mínimo, sin tener en cuenta la fibra aportada por las semillas; le siguen los bocaditos B y D con 7,47% (32,12% harina de algarrobo en la formulación). Este contenido de fibra resultó intermedio a los valores obtenidos por (Sun-Waterhouse y col., 2010) (2,5-5,3%) y el INTI (INTI, 2011) (0,3-7,5%).

4.7 Conclusiones parciales

Los resultados de este capítulo muestran la potencialidad de la harina de algarroba para la elaboración de bocaditos dulces saludables con atributos sensoriales característicos. Los bocaditos presentaron variación de color con el tiempo de cocción; los de mayor aumento fueron las formulaciones con azúcar, ya fuera sola en la formulación o aportada por la algarroba (D y E), mientras que la formulación de menor producción de color resultó la del punto central (A), con la menor proporción de azúcar y harina de algarrobo. La dureza, consistencia y masticabilidad resultaron mayores en las formulaciones con mayor contenido de algarroba (B y D), mientras que los menores valores se observaron para las muestras sin esta harina (C y E). En el ensayo sensorial de preferencia, las muestras más preferidas fueron por igual la que contiene solamente azúcar (E) y la del punto central (A). En el análisis por atributos de estas dos muestras, las mismas presentaron igual aceptabilidad global, habiéndose elegido la A como la muestra de mejor apariencia. Se puede concluir que la harina de algarroba resulta adecuada para el desarrollo de color, pero en niveles superiores al 50% en la mezcla de aglutinantes endurece los bocaditos y este hecho no baja la aceptabilidad por los consumidores. Sin embargo, en una proporción equivalente con miel y azúcar, esta formulación fue elegida por su mejor apariencia, con igual percepción de aroma y dulzor que el bocadito formulado con azúcar. Cabe destacar que estos bocaditos no llevan sodio agregado, la formulación es relativamente sencilla comparada con las de los otros trabajos ya que solo lleva seis ingredientes que se consiguen en cualquier dietética. El contenido de proteína

de este bocadito se encuentra por encima del valor documentado para la mayoría de las barras de cereal, tanto las descritas por otros autores como las comerciales analizadas en el informe del INTI. A la inversa sucede para los lípidos; estos bocaditos son los que menos contenido de lípidos documentan de entre todos los trabajos. En tanto que sensorialmente para todos sus atributos superan los 5 puntos con un porcentaje de aceptación para todos los atributos mayor al 60% y para ciertos parámetros casi del 80% por lo que se puede concluir que se logró obtener un producto de fácil elaboración con satisfactorias características sensoriales y de muy fácil transferencia para el elaborador casero como también para el mediano productor de productos naturales.

Capítulo

III

Elaboración de un
panificado dulce apto
para celíacos con
harina de algarrobo

Perfume de carnaval

*Me voy solo con mi suerte
la llevaré en mi recuerdo,
bajo un añoso algarrobo
cortaba el aire un pañuelo,
bailando una vieja zamba
yo le entregaba mis sueños.*

*El sol quemaba en la tarde
siluetas que parecían,
fantasmas amarillentos
llenos de tierra y de vida,
y yo rendido a tus ojos
sintiendo que me querías.*

*Ay, perfume de carnaval
ya nunca me he de olvidar,
su piel llevaba el aroma
de flor y tierra mojada,
bellos recuerdos que siempre
los guardo dentro del alma.*

*Hay tiempos donde han quedado
donde he perdido mis sueños,
quién sabe si ella se acuerda
de un viejo mes de febrero,
y de aquel baile en el campo
y de mi amor verdadero.*

*No quise decirle nada
la amé en silencio esa tarde,
y sobre sus trenzas negras
dejé mi copla sentida,
me fui llevando sus ojos
un miércoles de cenizas.*

*Ay, perfume de carnaval
ya nunca me he de olvidar,
su piel llevaba el aroma
de flor y tierra mojada,
bellos recuerdos que siempre
los guardo dentro del alma.*

Letra y música: Peteco Carabajal

1 Introducción

Los productos derivados de los cereales, especialmente los panificados, son componentes básicos en la dieta de varios países debido a sus características sensoriales y su calidad nutricional. La manufactura de productos libres de gluten presenta problemas complejos a la hora de su industrialización. De hecho gran cantidad de productos libres de gluten que se ofrecen en el mercado actualmente presentan un desarrollo tecnológico deficiente, exhibiendo bajo volumen, color insuficiente, desgranamiento de la miga, entre otras características (Matos Segura y Rosell, 2011). Una gran variedad de panificados libres de gluten han sido diseñados para proveerle a los pacientes celíacos una alternativa. Gran cantidad de formulaciones de panificados libres de gluten contienen harina de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) combinadas con diferentes almidones (Matos Segura y Rosell, 2011). La harina de arroz es una de las harinas más convenientes para preparar productos libres de gluten debido a sus propiedades hipo-alérgicas, la falta de color y su ausencia de gusto. La baja cantidad de prolaminas en el arroz nos lleva a utilizar gomas, emulsificantes, enzimas o productos lácteos junto a la harina de arroz para obtener masas con propiedades viscoelásticas adecuadas (Demirkesen y col., 2010).

Los panificados denominados “muffins” son productos populares, se los consume a la hora del desayuno o la merienda. Se los venden en las panaderías siendo productos dulces, altamente calóricos y muy apreciados por los consumidores debido a su buen gusto y textura suave. La mezcla tradicional para preparar muffins se formula a partir de harina, huevo, azúcar y agua donde las proteínas, azúcares y minerales disueltos en agua forman una fase continua, los lípidos del huevo se encuentran emulsionados y los gránulos de almidón y proteínas insolubles están dispersos. Una vez que el producto es horneado, el calentamiento produce la gelatinización de almidón y la desnaturalización de las proteínas y la posterior gelificación de estos componentes conduciendo a la matriz del panificado en los que están insertas las burbujas de aire (fase discontinua).

Los muffins tienen una estructura porosa y un gran volumen lo que les confiere una textura esponjosa. Para obtener esta estructura final se debe obtener una mezcla estable con mucha cantidad de burbujas de dióxido de carbono que son retenidas en la fase continua, dándole volumen al panificado luego del horneado. Los muffins tradicionalmente están compuestos por harina de trigo, azúcar, aceite vegetal, huevo y

leche. Por esta razón, las personas que padecen de enfermedad celíaca no pueden consumir este tipo de producto de pastelería. Los productos libres de gluten están en principio desarrollados para aquellos que padecen la enfermedad celíaca, aunque hoy en día por cuestiones de salud y para disminuir el consumo de harina de trigo en la dieta mucha gente también se está volcando al consumo de productos libres de gluten (Matos y col., 2014).

La enfermedad celíaca es una de las enfermedades autoinmunes más comunes, su presencia ha sido documentada a lo largo del mundo entero (Fasano y Catassi, 2001). Estudios poblacionales han demostrado que la incidencia de la enfermedad celíaca se da en el 1% de la población mundial, y la misma se ha identificado en todos los continentes. La mayoría de los celíacos se encuentran actualmente no diagnosticados, aunque la tasa de diagnóstico de la enfermedad va en aumento. Es una enfermedad crónica que se encuentra sub-diagnosticada, a pesar de que los pacientes presentan sintomatología recurrente. Este desfase ha sido atribuido más a una demora de los médicos en llegar al diagnóstico que a una demora de los pacientes en buscar ayuda médica (Green y Jabri, 2006).

La enfermedad celíaca se desencadena por la ingestión de proteínas de trigo, avena, cebada y centeno; estas macromoléculas inducen a una respuesta inflamatoria del intestino delgado, resultando en la atrofia de las vellosidades intestinales, la hiperplasia de las criptas de Lieberkün y la infiltración de los linfocitos T (Green y Jabri, 2006). Eliminar el gluten y proteínas similares de las dietas lleva a una mejora clínica e histológica del paciente (Alaedini y Green, 2005). Los individuos con enfermedad celíaca consumen varios tipos de alimentos sin gluten. Existen alimentos libres de gluten naturales, como las frutas, vegetales, carnes no procesadas, pescado y aves; y otros alimentos procesados como pan, pastas, galletas, entre otros, en los que la harina de trigo es reemplazada por harinas libres de gluten (almidones y harinas de otras fuentes) que son adquiridas en tiendas especializadas (Lee y col., 2007). Los productos más difíciles de reemplazar para los pacientes celíacos son los panificados y la gran cantidad de productos de pastelería. Por lo que en este capítulo se tuvo como objetivo formular un panificado dulce aprovechando de esta forma la gran cantidad de azúcares que posee la harina de algarrobo blanco, mayor al 50%, junto con las cualidades que tienen la harina de arroz y la harina de maíz ambas muy empleadas en la obtención de panificados libres de gluten.

2 Objetivos

- Elaborar panificados libres de gluten con agregado de harina de algarrobo blanco obtenida en el laboratorio a partir de la molienda de las vainas de *Prosopis alba*.
- Determinar las características físicas de los panificados formulados mediante un diseño de mezcla de harinas: algarrobo, maíz y arroz.
- Evaluar mediante un panel no entrenado la calidad sensorial de panificados con diferentes niveles de harina de algarrobo.

3 Materiales y Métodos

3.1 Diseño experimental y obtención de las formulaciones

La formulación que se utilizó para la preparación de los panificados se muestra en la Tabla 3.25. Todos los ingredientes a excepción de las harinas se mantuvieron constantes. Las harinas utilizadas fueron: harina de arroz (Ganofi, Santa Fe, Argentina) (HA), harina de maíz a granel (HM) y harina de algarrobo blanco. La harina de algarrobo se obtuvo utilizando el protocolo descrito en el Capítulo I para HEF10 a partir de vainas de *Prosopis alba* de la temporada 2011 (HA11S), obteniéndose así una harina que pasa a través de un tamiz de 500 μm ; a la misma se la llamará a partir de ahora HPA.

Las harinas forman parte de un 25% de la formulación que se muestra en la Tabla 3.25. Se utilizó sacarosa (Ledesma, Bs.As.), polvo de hornear (Royal, Bs.As.), sal (Celusal, Bs.As.), hidroxipropil metil celulosa -HPMC (Dow, USA), estearoil lactilato de sodio-SSL (Danisco, Sao Paulo, Brasil), levadura en polvo (Levex, Bs.As.), leche descremada (La Serenísima, Bs.As.), margarina sin colesterol ni grasas trans (Dánica dorada, Avex S.A., Bs.As.).

Las combinaciones de las harinas (harina de maíz-HM, harina de arroz-HA, harina de algarrobo-HPA) se obtuvieron con el programa DesignExpert 7.0 (StatEase INC). A través del programa se obtuvo un diseño de mezclas simplex lattice de segundo grado, el que constó de 10 puntos experimentales y un replicado de punto central, que se describen en la Sección de Resultados y Discusión.

Tabla 3.25 Ingredientes utilizados en la preparación de los panificados cada 100 g de producto crudo.

Ingrediente	Masa (g)
Harina	25
Azúcar	6
Polvo de hornear	0,2
Sal	0,2
HPMC	0,4
SSL	0,2
Levadura	1
Leche	35
Huevos	26
Margarina	6

3.2 Preparación del panificado

El panificado se preparó pesando la margarina y el azúcar en un bol. Luego se prosiguió a pesar todos los ingredientes sólidos (harina/s, polvo de hornear, sal, HPMC y SSL) y una vez pesados se los pasó a través de un tamiz de 1000 μm para uniformar el tamaño de partícula. La leche se pesó y luego se le agregó la levadura con el fin de activarla. Los huevos primero se batieron manualmente en batidora Philips (Philips Cucina HR 1566) y luego se pesó la cantidad necesaria para cada formulación. Una vez que todos los ingredientes estuvieron correctamente pesados y preparados se prosiguió de la siguiente forma:

- 1- Se batió la margarina con el azúcar durante dos minutos a la mínima velocidad (711 rpm) para lograr un efecto denominado cremado.
- 2- Se agregó la leche y se batió un minuto a 711 rpm.
- 3- Se agregó el huevo batido y se batió un minuto a 711 rpm.
- 4- Se agregaron los sólidos tamizados y se batió durante dos minutos más a máxima velocidad (858 rpm).

Al finalizar se obtuvo una mezcla de consistencia semi-líquida, incorporándose 35 g de la misma a cada molde de silicona tipo pirotin. Los preparados se llevaron a fermentar a 30°C durante 40 minutos. Una vez terminada la fermentación se colocaron en horno durante 25 minutos a $180 \pm 10^\circ\text{C}$. Una vez transcurrido ese tiempo, se sacaron

del horno, se esperó hasta que se enfriaron y se los almacenó durante 24 horas en bolsas de nylon previo a su utilización en los diferentes ensayos.

3.3 Determinación del tiempo de fermentación

Para determinar el tiempo óptimo de fermentación se realizó una puesta a punto de la formulación de punto central del diseño de mezcla que consistió en dejar fermentar la formulación durante diferentes períodos: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, y luego hornear los batidos fermentados a dichos tiempos durante 25 minutos a $180^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$. El tiempo de fermentación se determinó visualmente en base al mejor resultado obtenido.

3.4 Evaluación fisicoquímica de los panificados

3.4.1 Determinación de volumen, altura y peso

Para determinar volumen de las piezas se utilizó el método de desplazamiento de semillas, utilizándose una probeta graduada a la cual se le agregaron semillas de nabo (*Brassica napus*). Para los cálculos se siguió la siguiente ecuación:

$$V_p = V_{pp} - V_{pv} \quad \text{Ecuación 3.45}$$

Siendo V_p , el volumen del panificado, V_{pp} el volumen ocupado por las semillas y el panificado y V_{pv} el volumen ocupado sólo por las semillas de nabo. Se determinó el volumen por triplicado a 5 panes de cada una de las formulaciones del diseño.

En cuanto a la altura, se le determinó con calibre a 10 piezas de todas las formulaciones del diseño, teniendo en cuenta la expresión con dos cifras significativas.

Todas las muestras (10 piezas/muestra) se pesaron en balanza analítica expresando los resultados con una significancia de cuatro dígitos.

3.4.2 Preparación de las muestras de miga

Los panificados se cortaron transversalmente a media altura, utilizándose la porción inferior. Se tomaron muestras de miga de la parte central con un sacabocado de 3,08 cm de diámetro y 1,4 cm de altura. Estas muestras se utilizaron para las medidas de humedad, color y textura.

3.4.3 Determinación de la humedad de miga

Las rodajas de migas se llevaron a estufa a 105°C hasta peso constante. Se determinó el peso constante cuando las migas alcanzaron una diferencia de masa entre pesadas menor al tres por ciento. La determinación se realizó por triplicado.

3.4.4 Color

Se midió el color de la corteza y de la miga a 10 muestras de cada formulación, de acuerdo con lo explicado en el Capítulo I.

3.4.5 Textura de la miga

La textura de la miga se realizó de igual forma que para el Capítulo II, fue evaluada en muestras cilíndricas de miga, utilizando un texturómetro (TA.XT2i Stable Micro Systems, UK). Las migas fueron sometidas a dos ciclos de compresión del 40% con una sonda cilíndrica de 7,5 cm de diámetro. Las curvas de fuerza fueron obtenidas a una velocidad de 0,5 mm/s. Se determinó la fuerza, resiliencia, adhesividad, consistencia, cohesividad, elasticidad y masticabilidad utilizando 10 repeticiones de cada muestra. Las ecuaciones para cada atributo textural ya fueron definidas en el Capítulo II, excepto la correspondiente a la adhesividad, que se muestra en la Ecuación 3.46, (Figura 2.46); parámetro que no fue descrito en el Capítulo II por no haberse encontrado la propiedad de adhesividad en los bocaditos.

$$Adhesividad = Area\ 3:4\ (N)$$

Ecuación 3.46

3.4.6 Alveolado de miga

Para determinar los parámetros que caracterizan al alveolado de las migas se utilizó el software Image J (V. 1,46r, National Institute of Health, USA). Como paso previo, se escanearon rodajas del panificado de aproximadamente 5 cm de diámetro. Una vez que las rodajas fueron escaneadas, se seleccionó el área a determinar el alveolado y se analizó con un complemento para Image J que determina alveolado de migas de panificados libres de gluten. El complemento lo que hizo fue convertir a la imagen a escala de grises en 8-bits. La segmentación de la imagen (conversión a imagen binaria) la realizó el programa por selección automática del valor del umbral. Este método de selección del valor umbral representó mejor los rasgos fundamentales de las imágenes

que la selección de un valor umbral único e igual para todas las imágenes, debido a que existen pequeñas diferencias en los fondos de cada imagen. La imagen binaria tiene sólo dos niveles de grises: 0 para las áreas vacías (negro, alvéolos de aire) y 255 para las paredes de los alvéolos (blanco, miga de pan). Se asignó la categoría de objeto (celdas de aire) a aquellas zonas de la imagen que tenían una intensidad de gris entre 0 y el valor umbral que correspondiera a cada imagen. En la Figura 3.69 se muestra como ejemplo, la imagen escaneada de una rodaja, la selección de la parte central de la miga, la transformación a escala de grises y por último la imagen binarizada.

Se obtuvieron los siguientes parámetros: densidad alveolar (número de alveolos/cm²), área o tamaño promedio de alveolos (mm²), circularidad (medida que va de 0 a 1 e indica que tan circulares son los alveolos, siendo 1 la mayor circularidad y 0 sin circularidad), perímetro de los alveolos (mm) y superficie o porcentaje de área cubierto por alveolos.

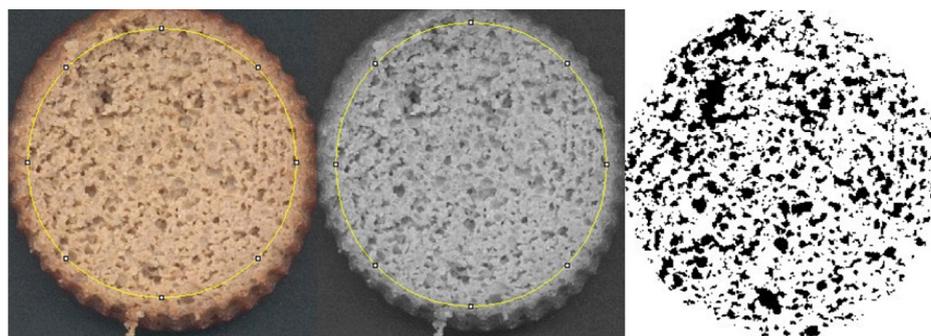


Figura 3.69. Secuencia del procesamiento de imágenes del análisis de alveolado de la miga.

3.5 Análisis sensorial de los panificados

El objetivo del panel sensorial fue caracterizar las muestras de acuerdo a cinco atributos y plantear dos hipótesis: la hipótesis nula que plantea que no hay diferencias significativas entre las muestras y la hipótesis alternativa que postula que entre las muestras se encuentran diferencias significativas. Para realizar este panel se utilizaron 76 (setenta y seis) panelistas no entrenados. A cada evaluador se le presentaron cuatro muestras en una bandeja como se muestra en la Figura 3.70, codificadas con números de tres cifras al azar y dispuestas con orden aleatorio en cada bandeja. A cada uno de los atributos de las planillas con la respuesta de los evaluadores se les asignó un puntaje del 1 al 9 (escala hedónica), siendo para el 1 la opción “disgusta” y el 9 para “gusta” para la

evaluación de los atributos de aceptabilidad general, color, aroma y sabor. Para el atributo masticabilidad se utilizó la misma escala pero se asignó el número 1 a “baja” masticabilidad y el 9 a “alta”, definiendo en la planilla el atributo masticabilidad. Una vez decodificadas las planillas se realizó un ANOVA para cada atributo utilizando una significancia de 0,05 y comparando las medias con el test Fisher. En el Anexo Capítulo III se adjunta la planilla entregada a cada evaluador.



Figura 3.70. Planilla y bandeja con muestras de los panificados de la evaluación sensorial.

3.6 Análisis estadístico de los resultados

La diferencia entre las variables se realizó mediante la comparación de medias utilizando el Test de Fisher con un nivel de significancia de 0,05 ($p < 0,05$) a través del software Origin 9.0 Pro. Las superficies de respuesta y los modelos se obtuvieron con el software DesignExpert 7.0.0; se tomaron los modelos que presentaron un nivel de ajuste significativo con un $p < 0,05$. Se realizó el test denominado “Lack of Fit” (falta de ajuste), mediante el cual se verifica la validez del modelo: se toma como válido cuando tiene un $p > 0,05$, ya que si el p fuese menor se cumpliría con la falta de ajuste.

4 Resultados y discusión

4.1 Preparación del panificado

En las Figura 3.71 y Figura 3.72 se puede observar a modo de ejemplo el resultado de una panificación, en moldes individuales de la muestra de mayor contenido de harina de algarrobo en mezclas con harinas de maíz y arroz (mezcla 9), antes y después del horneado.



Figura 3.71 Formulación antes de hornear.



Figura 3.72. Formulación luego del horneado.

4.2 Determinación del tiempo de fermentación

La Figura 3.73 y Figura 3.74 muestran que el mejor tiempo de fermentación fue el de 40 minutos, ya que utilizando menores tiempos, el levado no resultó óptimo y a mayores tiempos (50 y 60 min) se observó colapso de la estructura de los panificados.



Figura 3.73. Vista lateral de los panificados elaborados con diferentes tiempos de fermentación.

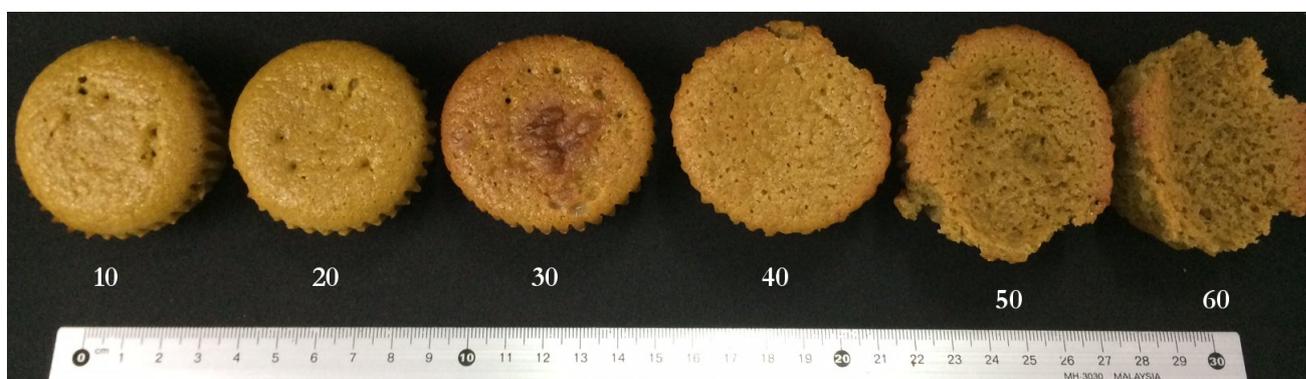


Figura 3.74. Vista superior de los panificados elaborados con diferentes tiempos de fermentación.

4.3 Panificados del diseño experimental

Los datos arrojados por el programa DesignExpert 7.0.0 se muestran en la Tabla 3.26; se informan las diferentes proporciones de cada harina para cada punto del diseño, como fue explicado anteriormente, manteniendo constante el resto de los ingredientes. Los diferentes contenidos de las harinas se expresan en forma porcentual dentro de la formulación, el contenido total de harina o mezcla de harinas siempre fue del 25% p/p sumando los otros componentes el 75% restante.

4.4 Aspecto y color de los panificados

La Figura 3.75 muestra los panificados de los diferentes puntos del diseño. Se puede observar que la harina de algarrobo le confiere coloración marrón, debido quizá a un mayor desarrollo de reacciones de Maillard durante el horneado. Estas reacciones están favorecidas con este procesamiento, requieren alta temperatura y deshidratación, y

se producen por la reacción entre azúcares reductores y los aminoácidos de las proteínas. La harina de algarrobo presenta azúcares reductores (glucosa y fructosa) y alto contenido de sacarosa que podría estar experimentando una hidrólisis parcial y por ende estar contribuyendo a la reacción de pardeamiento.

Tabla 3.26. Diseño de mezcla de harinas utilizadas en la formulación de los panificados de acuerdo al planeamiento experimental triangular. Valores codificados: C1 harina de maíz, C2 harina de arroz, C3 harina de algarrobo. Masa: masa de harina (valores decodificados).

Mezcla	HM		HA		HPA	
	C1	Masa (g)	C2	Masa (g)	C3	Masa (g)
1	1	25	0	0	0	0
2	0	0	1	25	0	0
3	0	0	0	0	1	25
4	0,5	12,5	0,5	12,5	0	0
5	0,5	12,5	0	0	0,5	12,5
6	0	0	0,5	12,5	0,5	12,5
7	0,666	16,66	0,166	4,16	0,166	4,16
8	0,166	4,16	0,666	16,66	0,166	4,16
9	0,166	4,16	0,166	4,16	0,666	16,66
10	0,333	8,33	0,333	8,33	0,333	8,33
11	0,333	8,33	0,333	8,33	0,333	8,33

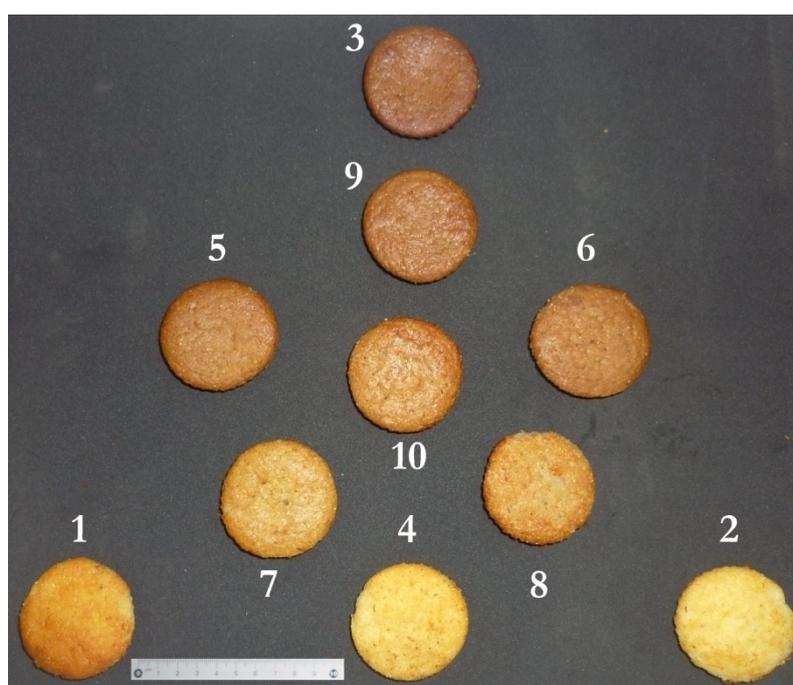


Figura 3.75. Panificados correspondientes a los diferentes puntos del diseño.

La determinación experimental del color de la parte externa de los panificados se muestra en la Tabla 3.27. Los mayores valores de luminosidad (L^*) se obtuvieron para las muestras con harina de maíz y de arroz, solas o en mezcla 1:1 (muestras 1, 2 y 4), y las muestras conteniendo harina de arroz fueron las más claras sin presentar diferencias significativas en este parámetro. Resultados similares fueron presentados por Bigne y col. (2016), quienes reemplazaron en porcentajes de 15, 25 y 35% la harina de trigo del pan por harina de algarrobo y reportaron una disminución de los parámetros L^* y b^* ante el aumento del agregado de harina de algarrobo. En nuestro caso se observa un comportamiento similar aunque el parámetro a^* no muestra una tendencia clara.

Por otro lado, la muestra menos luminosa resultó ser la de mayor contenido de harina de algarrobo (muestra 3). La superficie de contorno generada por el modelo de respuesta para esta variable se muestra en la Figura 3.76, que muestra la tendencia descrita anteriormente.

Los mayores valores de b^* que denotan una mayor tendencia al color amarillo, se observaron para las muestras sin HPA (muestras 1, 2 y 4), no presentando diferencias significativas entre los mismos. La superficie de contorno (Figura 3.77) muestra los mayores valores de b^* para panificados con HM y HA y un aumento de este parámetro a medida que aumenta la HPA. Los valores de a^* no pudieron ser ajustados con un modelo (Tabla 3.27).

Tabla 3.27. Parámetros de color de corteza obtenidos para las diferentes formulaciones.

Muestra	L*	a*	b*
1	59,01 ± 3,45 ^B	8,39 ± 1,69 ^A	32,38 ± 1,97 ^A
2	68,88 ± 1,85 ^A	2,34 ± 1,44 ^E	33,26 ± 0,42 ^A
3	42,75 ± 1,75 ^F	7,21 ± 0,55 ^B	10,31 ± 1,32 ^G
4	67,30 ± 1,80 ^A	4,07 ± 2,26 ^D	33,81 ± 0,56 ^A
5	46,83 ± 1,24 ^D	6,92 ± 0,60 ^{BC}	15,81 ± 0,73 ^E
6	48,34 ± 0,80 ^D	7,22 ± 0,53 ^B	15,51 ± 0,70 ^E
7	54,42 ± 1,79 ^C	5,94 ± 1,61 ^C	22,84 ± 1,05 ^B
8	53,26 ± 1,66 ^C	7,19 ± 1,01 ^B	19,41 ± 5,96 ^C
9	44,75 ± 1,54 ^E	7,20 ± 0,56 ^B	12,54 ± 1,20 ^F
10	48,39 ± 1,77 ^D	6,77 ± 1,09 ^{BC}	17,66 ± 0,68 ^{CD}
11	48,02 ± 1,29 ^D	6,92 ± 0,91 ^{BC}	17,25 ± 0,90 ^{DE}

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

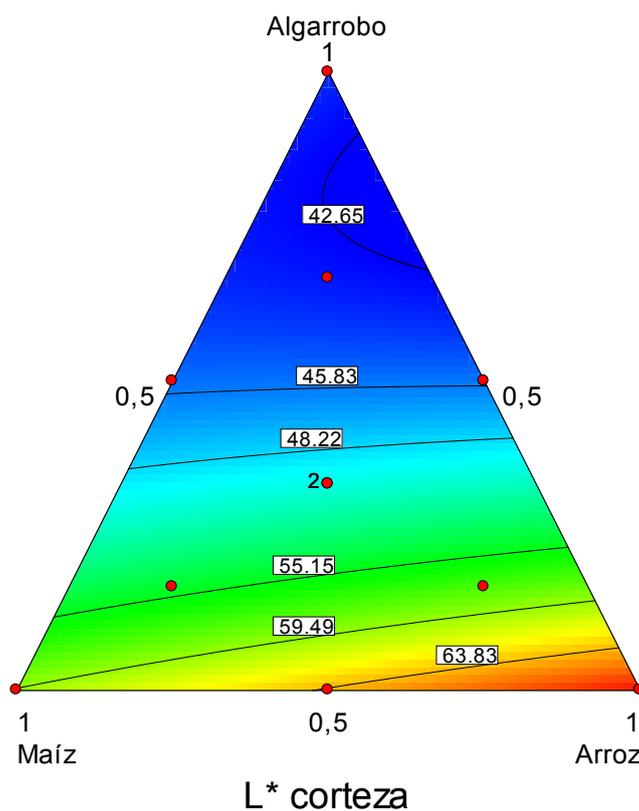


Figura 3.76. Superficie de contorno de luminosidad-L* de la corteza. Rojo: mayor L*, Azul: menor L*.

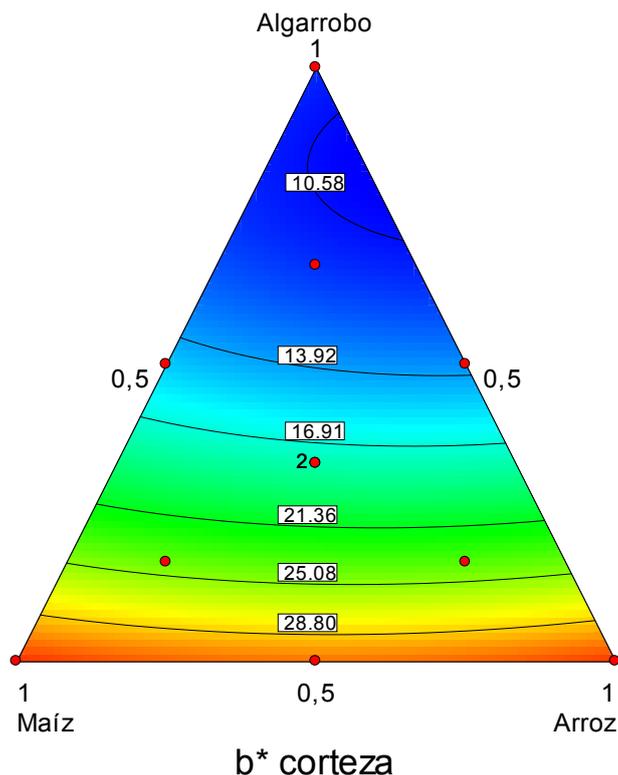


Figura 3.77. Superficie de contorno de la coordenada azul-amarillo- b^* de la corteza.

El tipo de modelo y la ecuación de L^* y b^* se muestran en la Tabla 3.28. Se puede observar el buen ajuste ($r^2 > 0,9$) que presentaron ambos parámetros.

Tabla 3.28. Ecuaciones obtenidas de los modelos aplicados a las variables de color de corteza del panificado.

L^*	Modelo de ajuste: Cuadrático
	$L^* \text{ corteza} = 59.64 * \text{Maíz} + 68.16 * \text{Arroz} + 43.94 * \text{Algarrobo} + 0.54842 * \text{Maíz} * \text{Arroz} - 25.19 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} - 41.61085 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,93$
	p modelo = 0,0048
	P falta de ajuste = 0,0582
a^*	No presentó ajuste
b^*	Modelo de ajuste: Cuadrático
	$b^* \text{ corteza} = 32.52 * \text{Maíz} + 32.41 * \text{Arroz} + 11.31 * \text{Algarrobo} - 5.94 * \text{Maíz} * \text{Arroz} - 28.35 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} - 33.30 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,94$
	p modelo = 0,0032
	p falta de ajuste = 0,0717

4.5 Propiedades fisicoquímicas de los panificados

En la Tabla 3.29 se muestran los valores medios de volumen específico, altura, y humedad. El volumen presentó diferencias significativas entre muestras; los panificados del punto central, con cantidades equivalentes de las tres harinas, presentaron el mayor volumen, seguido de los que contenían gran cantidad de algarrobo (muestras 3 y 9). El panificado de maíz fue el de menor volumen. La altura presentó diferencias significativas entre muestras, el modelo se presenta en la Figura 3.78. Se puede apreciar en el mismo que los puntos que presentaron menores valores son los de maíz y algarrobo; la mejor estructura, o sea, el panificado de mayor altura, la presentaron las muestras con mayor cantidad de arroz. En la Tabla 3.30 se muestran los valores de ajuste de los parámetros. Los valores de humedad en un producto panificado, dependen en gran medida del tiempo de horneado que en este caso fue el mismo para todas las formulaciones. Si bien, las muestras presentaron diferencias significativas en los valores de humedad, éstos rondaron los 49 g H₂O/100 g muestra.

Tabla 3.29. Propiedades físicas de los panificados.

Muestra	Volumen específico (cm ³ / g)	Altura (cm)	Humedad (g H ₂ O / 100 g)
1	2,05±0,02 ^G	2,51 ± 0,08 ^{FG}	48,48±0,33 ^C
2	2,15±0,02 ^{DE}	2,83 ± 0,15 ^A	49,36±0,53 ^{AB}
3	2,30±0,03 ^C	2,45 ± 0,12 ^G	48,51±0,10 ^{BC}
4	2,12±0,02 ^F	2,78 ± 0,19 ^{AB}	49,00±0,21 ^{ABC}
5	2,15±0,01 ^E	2,78 ± 0,06 ^{AB}	48,38±0,42 ^C
6	2,13±0,02 ^{EF}	2,77 ± 0,07 ^{AB}	49,49±0,46 ^A
7	2,14±0,02 ^E	2,66 ± 0,08 ^{CDE}	48,28±0,40 ^C
8	2,16±0,02 ^{DE}	2,71 ± 0,04 ^{BCD}	49,55±0,78 ^A
9	2,17±0,02 ^D	2,72 ± 0,12 ^{BC}	49,49±0,80 ^A
10	2,37±0,02 ^B	2,58 ± 0,09 ^{EF}	48,85±0,61 ^{ABC}
11	2,52±0,02 ^A	2,62 ± 0,07 ^{DE}	49,23±0,45 ^{AB}

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05)

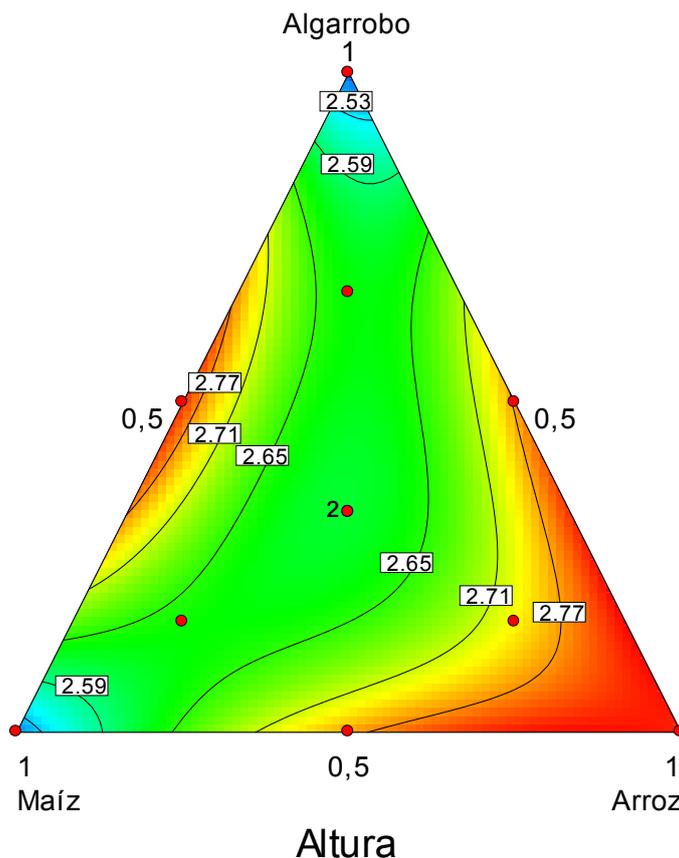


Figura 3.78. Superficie de contorno de la altura de los panificados.

Tabla 3.30. Ecuación obtenida del modelo aplicado a la variable altura del panificado.

Modelo de ajuste: Cúbico especial
$\text{Altura} = 2.50 * \text{Maíz} + 2.81 * \text{Arroz} + 2.47 * \text{Algarrobo} + 0.41 * \text{Maíz} * \text{Arroz} + 1.25 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} + 0.53 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo} - 5.94 * \text{Maíz} * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
$r^2 = 0,92$
$p \text{ modelo} = 0,033$
$p \text{ falta de ajuste} = 0,35$

4.6 Características de la miga

La miga presentó diferencias de color con respecto a la corteza y los resultados se muestran en la Tabla 3.31. Los valores de L^* y b^* fueron mayores que los correspondientes a los de corteza, indicando que la miga presenta menor coloración; valores similares fueron reportados por Bigne y col. (2016) quienes obtuvieron valores de L^* y b^* para la miga menores que para la corteza. Los valores de a^* fueron negativos para las muestras sin HPA y el mayor valor lo presentó la muestra con sólo HPA. Sólo se

ajustaron a un modelo los parámetros L* y b*; las características del modelo se muestran en la Tabla 3.32 y las superficies de contorno en la Figura 3.79 y Figura 3.80. Al igual que para corteza, para la miga los panificados con mayor cantidad de HPA presentaron menor L* y mayor b*.

Tabla 3.31. Parámetros de color de la miga obtenidos para las diferentes formulaciones.

Muestra	L*	a*	b*
1	70,21±1,14 ^C	-1,80±0,12 ^H	29,52±0,49 ^A
2	77,35±0,89 ^A	-4,52±0,11 ^J	23,90±0,49 ^C
3	52,81±0,43 ^G	5,67±0,17 ^A	14,45±0,26 ^I
4	73,52±1,50 ^B	-3,10±0,11 ^I	26,55±0,50 ^B
5	55,38±1,20 ^F	3,37±0,10 ^D	15,82±0,20 ^G
6	56,63±0,91 ^E	4,08±0,13 ^C	14,84±0,26 ^{HI}
7	62,26±2,68 ^D	0,87±0,14 ^G	18,31±0,44 ^D
8	62,79±1,29 ^D	1,00±0,14 ^F	16,30±0,27 ^F
9	54,27±0,55 ^F	4,46±0,16 ^B	15,15±0,71 ^H
10	58,47±0,98 ^E	2,60±0,17 ^E	16,82±0,45 ^E
11	57,40±1,30 ^E	2,61±0,24 ^E	16,42±0,56 ^F

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

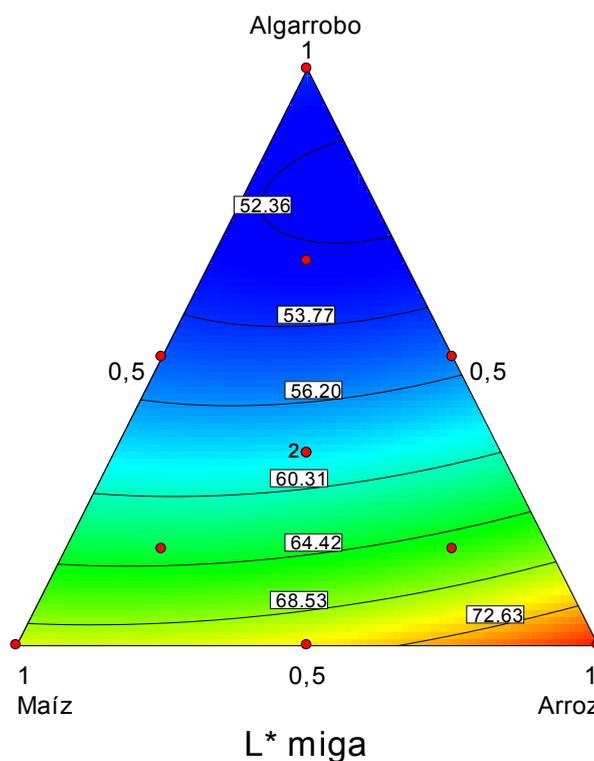


Figura 3.79. Superficie de contorno de la luminosidad-L* de la miga.

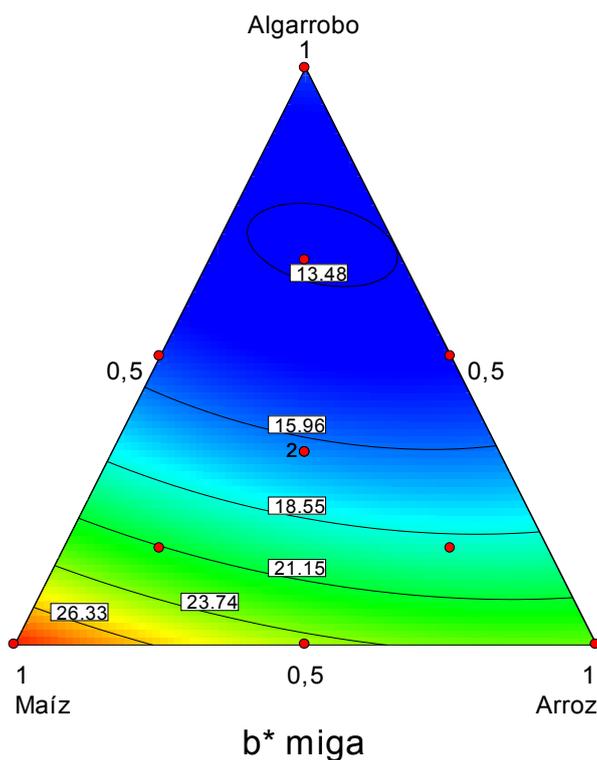


Figura 3.80. Superficie de contorno de la coordenada azul-amarillo- b^* de la miga.

Tabla 3.32. Ecuación obtenida del modelo aplicado a los parámetros de color (L^* , b^*) de la miga.

L^*	Modelo de ajuste: Cuadrático
	$L^* \text{ miga} = 70,21 * \text{Maíz} + 76,74 * \text{Arroz} + 53,75 * \text{Algarrobo} - 8,23 * \text{Maíz} * \text{Arroz} - 28,61 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} - 39,13 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,96$
	$p \text{ modelo} = 0,0009$
	$p \text{ falta de ajuste} = 0,24$
a^*	No presentó ajuste
b^*	Modelo de ajuste: Cuadrático
	$b^* \text{ miga} = 28,92 * \text{Maíz} + 23,35 * \text{Arroz} + 15,42 * \text{Algarrobo} - 7,03 * \text{Maíz} * \text{Arroz} - 28,02768 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} - 20,57 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,90$
	$p \text{ modelo} = 0,0150$
	$p \text{ falta de ajuste} = 0,082$

4.7 Alveolado de la miga

Los diferentes parámetros de alveolado de la miga se muestran en la Tabla 3.33. La mayor área total ocupada por alvéolos fue para las migas de formulaciones con HPA (muestras 3, 5, 6 y 9), como también se puede inferir de la superficie de contorno (Figura 3.81). Los alvéolos de los panificados con alto contenido de HPA (muestras 3, 9, 5 y 6) presentaron una mayor superficie individual (1,94-2,54 mm²) comparados con las muestras que contienen solo HA o HM o mezcla de ambas (1,16-1,75 mm²). Dichos alvéolos presentaron forma más irregular, como lo demuestran los valores de circularidad más alejados de la unidad y los mayores valores de perímetro. Este comportamiento puede deducirse tanto de los valores medios de los parámetros (Tabla 3.33) como de las superficies de contorno (Figura 3.82, Figura 3.83 y Figura 3.84). Estas mismas muestras ricas en algarrobo, a su vez presentaron densidades alveolares (número de alveolos/cm²) significativamente mayores a las observadas para el resto de las muestras, siendo la muestra con solo HPA la de mayor densidad alveolar, mientras que la 9 no presentó diferencias significativas con la 5, sugiriendo que HM contribuye más que HA a la mayor densidad de alvéolos, ya que el panificado 6 que contiene HPA+HA presentó una densidad de alveolos significativamente menor que la del panificado 5 (HPA+HM). La superficie de contorno de la densidad alveolar (Figura 3.85) muestra que ésta es mayor cuanto mayor es el nivel de HPA, pero que también la formulación resiste la incorporación de una cierta proporción de HM sin alterarse estos valores. Las ecuaciones de los ajustes se muestran en la Tabla 3.34. En el trabajo realizado por Bigne y col. (2016) obtuvieron una densidad alveolar para panes de harina de trigo con el 15% de sustitución con algarrobo (aproximadamente equivalente a la formulación 9 del presente trabajo en cuanto a nivel de algarrobo) de 18 alveolos / cm², mientras que para panes con 25% (equivalentes en nivel de algarrobo a la formulación 3) obtuvieron 22 alveolos / cm², si bien la cantidad de alveolos obtenidos por ellos es mayor, el resultado es similar en cuanto que a mayor cantidad de harina de algarrobo hace que se produzca una mayor cantidad de alveolos. Esta misma tendencia en matrices tan diferentes (una con gluten y la del presente trabajo sin gluten) puede estar relacionada con el efecto de la harina de algarrobo sobre el proceso de fermentación. La harina de algarrobo tiene un alto porcentaje de sacarosa (mayor al 50%) lo que posiblemente influya en la fermentación elevando la tasa de reproducción de las levaduras. Los autores mencionados encontraron

también una superficie alveolar individual menor cuanto mayor es la cantidad de harina de algarrobo agregada. En nuestro caso, las mezclas de algarrobo con harina de maíz o arroz en un nivel del 50% presentaron los mayores tamaños alveolares individuales. Estos resultados indicarían entonces que la harina de algarrobo favorece la producción de alveolos, pero éstos, al generarse en el seno de una matriz probablemente más rígida por los componentes aportados por la algarroba (particularmente la fibra) se dilatarían con dificultad lo que explica su mayor perímetro y menor circularidad. Este más deficiente desarrollo alveolar explicaría la menor altura obtenida en el caso de los muffins preparados solamente a base de harina de algarrobo. Cuando se combina la algarroba con otras harinas que sí contienen almidón, particularmente harina de maíz (que actuarían como agentes estructurantes al gelatinizar durante el horneado y luego gelificar consolidando la miga), la morfología alveolar (superficie alveolar, circularidad, perímetro) mejora y esto podría estar vinculado con una mejor calidad de miga y la mayor altura de los panificados.

Tabla 3.33. Parámetros de alveolado de miga.

Muestra	Área (%)	Superficie (mm ²)	Perímetro (mm)	Circularidad	Densidad (alveolos/cm ²)
1	9,19±1,21 ^F	1,64±0,29 ^E	4,71±0,40 ^{CD}	0,766±0,023 ^A	5,67±0,74 ^D
2	11,41±3,11 ^E	1,16±0,08 ^G	4,42±0,09 ^D	0,669±0,019 ^E	9,80±2,47 ^{BC}
3	22,32±1,34 ^A	1,94±0,29 ^C	7,03±0,76 ^A	0,568±0,021 ^G	11,71±1,35 ^A
4	8,49±1,03 ^F	1,75±0,30 ^{DE}	4,85±0,37 ^C	0,747±0,025 ^B	4,89±0,41 ^D
5	23,47±1,58 ^A	2,27±0,26 ^B	6,58±0,54 ^A	0,653±0,019 ^E	10,40±0,86 ^B
6	23,02±1,25 ^A	2,54±0,23 ^A	6,89±0,42 ^A	0,632±0,019 ^F	9,11±0,61 ^C
7	15,11±1,09 ^C	1,82±0,16 ^{DE}	5,17±0,23 ^{BC}	0,736±0,014 ^{BC}	8,30±0,36 ^C
8	12,95±0,92 ^{DE}	1,52±0,13 ^{EF}	4,83±0,25 ^{CD}	0,721±0,022 ^C	8,55±0,70 ^C
9	22,61±1,94 ^A	2,07±0,23 ^{BC}	6,64±0,51 ^A	0,617±0,017 ^F	10,94±0,69 ^{AB}
10	13,50±2,14 ^D	1,41±0,24 ^F	4,69±0,43 ^{CD}	0,708±0,016 ^C	9,64±0,92 ^{BC}
11	16,93±2,54 ^B	1,90±0,41 ^{CD}	5,55±0,56 ^B	0,689±0,013 ^D	9,08±1,15 ^C

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

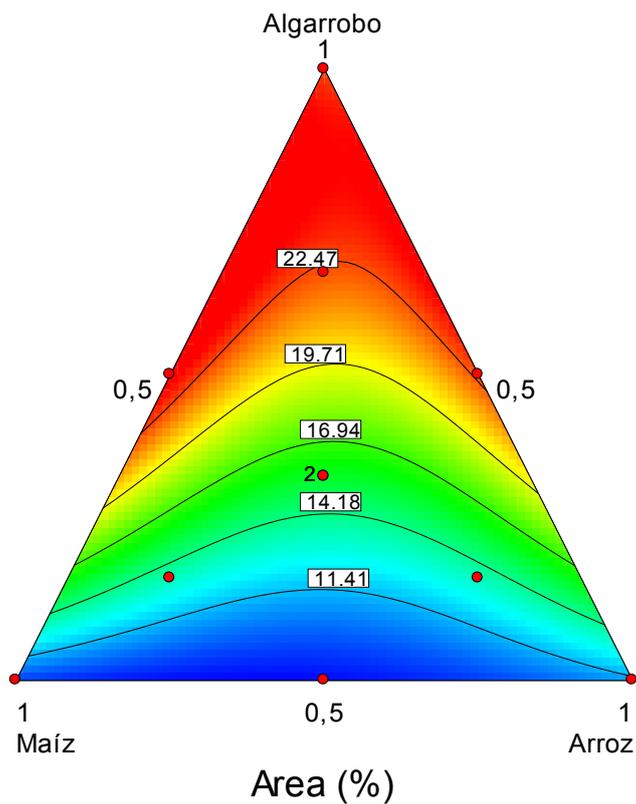


Figura 3.81. Superficie de contorno del porcentaje de área ocupada por alvéolos en la miga.

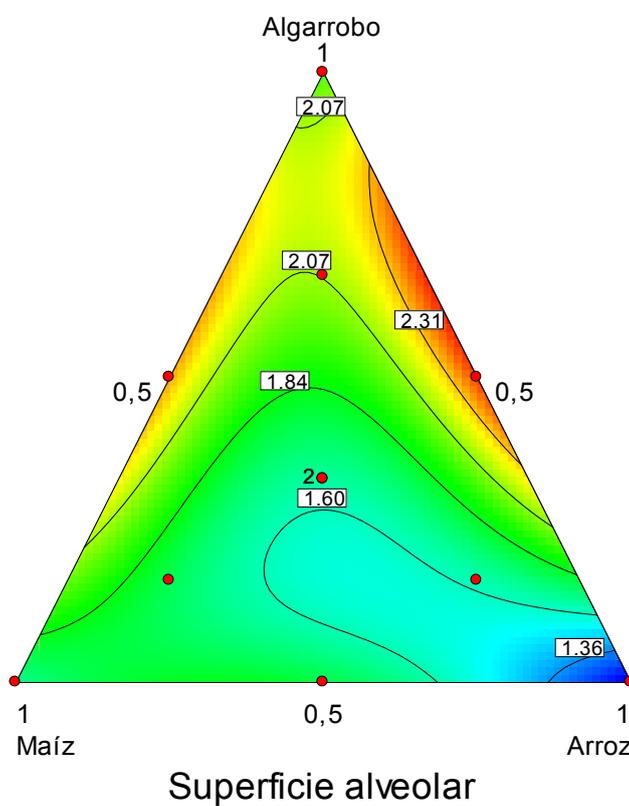


Figura 3.82. Superficie de contorno para la superficie alveolar individual.

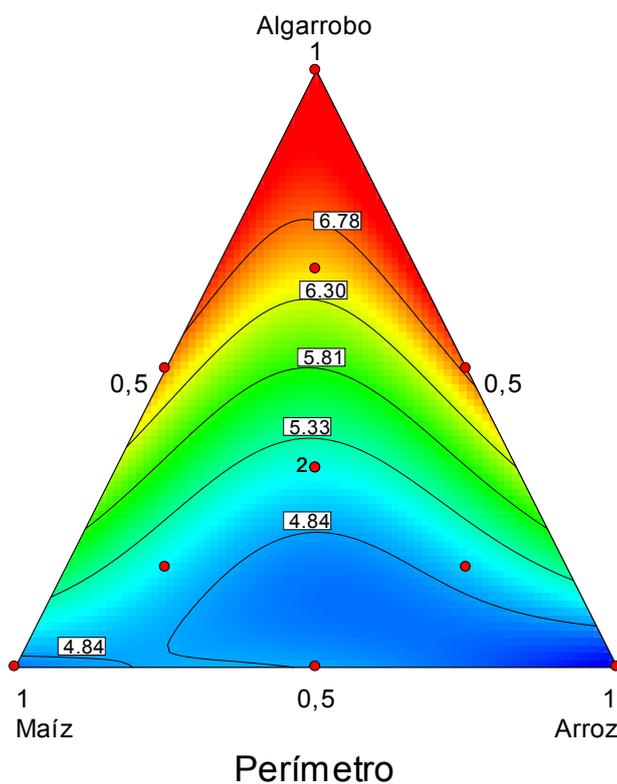


Figura 3.83. Superficie de contorno para el perímetro del alvéolo

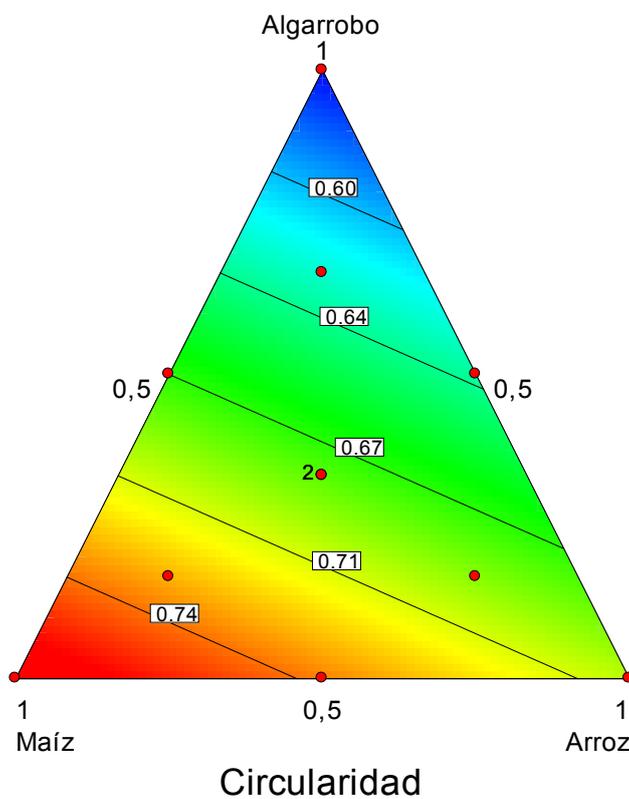


Figura 3.84. Superficie de contorno para la circularidad del alvéolo.

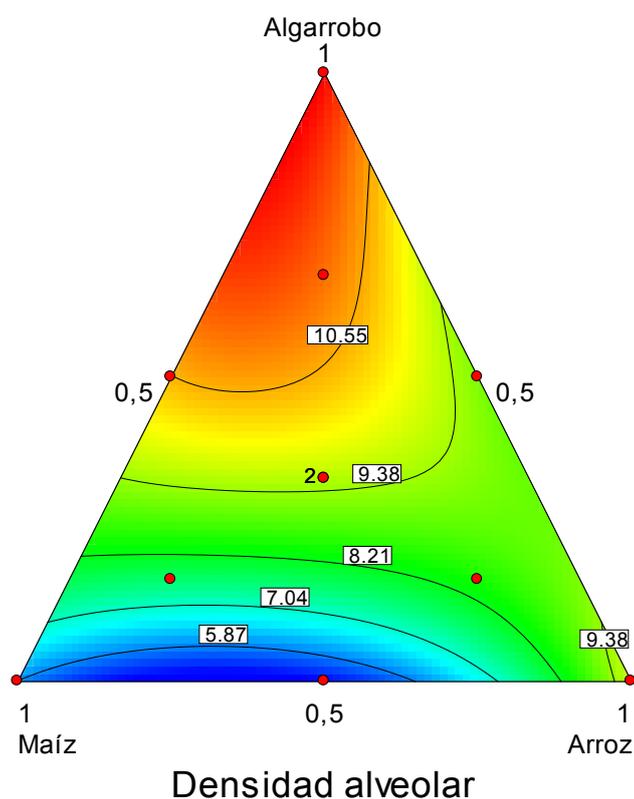


Figura 3.85. Superficie de contorno para la densidad alveolar de la miga.

4.8 Perfil de Textura

Los parámetros del perfil de textura se muestran en la Tabla 3.35. La miga más dura y de mayor consistencia fue la del panificado con HM, mientras que la de HPA resultó ser la más blanda. Este comportamiento también se puede observar en las superficies de contorno (Figura 3.86 Figura 3.87). En panes con gluten se obtuvieron resultados opuestos según Bigne y col. (2016) quienes informan que al aumentar el contenido de harina de algarrobo se aumentó la dureza para todos los porcentajes de sustitución.

La resiliencia es la capacidad que tiene la miga de recuperarse luego de la primera compresión. Se puede observar que esta capacidad la tienen las muestras con HM pero especialmente las elaboradas con HA. La muestra con HPA (muestra 3) presentó la menor resiliencia, indicando que la miga no se recupera luego de la compresión. Asimismo, cabe señalar que la muestra con cantidades iguales de HPA y HM (muestra 5) no difirió significativamente de la muestra 1, sugiriendo una predominancia del efecto de

la harina de maíz frente a la de algarroba; comportamiento que se observa claramente en la superficie de contorno (Figura 3.88) (zona verde). La harina de algarrobo le confiere una textura blanda de baja resiliencia.

Tabla 3.34. Ecuaciones obtenidas del modelo aplicado a los parámetros de alveolado de la miga.

Área	Modelo de ajuste: Cúbico especial
	Area (%) = $9,68 * \text{Maíz} + 11,15 * \text{Arroz} + 22,33 * \text{Algarrobo} - 6,75 * \text{Maíz} * \text{Arroz} + 31,88 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} + 24,17 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo} - 115,13 * \text{Maíz} * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,96$
	p modelo = 0,005
	p falta de ajuste = 0,862
Superficie	Modelo de ajuste: Cúbico especial
	Superficie = $1,67 * \text{Maíz} + 1,12 * \text{Arroz} + 1,93 * \text{Algarrobo} + 1,39 * \text{Maíz} * \text{Arroz} + 1,98 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} + 3,88 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo} - 19,98 * \text{Maíz} * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,90$
	p modelo = 0,0449
	P falta de ajuste = 0,972
Perímetro	Modelo de ajuste: Cúbico especial
	Perímetro = $4,74 * \text{Maíz} + 4,35 * \text{Arroz} + 7,07 * \text{Algarrobo} + 1,311 * \text{Maíz} * \text{Arroz} + 2,98 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} + 4,60 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo} - 32,78 * \text{Maíz} * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,95$
	p modelo = 0,01
	p falta de ajuste = 0,97
Circularidad	Modelo de ajuste: Lineal
	Circularidad = $+0,77 * \text{Maíz} + 0,70 * \text{Arroz} + 0,56 * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,91$
	p modelo < 0,0001
	p falta de ajuste = 0,459
Densidad alveolar	Modelo de ajuste: Cúbico especial
	Densidad = $5,84 * \text{Maíz} + 9,78 * \text{Arroz} + 11,66 * \text{Algarrobo} - 11,08 * \text{Maíz} * \text{Arroz} + 7,13 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} - 6,67 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo} + 43,78 * \text{Maíz} * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,98$
	p modelo = 0,0016
	p falta de ajuste = 0,571

La elasticidad, en este caso definida como la altura que recupera la miga durante el tiempo transcurrido entre el segundo ciclo y el primer ciclo y es el cociente entre las distancias desde el inicio del pico hasta el punto máximo, da idea de en qué proporción se recupera la miga luego de dos ciclos de compresión. En general, la elasticidad siguió un comportamiento similar al de la dureza, las migas más elásticas fueron las que contenían HA, HM y la mezcla de ambas, mientras que la menos elástica fue la de HPA. Las muestras con poco contenido de HPA (muestras 7 y 8) no resultaron significativamente diferentes a la muestra con HA o HA+HM. El agregado de mayor cantidad de HPA (muestras 10/11, 5 y 6) disminuyó la elasticidad pero sin llegar al valor de HPA. Estos resultados sugieren que niveles bajos de harinas de maíz y arroz ya son suficientes para mantener la elasticidad de la miga, que recién se ve disminuida cuando estas harinas están ausentes en la formulación; comportamiento que se ve reflejado en la pequeña área azul-celeste en la zona de HPA (Figura 3.89).

Las características texturales de las migas de los productos con alto contenido de algarroba se pueden relacionar con la mayor densidad y superficies alveolares totales encontradas y discutidas previamente, como se puede apreciar de la comparación de la Figura 3.81 y Figura 3.85 con la Figura 3.86, Figura 3.87, Figura 3.88 y Figura 3.89. Cuanto mayor densidad alveolar y mayor área alveolar total, menor dureza, consistencia, elasticidad y resiliencia. Gallagher y col. (2003) para panes libres de gluten fortificados con proteínas lácteas de diferentes orígenes no encontraron una tendencia similar, demostrando que según el tipo de proteína que agregaban variaba tanto el área alveolar como la textura sin presentar una correlación entre ambos parámetros. En tanto que Hager y Arendt (2013) para panes libres de gluten elaborados con harina de arroz, trigo sarraceno y maíz, encontraron una tendencia similar a la descrita en este trabajo, panes con mayor cantidad de alveolos presentaron menor dureza. Hager y col. (2012) no encontraron correlación entre los parámetros de densidad alveolar y dureza para diferentes panificados con y sin gluten. Nunes y col. (2009) probaron para una formulación libre de gluten diferentes emulsificantes y tampoco hallaron relación entre la densidad alveolar y la dureza, por lo que se puede concluir que no siempre la relación entre mayor densidad alveolar y menor dureza y viceversa está relacionada, la misma depende exclusivamente de las formulaciones utilizadas para realizar los panificados.

La cohesividad se relaciona con la capacidad de los componentes estructurales de la miga de mantenerse unidos contribuyendo a un menor desgranamiento frente a la aplicación de una fuerza. Los valores de cohesividad no presentaron grandes variaciones entre las distintas formulaciones, encontrándose todos ellos en el rango 0,415-0,478. La harina con mayor capacidad para obtener una miga más cohesiva fue la de arroz y la menos cohesiva fue la de maíz, presentando para este parámetro la harina de algarrobo valores intermedios (Tabla 3.35, Figura 3.90).

A diferencia del pan de trigo, estos panificados con mezcla de HPA, HM y HA presentaron migas con cierta adhesividad. Este comportamiento está relacionado con la formulación; estos panificados por un lado contienen leche y huevo que le están aportando lípidos que actúan como lubricantes, y por otro estas harinas al no formar gluten que en general retiene agua en su estructura, no absorben el agua de la misma forma. Aún en ausencia de gluten, la captación del agua del medio por estas tres harinas resultó diferente entre sí. Los de harina de algarrobo presentaron migas más adhesivas sugiriendo una menor captación de agua, debido quizá al alto contenido de fibra insoluble y de sacarosa; mientras que las migas de los panificados con HA presentaron muy baja adhesividad. (Figura 3.91)

En el caso de la masticabilidad, que está relacionada con la dureza siguen una tendencia similar, la masticabilidad disminuye con el agregado de harina de algarrobo, obteniéndose un producto más blando, lo que se puede apreciar en la superficie de contorno (Figura 3.92). Todos los parámetros de textura ajustaron con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$) a modelos cuadráticos (Tabla 3.36) a excepción de la resiliencia que ajustó a un modelo cúbico especial, con r^2 mayores a 0,90.

Tabla 3.35. Parámetros de textura de miga.

M	Dureza	Consistencia	Resiliencia	Elasticidad	Adhesividad	Cohesividad	Mas
1	22,04±0,74 ^A	214,5±7,4 ^A	0,265±0,007 ^F	0,863±0,010 ^C	0,197±0,118 ^D	0,415±0,007 ^H	7,89±0,36 ^A
2	17,14±1,24 ^B	161,1±11,3 ^B	0,382±0,010 ^A	0,906±0,007 ^A	0,050±0,036 ^E	0,478±0,005 ^A	7,43±0,51 ^B
3	7,31±1,62 ^G	53,2±11,3 ^G	0,147±0,013 ^H	0,766±0,045 ^E	1,115±0,395 ^A	0,441±0,014 ^G	2,48±0,62 ^I
4	17,35±1,21 ^B	161,5±13,8 ^B	0,333±0,007 ^C	0,893±0,009 ^A	0,127±0,111 ^{DE}	0,456±0,007 ^{DE}	7,06±0,42 ^C
5	7,17±0,67 ^G	64,5±6,3 ^{FG}	0,268±0,005 ^F	0,854±0,011 ^{CD}	0,342±0,056 ^C	0,454±0,004 ^{EF}	2,78±0,25 ^{HI}
6	7,44±0,67 ^G	68,7±6,5 ^F	0,307±0,009 ^E	0,858±0,007 ^C	0,130±0,047 ^{DE}	0,463±0,007 ^C	2,95±0,26 ^H
7	13,86±0,49 ^D	134,3±5,1 ^C	0,306±0,008 ^E	0,885±0,016 ^A	0,208±0,150 ^D	0,443±0,007 ^{FG}	5,44±0,24 ^E
8	14,74±0,96 ^C	140,3±8,5 ^C	0,361±0,005 ^B	0,905±0,008 ^A	0,119±0,044 ^{DE}	0,471±0,003 ^B	6,28±0,39 ^D
9	6,71±0,40 ^G	59,2±3,6 ^G	0,244±0,007 ^G	0,841±0,018 ^D	0,485±0,075 ^B	0,448±0,007 ^F	2,53±0,15 ^I
10	12,27±0,81 ^E	116,5±5,6 ^D	0,316±0,007 ^D	0,881±0,015 ^{AB}	0,374±0,125 ^C	0,461±0,005 ^{CD}	4,98±0,33 ^F
11	9,75±0,68 ^F	92,9±6,1 ^E	0,313±0,005 ^{DE}	0,865±0,012 ^B	0,110±0,058 ^{DE}	0,454±0,006 ^{EF}	3,83±0,31 ^G

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). M: muestra. Mas: masticabilidad

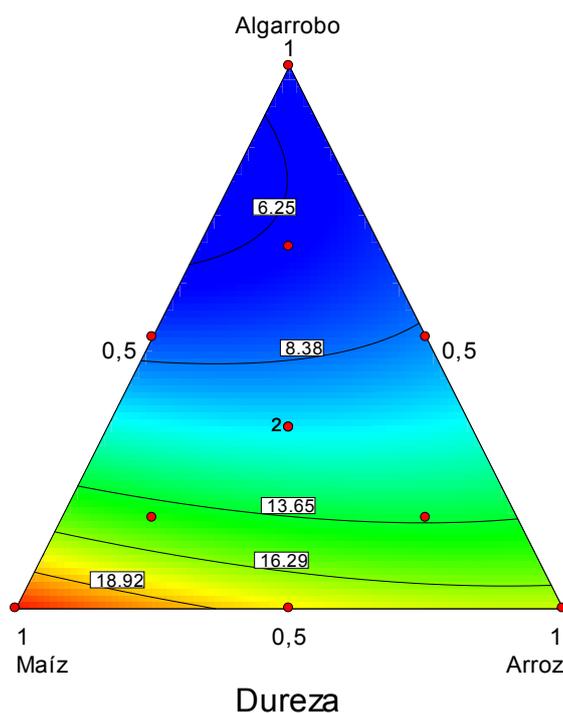


Figura 3.86. Superficie de contorno para la dureza de la miga.

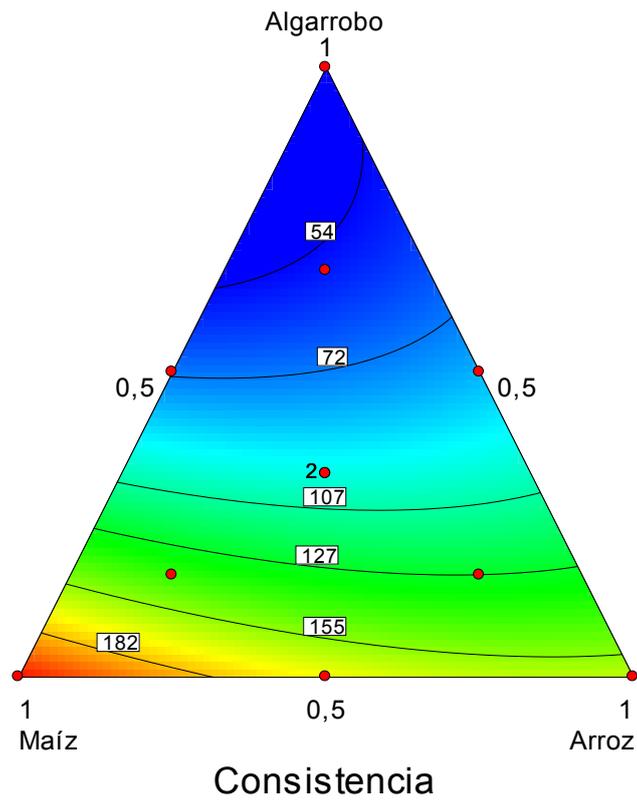


Figura 3.87. Superficie de contorno para la consistencia de la miga.

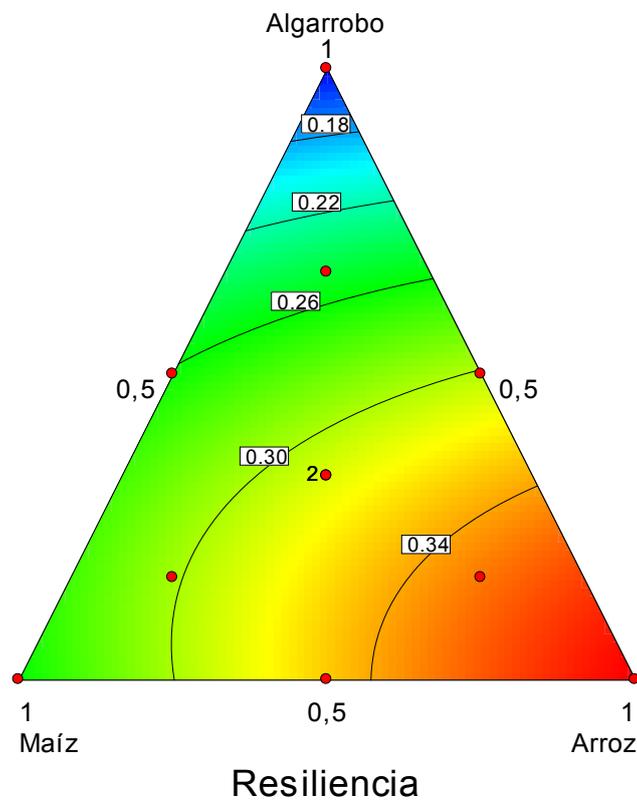


Figura 3.88. Superficie de contorno para la resiliencia de la miga.

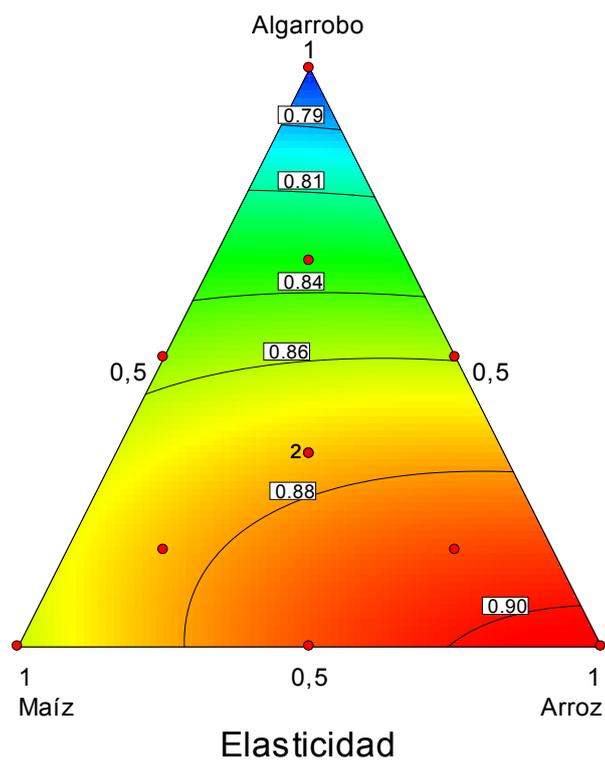


Figura 3.89. Superficie de contorno para la elasticidad de la miga.

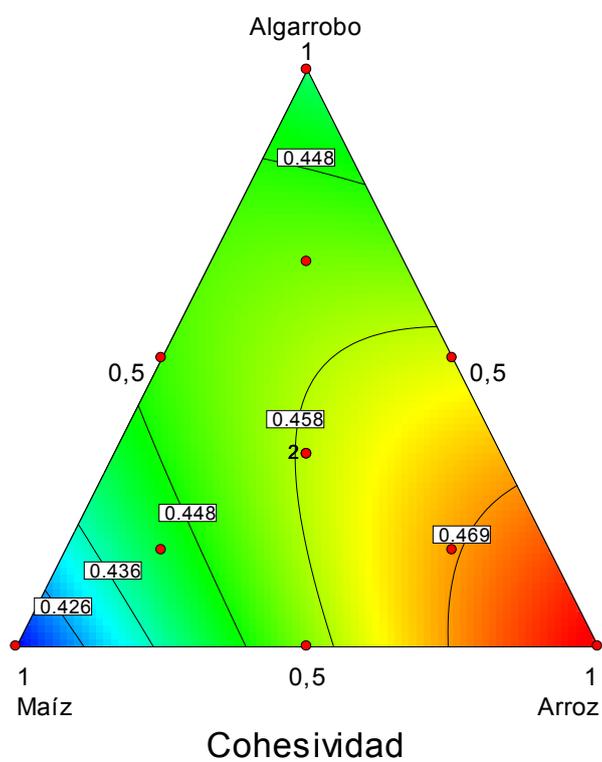


Figura 3.90. Superficie de contorno para la cohesividad de la miga.

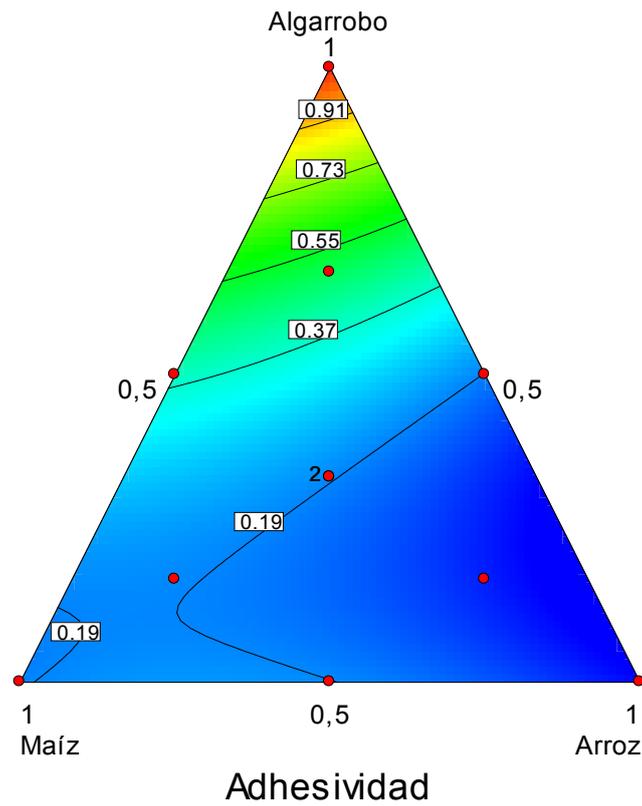


Figura 3.91. Superficie de contorno para la adhesividad de la miga.

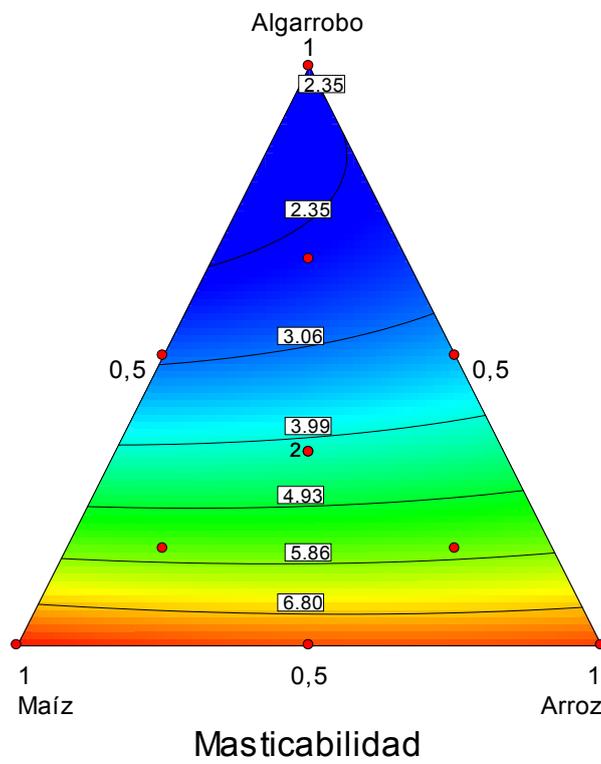


Figura 3.92. Superficie de contorno para la masticabilidad de la miga

Tabla 3.36. Ecuaciones obtenidas del modelo aplicado a los parámetros de textura de la miga.

Dureza (N)	Modelo de ajuste: Cuadrático
	Fuerza = 21,55 * Maíz + 17,32 * Arroz + 7,12 * Algarrobo - 4,70 * Maíz * Arroz - 26,51 * Maíz * Algarrobo - 14,33 * Arroz * Algarrobo
	$r^2 = 0,96$
	p modelo = 0,0012
	p falta de ajuste = 0,778
Resiliencia	Modelo de ajuste: Cúbico especial
	Resiliencia = 0,26 * Maíz + 0,38 * Arroz + 0,14 * Algarrobo + 0,04 * Maíz * Arroz +0,24 * Maíz*Algarrobo + 0,16 * Arroz*Algarrobo
	$r^2 = 0,99$
	p modelo < 0,0001
	p falta de ajuste = 0,268
Adhesividad (Ns)	Modelo de ajuste: Cuadrático
	Adhesividad = 0,18 * Maíz+0,04 * Arroz+1,09 * Algarrobo+0,29 * Maíz * Arroz- 1,00 * Maíz * Algarrobo-1,53 * Arroz * Algarrobo
	$r^2 = 0,94$
	p modelo = 0,0039
	p falta de ajuste = 0,952
Consistencia (Ns)	Modelo de ajuste: Cuadrático
	Consistencia = 209* Maíz+162 * Arroz+51 * Algarrobo-58 * Maíz * Arroz-237 * Maíz * Algarrobo-101 * Arroz * Algarrobo
	$r^2 = 0,91$
	p modelo = 0,0011
	p falta de ajuste = 0,705
Cohesividad	Modelo de ajuste: Cuadrático
	Cohesividad = 0.41 * Maíz+0.47 * Arroz+0.43 * Algarrobo+0.029 * Maíz * Arroz+0.091 * Maíz * Algarrobo+1.3E-003 * Arroz * Algarrobo
	$r^2 = 0,96$
	p modelo = 0,0009
	p falta de ajuste = 0,696
Elasticidad	Modelo de ajuste: Cuadrático
	Elasticidad = 0.86 * Maíz+0.90 * Arroz+0.76 * Algarrobo+0.03 * Maíz * Arroz+0.16 * Maíz * Algarrobo+0.09 * Arroz * Algarrobo
	$r^2 = 0,97$
	p modelo = 0,0004
	p falta de ajuste Lack of fit = 0,782

Masticabilidad	Modelo de ajuste: Cuadrático
	Masticabilidad = $7.73 * \text{Maíz} + 7.52 * \text{Arroz} + 2.39 * \text{Algarrobo} - 0.75 * \text{Maíz} * \text{Arroz} - 8.35 * \text{Maíz} * \text{Algarrobo} - 6.22 * \text{Arroz} * \text{Algarrobo}$
	$r^2 = 0,96$
	p modelo = 0,0013
	p falta de ajuste = 0,877

4.9 Análisis sensorial

En la Tabla 3.37 se muestran los valores medios con sus desvíos para cada atributo sensorial y en la Figura 3.93 se muestra un gráfico de tela araña con los diferentes atributos. En dicho gráfico se puede observar que si bien solamente en los parámetros de aceptabilidad global y sabor hubo diferencias significativas a favor de la muestra 9 con respecto a las muestras 5 y 10 aunque no con respecto a la 6, se ve una clara tendencia que dicha muestra es mejor para todos los atributos. En el caso de masticabilidad se toma al parámetro como satisfactorio cuando es bajo, las formulaciones demostraron tener una baja masticabilidad lo que se correlaciona con los valores de masticabilidad obtenidos mediante el texturómetro observándose que las muestra de mayor y menor contenido de harina de algarrobo, la 10 y 9 respectivamente, determinadas con el texturómetro se corresponden con las analizadas en forma sensorial.

La Figura 3.94 a la Figura 3.98 muestran los histogramas de frecuencia de elección para cada atributo. Los histogramas permiten diferenciar mejor que el valor medio la elección por parte de los evaluadores de los diferentes atributos para cada muestra. En cuanto a aceptabilidad global, la muestra 9 presentó mayor porcentaje de respuesta entre los valores 7, 8 y 9. La muestra 10 correspondiente al punto central, con cantidades equivalentes de las tres harinas, exhibió un 30% de respuestas para el puntaje 7 (mayor aún que para la muestra 9) pero presentó menor porcentaje de respuestas de valores 8 y 9. La muestra 9 también presentó mayor proporción de puntuación 8 y 9 en color, aroma y sabor en comparación con las otras tres muestras ensayadas. El histograma de la masticabilidad presentó una distribución más aleatoria. Zolfaghari y col. (1986) para muffins realizados con harina de trigo reemplazada con diferentes porcentajes de harina de algarrobo de *Prosopis glandulosa* realizó un ensayo sensorial utilizando una escala hedónica del 0 al 10, utilizando como valor 0 inaceptable y 10 excelente y encontró para

los atributos de color y sabor valores entre 7,4 y 7,2, los que entran en un rango medio de la escala.

Tomando como parámetro lo analizado para el bocadito en el Capítulo II, se tomó como puntajes entre 1-4 como rechazo por parte de los consumidores. La Tabla 3.38 muestra para cada atributo cual fue el porcentaje de rechazo, encontrándose que el menor porcentaje de rechazo en aceptabilidad general y sabor lo tiene la muestra 9 (16% de harina de algarrobo), el color y el aroma tienen un menor porcentaje de rechazo en la muestra 6 (12,5% harina de arroz y 12,5% de harina de algarrobo) en cuanto a los porcentajes de rechazo para todos los atributos los mayores puntajes los presentaron las muestras 10 y 5 que son las que poseen mayor cantidad de harina de maíz.

Tabla 3.37. Atributos de calidad sensorial de panificados conteniendo harina de algarrobo.

Muestra	Aceptabilidad global	Color	Aroma	Sabor	Masticabilidad
5	6,05±1,76 ^B	6,66±1,55 ^A	6,21±1,83 ^A	5,51±2,08 ^B	3,32±1,54 ^A
6	6,30±1,77 ^{AB}	6,70±1,44 ^A	6,30±1,70 ^A	5,84±2,01 ^{AB}	3,18±1,42 ^A
9	6,62±1,74 ^A	6,78±1,58 ^A	6,62±1,68 ^A	6,38±1,82 ^A	2,93±1,55 ^A
10	6,05±1,50 ^B	6,45±1,46 ^A	6,32±1,62 ^A	5,75±1,71 ^B	3,39±1,34 ^A

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3.38. Porcentajes de rechazo para los diferentes atributos.

Muestra	Aceptabilidad global	Color	Aroma	Sabor
5	17,10%	11,84%	17,48%	32,89%
6	17,10%	6,75%	7,89%	23,68%
9	10,52%	10,52%	11,84%	14,47%
10	17,10%	6,57%	13,15%	23,68%

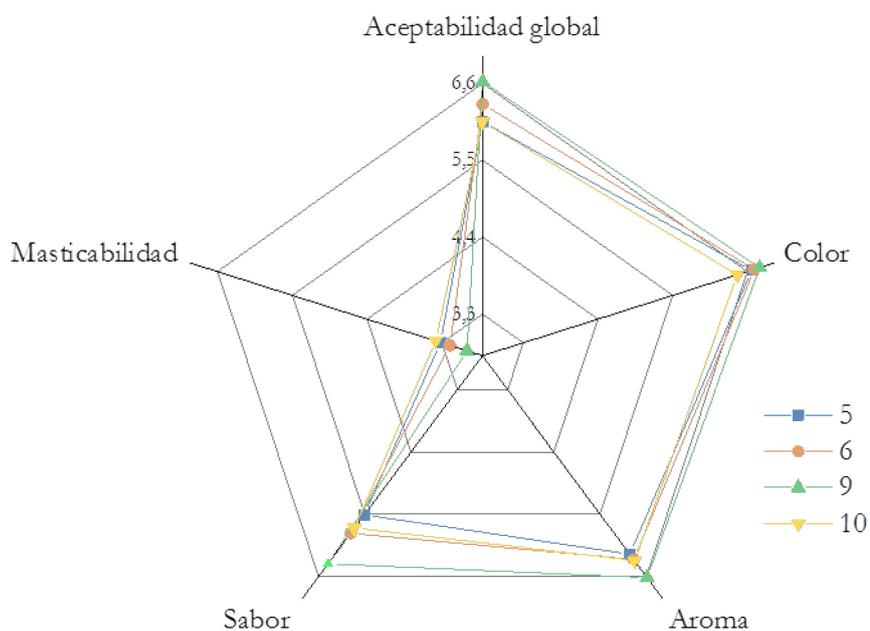


Figura 3.93. Gráfico de telaraña de los atributos sensoriales ensayados a ls panificados con harina de algarrobo.

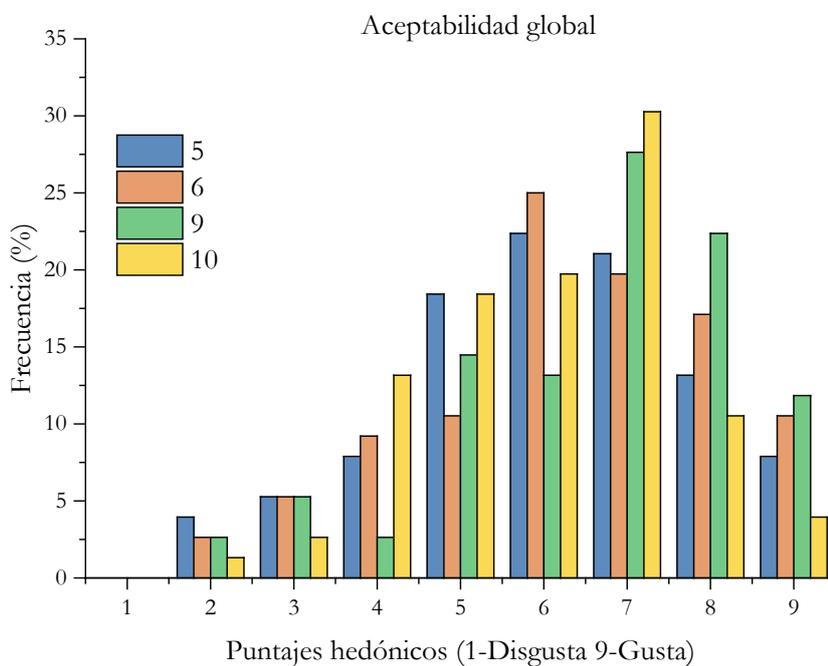


Figura 3.94. Histograma de frecuencia para Aceptabilidad global.

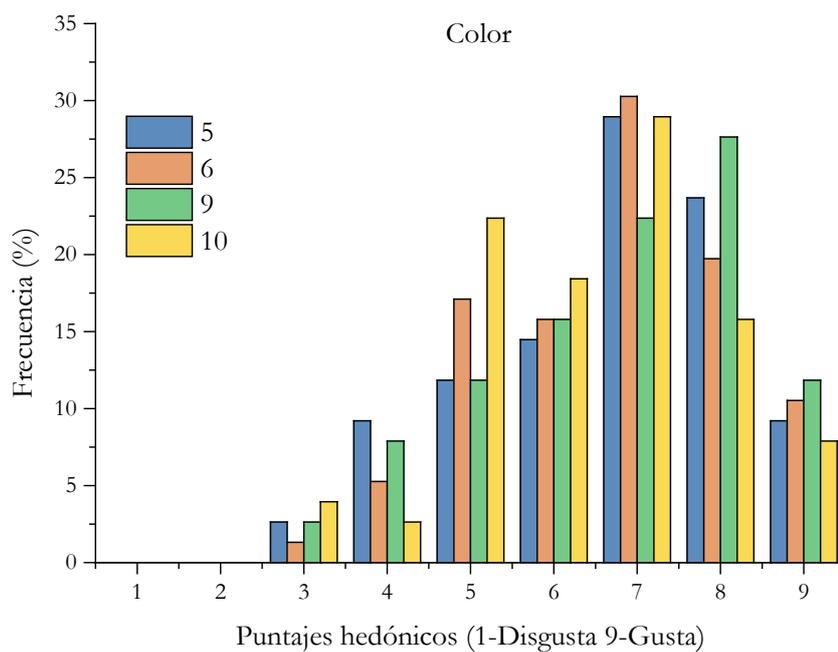


Figura 3.95. Histograma de frecuencia para Color.

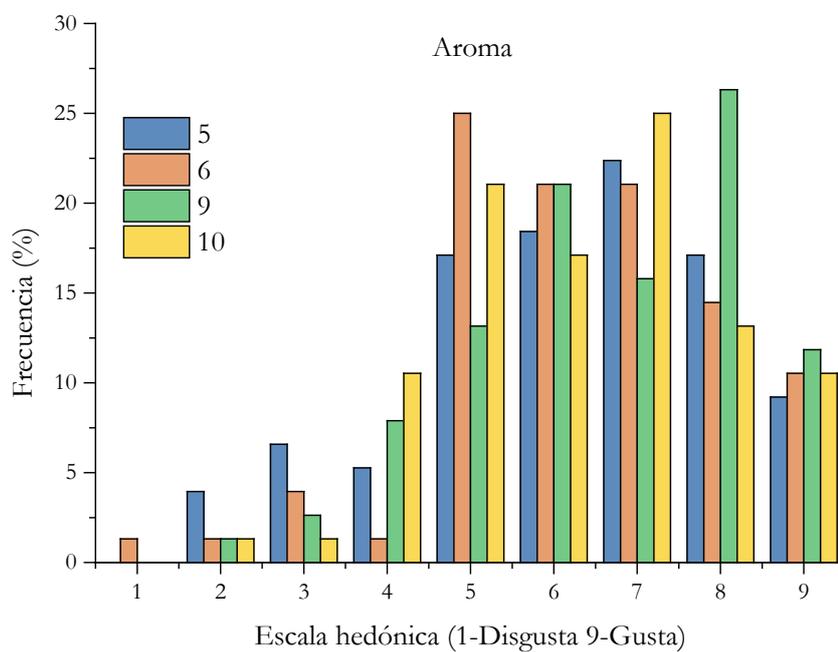


Figura 3.96. Histograma de frecuencia para Aroma.

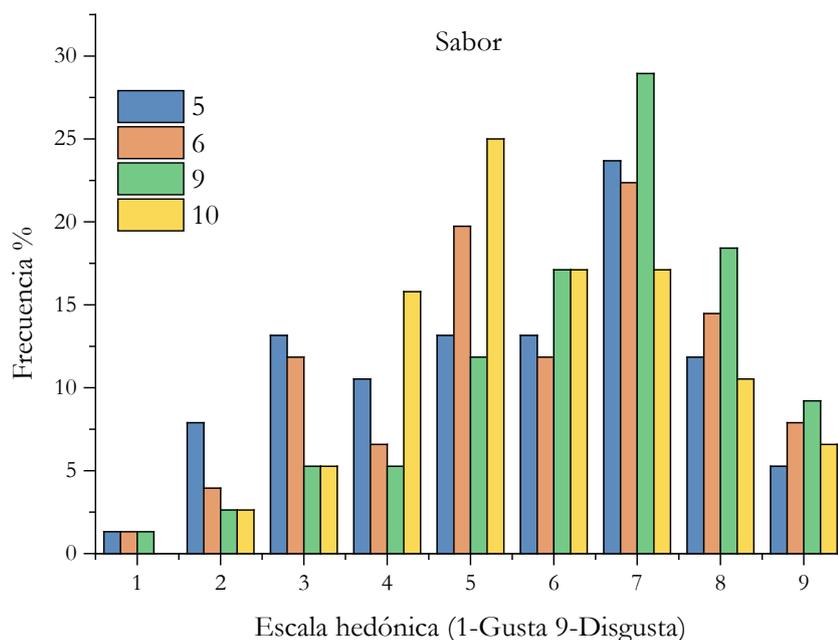


Figura 3.97. Histograma de frecuencia para Sabor.

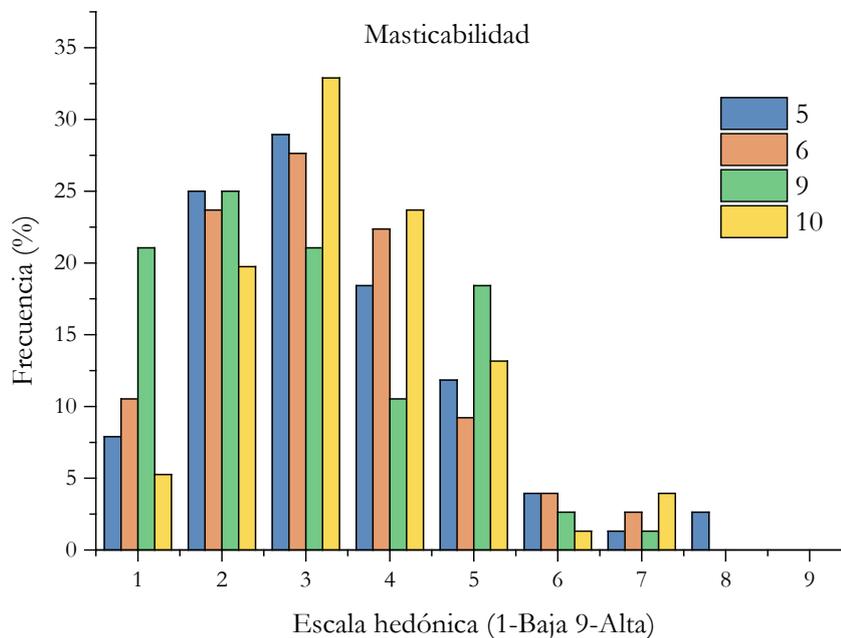


Figura 3.98. Histograma de frecuencia para Masticabilidad.

Que no se hayan registrado diferencias significativas en los parámetros de color, aroma y masticabilidad indica que desde el punto de vista de la preferencia se puede

incorporar harina de algarrobo, harinas de maíz y arroz y viceversa sin modificar sus características sensoriales. Por otro lado, el mayor puntaje en sabor y aceptabilidad global y el menor en masticabilidad a la muestra con mayor proporción de harina de algarrobo (muestra 9), ratifica el gran potencial que tiene esta harina en la elaboración de panificados libres de gluten a base de un recurso forestal subutilizado.

5 Conclusiones Parciales

Los muffins libres de gluten con harina de algarrobo resultaron con características diferenciales y superiores en muchos aspectos a los formulados sólo con harinas de maíz y de arroz, tanto desde el punto de vista de los aspectos físicos medidos instrumentalmente (color, volumen, textura), como en su evaluación sensorial. La muestra con mayor contenido de harina de algarrobo fue la que presentó menor dureza, menor masticabilidad, mayor adhesividad (lo que confiere sensación de humedad al panificado). Estos atributos pueden relacionarse con las características estructurales de la miga: aunque más irregulares en su forma, los alvéolos ocuparon mayor porcentaje de área y se observó mayor densidad alveolar (número de alveolos por unidad de área) en los productos ricos en harina de algarrobo lo que permitió obtener migas más blandas. Desde el punto de vista de la aceptabilidad sensorial, los resultados demuestran que los atributos característicos conferidos por la harina de algarrobo contribuyeron positivamente al perfil del producto. Inclusive, el color más oscuro que el de los muffins tradicionales resultó bien aceptado, y podría así constituir un mimético de productos a base de chocolate.

Capítulo

IV

Aloja, una bebida
tradicional del
Noroeste Argentino

BIENHAIGA CON EL MOCITO
(Chacarera)

*Bienhaiga con el mocito
bailando la noche entera
mudanceando amanecido
la chacarera, la chacarera.*

*Bienhaiga con el mocito
de dónde se habrá venido
no se ha perdido ni un gato,
ni un escondido, ni un escondido.*

*Y agarrando la guitarra
componiendo la garganta
con un traguito de aloja
y así nos canta, y así nos canta.*

*Soy del pago de la aloja
en donde calcina el sol
Pal' tiempo de la algarroba
¡Santiagoño soy señor!*

*En Loreto yo i' nacido
pal' tiempo del carnaval
por eso la vidalita
me hace llorar, me hace llorar.*

*Conozco la triste queja
que sufren los salitrales
quemao's por ardientes soles
lleno i' pesares, lleno i' pesares.*

*Mi pago es a veces triste
y alegre en sus emociones
por eso mantiene siempre
sus tradiciones, sus tradiciones*

*Soy del pago de la aloja
en donde calcina el sol
pal' tiempo de la algarroba
¡Santiagoño soy señor!*

Letra y Música: Fortunato Juárez

1 Introducción

1.1 La bebida, su historia

La aloja es una bebida artesanal elaborada principalmente con los frutos del algarrobo blanco. Es una bebida típica del norte y la región chaqueña de Argentina. Algunos testimonios sobre la bebida son los siguientes:

“El algarrobo era de vital importancia para los comechingones que poblaron nuestras tierras pues le brindaba comida y bebida (aloja) la cual era utilizada para las fiestas: pedido de ayuda para el Chiqui, cosechas, casamientos, tintunaco, e inicio de guerra (...). Existen todavía nombres que hacen referencia al algarrobo como Conchuluca, que guarda relación con la producción de algarroba pues conchu, en quichua, significa mosto de aloja, por lo que significaría “lugar donde se cuida o hace el mosto de aloja”. La cuenca del actual río Cruz del Eje (Córdoba), era llamado Tococho (o Tacutacu), que significaría el río de los algarrobales....A su vez estos fabricaban bebidas alcohólicas, como la aloja, de la que Ulrico Schmidl (primer cronista del Río de La Plata) opinó: con la algarroba hacen también un vino muy bueno, tanto como allá en Alemania el hidromiel (Ing. Agr. Ringuelet, G.I. Escuela IPEM N° 104 “Arturo Capdevila” Cruz del Eje).”

En cada pueblo existen alimentos y bebidas que tienen un valor simbólico y que están asociadas a ceremonias y rituales, la Aloja no es una excepción. Samuel Lafone Quevedo, publica cartas en el diario La Nación entre los años 1883 y 1885 con historias y costumbres de la provincia de Catamarca. En una de las cartas dio noticia acerca de “Fiesta o Juego del Chiqui” (Lafone Quevedo, 1888), en donde recoge la historia del indio Peralta nacido en el pueblo ya abandonado de Pantanto, en donde se juntaban hombres y mujeres bajo el algarrobo con varias tinajas llenas de aloja; dos días antes de la fiesta salían a cazar animales como liebres, guanacos, pumas y aves excepto avestruces que las respetaban. La fiesta consistía en dar vueltas alrededor del árbol con las cabezas de los animales que cazaban, entonando el canto o vidala de los indios y tomando aloja; por la tarde se organizaban carreras de hombres con hombres y mujeres con mujeres que se colocaban a unos doscientos metros del árbol, y con una señal empezaba la carrera, en la cual el primero que llegaba al árbol obtenía el premio asignado que consistía en huahuas (muñecos) de masa y bizcocho colgados del árbol.

En el año 1859 el cura Maubecin, presumiblemente pariente de Vicente Maubecin gobernador de Catamarca, suprime la fiesta cuyo objetivo era el de conjurar la mala suerte

en el tiempo de seca u otra calamidad (Lafone Quevedo, 1888). El dibujo intenta representar la Danza de El Chiquí, tal como se la bailó en Pantanto y Machigasta hasta fines del siglo XIX. También en la imagen se pueden apreciar las tinajas de aloja, el árbol de algarrobo en el centro de la imagen con los muñecos de masa colgados de él (Figura 4.99) (Gentile, 2001).

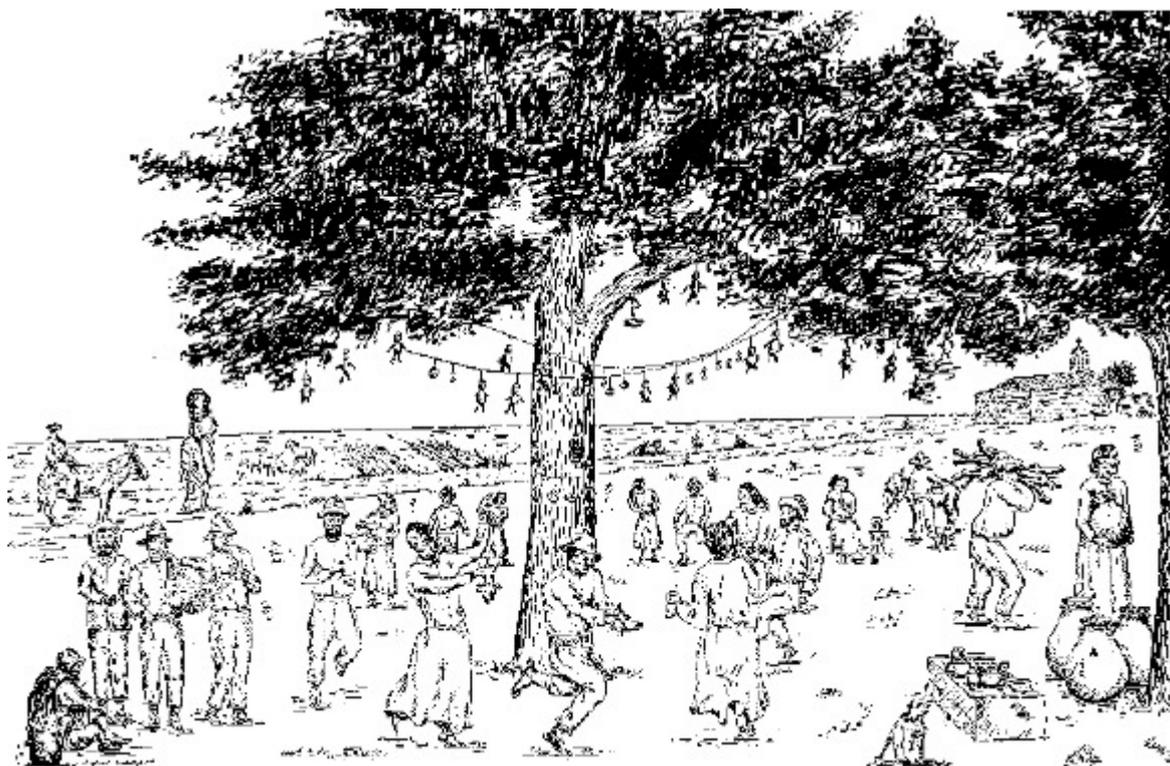


Figura 4.99. Danza de El Chiquí.

La fiesta de El Chiquí era costumbre en el sector árido montañoso de La Rioja y Catamarca, aunque una carta del Gobernador de Tucumán Alonso de Rivera informándole al rey los problemas causados por los indios en la fiesta, dan la pauta que también se realizaba en la zona de Santiago del Estero. La carta decía textual:

“... especialmente en tiempo del algarroba que son los meses de Diciembre, Enero y Febrero, [cuando es] la fuerza de ella y cuando ellos la cogen y hacen sus borracheras en las cuales se hieren y matan y hacen mil estragos y ofensas de Dios sin perdonar parientes aunque sean muy cercanos y todo esto con tanto exceso que en esta ciudad [Santiago del Estero] donde estoy yo y mi teniente y dos alcaldes ordinarios y el alguacil mayor y menor y otros ministros de justicia y sus propios encomenderos que todos procuramos quitar los desórdenes que digo y las borracheras de donde proceden quitándoles el agua y quebrándoles la vasija en que la hacen [la aloja] y prendiendo y castigando a muchos de los que se hallan

culpados y todos no somos parte a que no se maten ni descalabren ni hagan los demás desórdenes que arriba digo, por esto podrá vuestra Majestad juzgar lo que pasará en los pueblos donde no hay españoles ni ningún ministro de justicia que se lo estorbe.”

El Chiqui era definido como la fortuna adversa, lo que relacionó el dato con la fiesta y la vidala Lafone Quevedo (1888), en el relato de Peralta se notaba que el ritual se realizaba con un fin sagrado, en cambio en el relato de Cativa en 1938 desaparece el aspecto sagrado y se ofrece como un divertimento subsistiendo la formalidad de la fiesta pero no lo tradicional. La fiesta se realizaba en pleno verano a la sombra del algarrobo y bebiendo aloja. En La Rioja y Catamarca los cultivos de maíz con déficits hídricos en la época estival presentan senescencia temprana, debido a eso la rogativa de los pobladores por el agua, la preocupación de los aborígenes para abordar el tema de la fiesta estaba relacionada con sucesos que no podían controlar con su tecnología, sino que debían pactar con quienes los provocaban para que no los dañen ni vientos, lluvias, terremotos, etc.; las señales que usaban para predecir esta clase de acontecimientos eran ciertas constelaciones, cometas, comportamientos anormales en animales, entre otros (Gentile, 2001).

Si bien la bebida no se puede conservar mucho tiempo y se prepara para el “momento de consumo”, la Aloja se vendía como bebida refrescante y hasta los 1960s era común su venta en “quioscos” (despachos callejeros) especiales ubicados en las plazas de ciudades como San Miguel de Tucumán. Recientemente han surgido algunos intentos de recuperar la venta callejera de esta bebida tradicional como lo atestigua la siguiente entrevista realizada por el diario La Gaceta de Tucumán:

“Muchos turistas te preguntan qué es lo propio de acá y yo le ofrezco achilata o aloja. Es muy parecida a la sidra, a la gente le encanta”, asegura el vendedor Pedro Gómez, quien aprendió la receta hace unos 30 años. “Me la enseñó un hombre que me vendió un triciclo en el que yo salía a vender. Se pone la vaina de algarroba blanca en agua y se deja fermentar una semana en tachos de plástico o en tinas de barro cocido. Después se le agrega azúcar quemada, que es lo que le da el color marroncito y se cuele. También se le agregan unos granitos de maíz, pero eso ya son toques especiales de cada uno”, apunta el vendedor instalado y recuerda que la chicha, típica de Santiago del Estero, es como la aloja pero de maíz, y que no es cierto aquello de que para que fermente se mastican los granos y se los escupe en un fuentón. Gómez, quien hace traer

la algarroba de Termas, no puede asegurar si la aloja tiene o no alcohol como producto de la fermentación [sic]. “La Aloja se servía en jarras pero ahora viene en botellas descartables de gaseosa. Para limpiarlas las pongo en fuentes con agua y lavandina” [sic], asegura el vendedor. <http://www.lagaceta.com.ar/nota/473726/tucumanos/aloja-intenta-volver-instalarse-ciudad.html>

1.2 Elaboración de la Aloja

Las recetas para preparar Aloja se han ido transmitiendo en forma oral a través de las generaciones y por lo tanto difieren entre elaboradores ya que es una práctica realizada de forma casera y dependiente también de la región en donde se elabora. Los azúcares de la algarroba son directamente fermentables (principalmente sacarosa) y por lo tanto no necesitan de un proceso de sacarificación como ocurre con las bebidas obtenidas de sustratos amiláceos como la Chicha (proveniente de la fermentación del maíz) (Elizaquível y col., 2015). Por esta razón el proceso de preparación de Aloja es bastante simple de llevar a cabo lo que queda evidenciado en las recetas reportadas en la literatura y la que transmiten los elaboradores familiares, algunas de las cuales se describen a continuación.

Caso I (<http://www.oni.escuelas.edu.ar/olimpi98/Algarrobo/p151at.htm>)

- *Moler el fruto del algarrobo blanco en mortero de madera*
- *Agregarle agua y azúcar*
- *Colocar la mezcla en un recipiente tapado y guardarla en lugar fresco, seco y oscuro*
- *Dejarla unos días para que fermente*
- *Luego de unos días, sacar la mezcla y colarla en un paño*
- *Colocar el líquido en un recipiente y beberlo como bebida alcohólica*

Caso II (Chicha y Aloja. <http://www.revisionistas.com.ar/?p=12526>)

“La aloja se prepara con las vainas de algarrobo. Es preferible las rubias aunque las negras son más fuertes y más amargas. Cerca de diciembre, se recogen las vainas de algarrobo. Se las pone en un mortero y las machacas hasta que quede polvo. Luego se pone a fermentar con agua en un noque, (que es una vasija de cuero) o en una batea de yuchán. Lo ideal es ponerlo en una batea de algarrobo forrada con cuero. A los pocos días, dependiendo del calor, que es lo que logra el punto justo de fermentación, se sacan

los restos de vainas que quedan y se le agregan más algarroba machacada para que siga la fermentación. A los 3 días ya estará lista y en su punto justo. Para consumirla, se cuele con un lienzo, se le agrega azúcar a gusto (preferentemente azúcar marrón), y se bebe bien fría. Como no se conserva mucho tiempo, se aconseja tomarla toda (...)

Caso III (Entrevistas a elaboradores caseros de Santiago del Estero)

Rosendo Padilla

Esta actividad la desarrollaba hace diez años, hoy ya no la realiza. Se molía la algarroba recién cosechada en mortero con cuatro partes de agua dejando fermentar un día. Al segundo día se sacaba la parte sólida y se le agregaba igual cantidad de algarroba recién molida. Dejaba fermentar por dos días más. Se filtraba y guardaba en lugar fresco (tinaja) por una semana. El sabor es parecido a la sidra dulce y poco acida.

María José Jiménez

Molía algarroba y ponía con 8 partes de agua a fermentar en el sol por un día, no lo mezclaba, lo hacía a la mañana temprano y a la tarde tipo 20 horas lo filtraba con un lienzo y guardaba en damajuana de vidrio en lugar fresco por 3 días. En la actualidad no realiza la actividad, el sabor que lograba era un poco ácido.

Coman Nora Roxana

Seleccionaba las vainas, lavaba la algarroba, la picaba a mano dejándola en remojo en agua. El agua debía sobrepasar lo sólido en unos centímetros (1 dedo), se dejaba al sol 4 días y se la movía una vez por día. Se le incorporaba un poquito de azúcar para contrarrestar la acidez. El filtrado se realizaba con tela de lienzo y se envasaba en botellas de vidrio. Se la conservaba en lugar fresco y oscuro de diciembre a mayo. Obtenía un producto sensorialmente aceptable de color amarillo sabor dulce y un poco ácido.

La producción de la Aloja es por fermentación espontánea llevada a cabo por la gente en sus casas utilizando utensilios rudimentarios bajo variadas condiciones higiénicas. De acuerdo a los comentarios de elaboradores artesanales la molienda húmeda es muy importante para una eficiente extracción de los componentes de las vainas, la que se logra mezclando las vainas con una determinada cantidad de agua. En todos los casos

la molienda se ve facilitada por el uso de un mortero fabricado con el mismo tronco de Algarrobo.

1.3 Antecedentes del tema

Desde el punto de vista científico, esta bebida no ha sido estudiada hasta el momento, por lo que no se encuentra información al respecto. Sin embargo se han realizado fermentaciones con otras especies del género *Prosopis* spp., por ejemplo para obtener un saborizante denominado *Okpebe* a partir de semillas hervidas de *Prosopis africana* y posteriormente sometidas a un proceso de fermentación envueltas en hoja de plátano durante 96 horas entre 28-30°C. El producto fermentado se moldea en pequeñas pelotas y se las deja secar al sol, una vez secas se las tritura y envasa. Las bacterias mayoritarias encontradas son bacterias esporulantes del género *Bacillus*, pero también se encontró *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Achi, 1992, Ogunshe y col., 2007, Odibo y col., 2008). Spencer y col. (1995) realizaron un estudio sobre la población de levaduras presentes en las vainas y exudados de los algarrobos situados en 9 sitios distribuidos en el Chaco, Valle de Cafayate y Cachi. En las vainas encontraron el predominio de 3 levaduras: *Cryptococcus* spp., *Candida famata*, y *Candida cijferrii*.

2 Objetivo y desarrollo general del trabajo

El objetivo de este trabajo fue la caracterización del proceso de elaboración de la Aloja. Debido a las diferentes “recetas” encontradas en bibliografía y a la posibilidad de contactarse con elaboradores familiares residentes en la ciudad de Santiago del Estero, se les realizó una entrevista y se llevó a cabo una primera elaboración casera para conocer el “saber hacer” de la Aloja. A partir de esa primera experiencia se diseñó un proceso típico que se llevó a cabo en el laboratorio durante dos años consecutivos con materia prima recolectada de la zona.

3 Materiales y Métodos

3.1 Materia prima y elaboración de Aloja

Se llevaron a cabo diferentes fermentaciones de la algarroba con vainas recolectadas en 3 años consecutivos. Para conocer el proceso de la Aloja se realizó un viaje a la capital de Santiago del Estero (27°47'42"S, 64°16'1"W), para una entrevista con Nancy Campos, una elaboradora artesanal de productos derivados de la vaina de la algarroba (*Prosopis alba*), quien nos enseñó la técnica de elaboración de la bebida. El trabajo en grandes rasgos constó de la molienda de las vainas en mortero de madera, posterior fermentación y luego filtrado. El ensayo se realizó entre los días 19 y 22 de diciembre del año 2011, a la que luego siguieron trabajos en laboratorio con la posterior estandarización de la elaboración de la bebida. En Santiago del Estero contamos con el apoyo de la Facultad de Agronomía de la UNSE para el análisis de las muestras. Las restantes fermentaciones se efectuaron en el CINDEFI durante los años 2013 y 2014 mediante un proceso estándar adoptado del primer ensayo y con la materia prima recolectada de diferentes zonas de la ciudad de Santiago del Estero en diciembre del 2012 y 2013 respectivamente. Las vainas de algarroba se enviaron al laboratorio en bolsas protegidas del aire y se conservaron en cámara a 20°C. Para las fermentaciones realizadas en el laboratorio se compró un mortero de madera de algarrobo típico de la región. A continuación se detallan el origen de las vainas, el tiempo de almacenamiento y las fermentaciones realizadas (Tabla 4.39).

3.2 Análisis microbiológicos y físicoquímicos

3.2.1 Composición de la materia prima

El análisis de composición de las vainas comprendió la determinación de humedad, proteínas, lípidos, cenizas, sacarosa, glucosa, fructosa. Las técnicas de análisis de composición de vainas y harinas se explicaron previamente en detalle en el Capítulo I.

La composición de las vainas utilizadas en los diferentes ensayos se indican en la Tabla 4.40.

Para las fermentaciones de laboratorio se empleó agua de pozo proveniente del Acuífero Puelche, de la zona de Arana, Partido de La Plata. (Tabla 4.41 y Tabla 4.42).

Tabla 4.39. Condiciones de recolección y almacenamiento de vainas y de elaboración de la bebida.

Fecha de recolección de las vainas	Lote	Elaboración de Aloja	Tiempo de almacenamiento	Proceso
Diciembre 2011	Santiago del Estero (27°47'4"S 64°16'1"O)	Diciembre 2011	-	I (elaboradora)
Diciembre 2012	1. Silípica (28°02'42"S 64°13'26"O)	Marzo 2013	3 meses	II
	2. Árraga (28°03'04"S 64°13'26"O)			
	3. Loreto (28°18'8"S 64°10'47"O)			
Diciembre 2013	Santiago del Estero (27°47'4"S 64°16'1"O)	Febrero 2014	2 meses	III
		Abril 2014	4 meses	IV

Tabla 4.40. Composición de la materia prima para cada ensayo de elaboración de aloja.

	Ensayo I Rec. Dic 2011	Ensayo II Rec. Dic 2012			Ensayo III-IV Rec. Dic 2013
Componentes (% base húmeda)					
	Lote 2011 (VA11S)	Lote 1 (VA12S)	Lote 2 (VA12A)	Lote 3 (VA12L)	Lote 2014 (VA13S)
Humedad	3,98	7,23	8,16	8,12	3,54
Componentes (% base seca)					
Azúcares totales	41,48	37,00	46,31	43,36	52,0
Fibra dietaria	36,24	37,11	26,92	28,74	26,7
Proteínas	9,26	13,17	8,73	7,98	8,52
Cenizas	3,09	3,12	2,99	2,94	2,58
Lípidos	1,52	1,53	0,68	0,82	1,29

Rec: Año de recolección.

Tabla 4.41. Análisis fisicoquímico del agua.

	Resultados	Limite tolerable	Unidad
pH	7,3	6,5 – 8,5	U de pH
Conductividad	801	-	µmhos/cm
Dureza	51	400	mg de CaCO ₃ /L
Alcalinidad Total	367	-	mg de CaCO ₃ /L
Cloruros	22	350	mg/L
Sulfatos	3	500	mg/L
Nitratos	70,0	45	mg/L
Nitritos	<0,005	0,1	mg/L
Fluoruros	0.86	2,0	mg/L
Arsénico	0,004	0,01	mg/L
Amonio	<0,1	0,2	mg/L
Solidos Totales	600	1500	mg/L

Tabla 4.42. Análisis microbiológico del agua.

Microorganismos	Resultados	Limite tolerable
Heterótrofas totales	50 UFC/mL	Menos de 300 UFC por mL
Coliformes totales	Menos 3 NMP/100mL	Menos de tres NMP por 100 mL
Coliformes fecales	Ausente	ausente en 100mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	ausente en 100mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	ausente en 100 mL

3.2.2 Muestreo y análisis microbiológico

Para el análisis químico y microbiológico se tomaron tres muestras sucesivas del medio de fermentación de diferentes partes del recipiente, se filtraron con un colador para separar las partes sólidas y el líquido obtenido fue recolectado en un envase limpio para su análisis. Para los recuentos microbianos se realizaron diluciones seriadas al 1/10 con solución de peptona (1 g/l). La dilución inicial se realizó con 10 mL de muestra en 90 mL de diluyente, la cual se agitó 20 min en shaker. Se plaquearon en todos los casos 0,1 mL en superficie.

La composición de los medios de cultivo para el aislamiento de los microorganismos y su preparación se describen en el Anexo Capítulo IV.

3.2.2.1 ***Recuento de mesófilas totales (RMT)***

Se empleó el medio PCA (Plate Count Agar).

3.2.2.2 ***Recuento de levaduras (RL)***

Para el aislamiento y enumeración de levaduras se utilizó el medio WL (Wallerstein Laboratories). En este medio las colonias pueden presentar diferentes morfologías que facilitan su identificación (Pallmann y col., 2001). El medio contiene como indicador de pH verde de bromocresol que permite una identificación rápida de aquellas colonias productoras de ácido (Fugelsang y Edwards, 2007). Al medio WL se agregó 100 mg/l de cloranfenicol que es un antibiótico de amplio espectro para inhibir el crecimiento bacteriano. El stock de cloranfenicol se preparó concentrado en etanol y se agregó al medio antes de autoclavar. Para diferenciar levaduras *Saccharomyces* spp. de no-*Saccharomyces* spp. se empleó el medio Lisina en el cual no crecen *Saccharomyces* spp. ya que esta especie no puede utilizar lisina como única fuente de N (Fowell, 1965).

3.2.2.3 ***Recuento de bacterias lácticas (RBAL)***

Para el recuento de bacterias lácticas se utilizó el medio M.R.S que es un medio apropiado para el recuento y aislamiento de lactobacilos a partir de muestras de alimentos (De Man y col., 1960). Al medio se lo suplementó con 20 % (v/v) de jugo de tomate y 40 mg/L de cicloheximida para inhibir levaduras y hongos filamentosos. El stock de cicloheximida se preparó en etanol y se agregó al medio luego del autoclavado. Para el cultivo anaeróbico las placas se incubaron en Jarra Anaeróbica Oxoid. (Oxoid Limited, Inglaterra)

3.2.2.4 ***Recuento de enterobacterias (REB), coliformes y estafilococos***

Para el recuento de enterobacterias se utilizó el medio Mac Conkey (Apás y col., 2008), que se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Otro medio utilizado fue el VRBA (Violeta Rojo Bilis Agar) que se utiliza para la investigación presuntiva y recuento de coliformes en alimentos y productos lácteos y por último se utilizó el MSA (Manitol Salado Agar) para el

aislamiento diferencial de estafilococos. Todos los medios utilizados fueron marca Britania (Britania, Buenos Aires, Argentina)

3.2.3 Conservación de cepas

Las colonias de bacterias y levaduras provenientes del aislamiento inicial se purificaron mediante dos pasajes en medio WL (levaduras), MRS (BAL) y Luria Bertani (EB). El protocolo de crio-conservación de levaduras y bacterias se muestra en las Figura 4.100 y Figura 4.101.

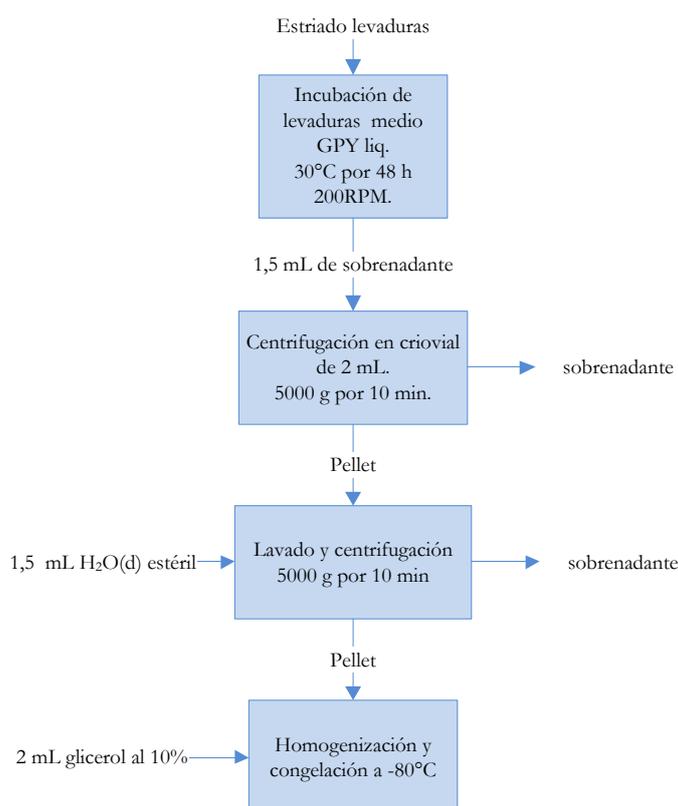


Figura 4.100. Crioconservación de levaduras.

3.2.4 Observación de microorganismos y pruebas bioquímicas

Se realizaron observaciones microscópicas directas de las bacterias y de las levaduras al microscopio óptico utilizando objetivos de contraste de fase con un aumento de 500X para levaduras y 1250X para bacterias lácticas. Alternativamente se empleó campo claro para la tinción de Gram.

Las bacterias aisladas de los distintos medios (MRS, Mc Conkey, PCA) fueron caracterizadas mediante la tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa (Olmos y col., 2010).

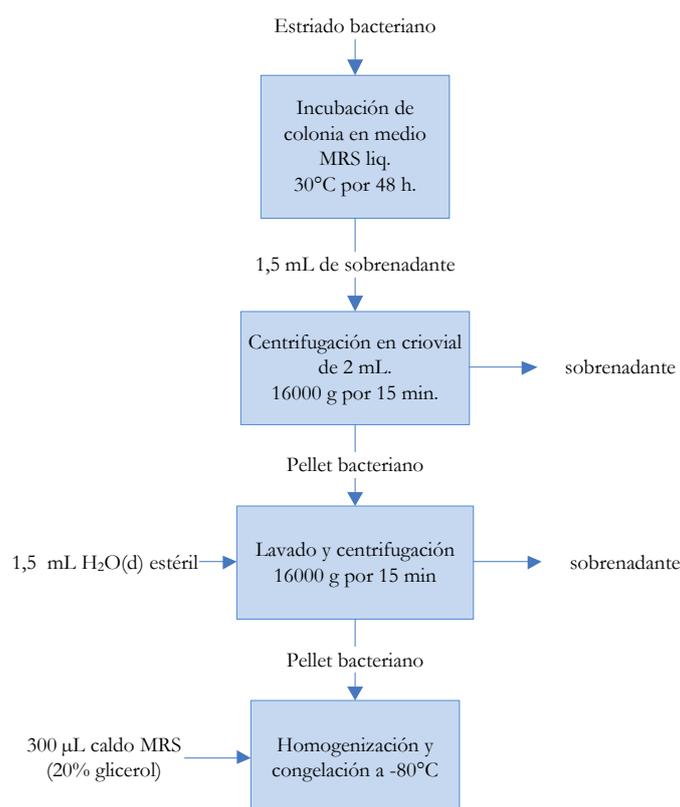


Figura 4.101. Crioconservación de bacterias.

3.2.5 Test en placas para la determinación del potencial enzimático de las levaduras

El potencial de producir poligalacturonasa, amilasa, celulasa y xilanas, se evaluó mediante tests en placas empleando una modificación de la técnica descrita por McKay (McKay, 1988). Los tests en placa para amilasa, celulasa y xilanas fueron equivalentes a los empleados para la PGasa pero reemplazando el ácido poligalacturónico por almidón soluble, carboximetilcelulosa y xilano, respectivamente. Para los tests las cepas se cultivaron a 30°C, en aerobiosis y agitación en shaker (180 rpm) toda la noche en medio de Wickerham (15 mL). El cultivo se observó al microscopio para corroborar la ausencia de contaminaciones y para realizar un recuento aproximado. Se diluyó a 10^6 células /mL con agua estéril sembrándose 5 µl en las placas divididas en triángulos (una gota en el centro de cada triángulo). Las placas se incubaron 3 días a 30 °C. Las células se lavaron de las placas con agua desionizada, luego de lo cual el medio se cubrió con solución reveladora: para PGA, HCl 6 M, el polímero sin degradar precipita en medio fuertemente ácido, por lo que la formación de un halo claro es indicativo de actividad enzimática

extracelular. Para los otros tests, los reveladores empleados fueron: amilasa y celulasa: lugol y xilanasas soluciones de Rojo Congo al 1% (tinción) y NaCl (decoloración). (Kasana y col., 2008).

Las placas se prepararon con 1,25 % de ácido poligalacturónico, 0,68 % de fosfato de potasio, pH 3,5, 1% de glucosa, 0,5 % extracto de levadura, 0,2 % peptona bacteriológica, 2,5 % de agar y cloranfenicol 50 mg/L. El medio se preparó en dos fracciones, el polímero por un lado y el resto de los componentes. A cada una de ellas se le ajustó el pH a 3,5 con HCl 1,0 N y se esterilizaron por separado 10 minutos a 121 °C. Se dejaron enfriar a 45°C, se mezclaron y se plaqueó aproximadamente 10-15 mL por placa.

Fracción A: Ácido poligalacturónico, carboximetilcelulosa, xilano u almidón, 0,625 g; agua destilada 25 mL.

Fracción B: Fosfato monopotásico 0,35g; Glucosa 0,5g, Extracto de levadura 0,05 g, Peptona bacteriológica 0,10g, Agar 1,25g, Cloranfenicol 25 µl de stock 1% en etanol, agua destilada 25 mL.

3.2.6 Identificación molecular de los aislamientos

3.2.6.1 Bacterias

Para las bacterias lácticas presuntivas, crecimiento en agar MRS, bacilos o cocos Gram positivos, catalasa negativos y productores de ácido láctico se confirmó su identidad mediante el análisis molecular. El método más utilizado para identificación de bacterias en la actualidad es la amplificación del gen *rrs* también denominado ADN ribosomal 16S, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Gray y col., 1984, Renvoisé y col., 2013, Rodicio y Mendoza, 2015).

3.2.6.1.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN bacteriano se realizó utilizando el kit Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit de GE Healthcare (Little Chalfont, Inglaterra) siguiendo el protocolo del fabricante para extracción de ADN de bacterias Gram positivas (Figura 4.102). Este método consta de sucesivos pasos de lisis enzimática, siendo la primer lisis llevada a cabo por la lisozima que cataliza la hidrólisis de los enlaces β 1-4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina de los peptidoglicanos de

pared, seguido de la proteinasa K para digerir las proteínas y eliminar la suciedad de las preparaciones de ácido nucleico, inactiva rápidamente las nucleasas que de otro modo podrían degradar el ADN durante la purificación. El agregado de RNasa como último paso es para obtener ADN libre de ARN, una vez que actúan todas las enzimas la muestra se pasa a una columna de separación en donde se siguen sucesivos pasos de lavados y descarte. Como último paso se eluye la muestra con un buffer de lavado en caliente. Una vez obtenido el ADN genómico se realizó un gel de agarosa (ver protocolo en Anexo Capítulo IV) para confirmar la integridad del mismo y se cuantificó la cantidad de ADN extraído mediante NanoDrop®. Con este equipo se cuantificó la concentración aproximada del ADN extraído y su grado de pureza, mediante la relación A_{260}/A_{280} ; si esa relación es mayor o igual a 2, la muestra se considera pura, relaciones menores que 2 indican como resultado que las muestras pueden llegar a estar contaminadas con proteínas. La muestra se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.2.6.1.2 Amplificación por PCR

Se amplificó la región del genoma que codifica para el ARNr 16S, utilizando los primers 27F y 1492R (Invitrogen, Estados Unidos) (ver Anexo Capítulo IV), siguiendo la técnica descrita por (Edwards y col., 1989). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 μL (ver Anexo Capítulo IV). Las condiciones de reacción se muestran en la

Tabla 4.43. La reacción se llevó a cabo en un termociclador MyCycler de BioRad®. Para comprobar la integridad del producto obtenido y si se corresponde con los pares de bases específicos se ensayó en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 4.43 Condiciones de ciclado para amplificación de ADN bacteriano.

Ciclos	Fase	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	94°C	4 minutos
35	Desnaturalización	94°C	30 segundos
	Hibridación	$58,6^{\circ}\text{C}$	40 segundos
	Extensión	72°C	60 segundos
1	Extensión final	72°C	7 minutos

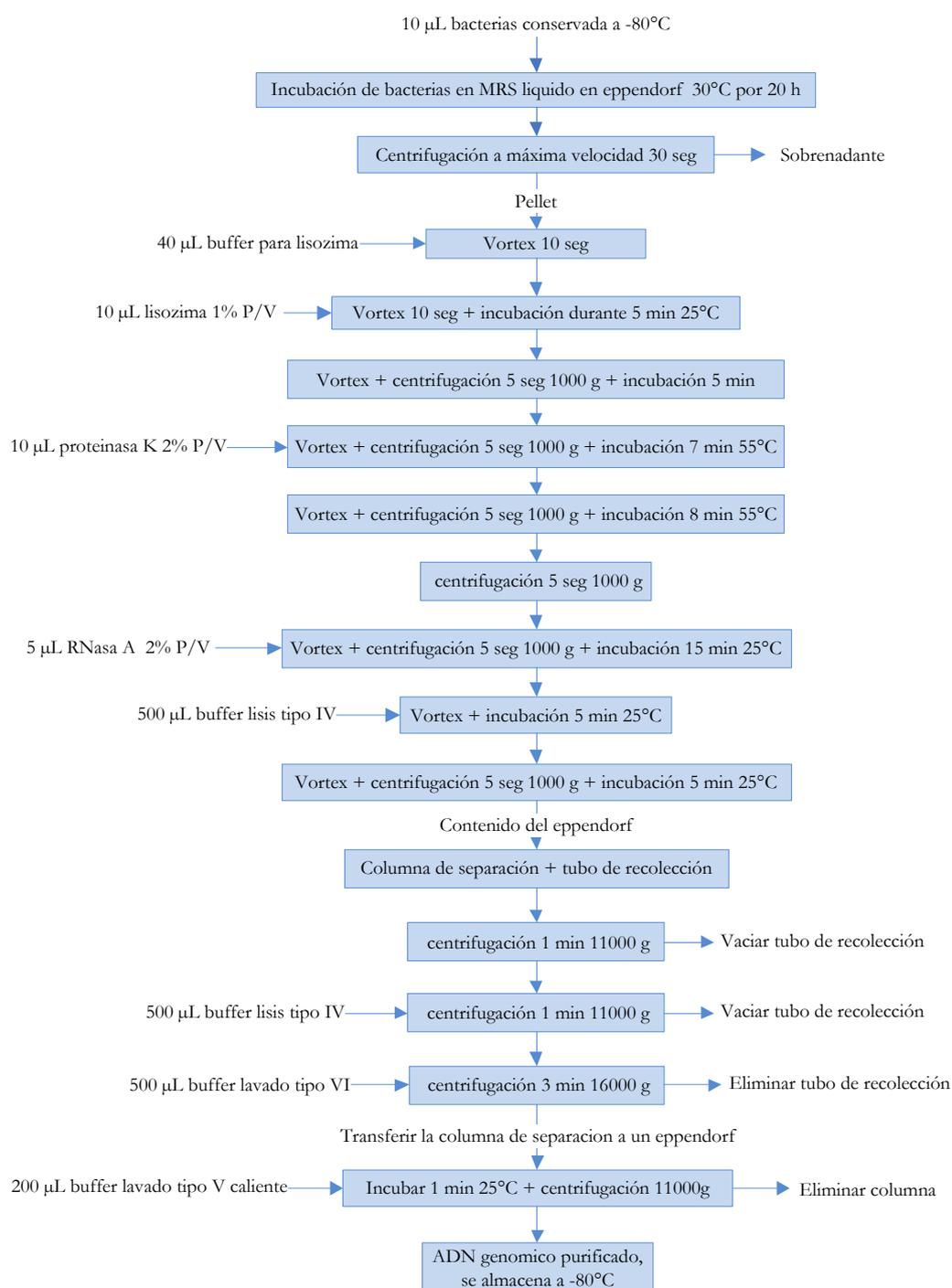


Figura 4.102. Protocolo de extracción de ADN de bacterias Gram +.

3.2.6.1.3 Secuenciación del producto de PCR

El producto de amplificación de cada bacteria fue enviado para su purificación y secuenciación a Macrogen (Corea), de acuerdo a procedimientos estandarizados y utilizando un equipo ABI3730XL (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

Cada muestra fue secuenciada dos veces, la primera con el primer 27F y la segunda con el primer 1492R; se realizó de esa forma ya que los extremos 3' de las lecturas de los instrumentos de secuenciación son de muy baja calidad, obteniéndose de esta forma dos secuencias. Obtenidas las dos secuencias y mediante un software llamado GAP 4 del paquete Standen Package, se obtuvo la secuencia consenso (secuencia obtenida a partir de las dos secuencias). Para el análisis de identificación taxonómica de las bacterias se utilizó el algoritmo de alineamientos locales BLAST sobre las bases de datos nucleotídicas no redundantes para seleccionar las secuencias homólogas más cercanas a la secuencia consenso creada con el Gap4. Se escogió la secuencia con mayor score, cobertura y porcentaje de identidad, y con el E-value más cercano a cero para asignar el género y la especie a la bacteria.

3.2.6.2 *Levaduras*

Para la identificación de levaduras se empleó el secuenciamiento de la región D1/D2 del 28S ADNr. En las levaduras el ADNr tiene su secuencia repetida entre 150 y 200 veces ocupando esta repetición el 60% del cromosoma XII. En las levaduras cada repetición tiene cuatro genes que codifican para el ARNr: la subunidad larga también conocida como ARNr 26S, la subunidad pequeña ARNr 18S y las subunidades 5,8S y 5S. Entre las secuencias conservadas de esta región se encuentran regiones variables como los espaciadores transcritos internos (ITS 1 y 2), dos transcriptores espaciadores externos (ETS 1 y 2) y dos espaciadores intergénicos (IGS 1 y 2); estas son regiones no codificantes pero que se transcriben y separan las subunidades codificantes. Gran cantidad de estudios han demostrado que la mayoría de las levaduras pueden ser secuenciadas amplificando el dominio D1/D2 de 600 pb (pares de bases) de la subunidad de ARNr 26S. La representación de la secuencia ADNr con sus genes codificantes para ARNr y el dominio D1/D2 se muestra en la Figura 4.103 (Kurtzman y Robnett, 1998, James y col., 2009). La Figura 4.103 muestra los diferentes componentes que constituyen cada unidad de ADN ribosomal. Los cuatro genes se encuentran en el genoma creando un paquete (un *repeat*) de unas 9 kb (millares de pares de bases), esta subunidad básica se encuentra repetida entre 50 y 200 veces u está contenida en el locus RDN1 (1-2 Mb) en el cromosoma XII. **5S**: gen del RNA ribosomal 5S; **28S**: gen del RNA ribosomal 28S,

ITS2: internal transcribed spacer 2; **5.8S**: gen del RNA ribosomal 5.8S; **ITS1**: internal transcribed spacer 1; **18S**: gen del RNA ribosomal 18S.

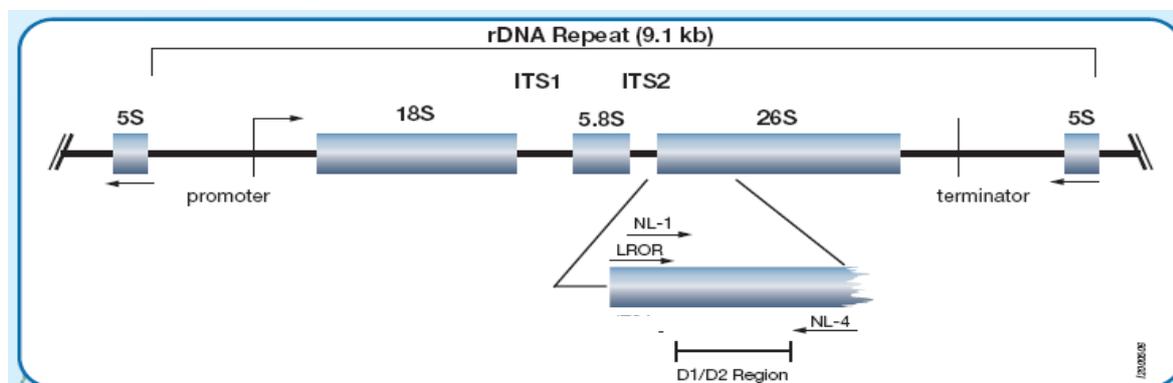


Figura 4.103. Representación de la secuencia ADN_r con sus genes codificantes para ARN_r y el dominio D1/D2.

3.2.6.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de levaduras se utilizó el método descrito por Kurtzman y Robnett (1998) con modificaciones. Las levaduras crecieron en 10 mL de medio de Wickerham (ver Anexo Capítulo IV) en aerobiosis durante 20 horas con agitación a 200 rpm a 30°C (Figura 4.104).

El paso en el que se hizo la cosecha de levaduras se realizó dos veces para tener un mayor número de levaduras y así lograr mayor extracción de ADN. Se utilizó un buffer de lisis (Ver Anexo Capítulo IV) para romper las células y una solución desnaturalizante compuesta por fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1 para la extracción de lípidos, proteínas y componentes celulares por desnaturalización y solubilización. Una vez obtenido el ADN genómico se realizó un gel de agarosa (ver protocolo Anexo Capítulo IV) para confirmar la integridad del mismo y se cuantificó la cantidad de ADN extraído mediante NanoDrop®, equipo con el cual se cuantificó la concentración aproximada del ADN extraído y su grado de pureza mediante la relación A_{260}/A_{280} . Si esta relación es mayor o igual a 2 la muestra se considera pura, relaciones menores que 2 indican como resultado que las muestras pueden llegar a estar contaminadas con proteínas. Ya comprobada la integridad y cantidad de ADN, se realizó una dilución de trabajo en agua bidestilada 1/10 y la solución se almacenó a -18°C, la solución de ADN concentrado se almacenó a -80°C. Las colonias utilizadas para realizar

la determinación molecular fueron la denominada irregular que aparece hasta las 24 horas de fermentación y la crema que aparece desde el principio de la fermentación hasta el fin de la misma (ver Resultados y Discusión).

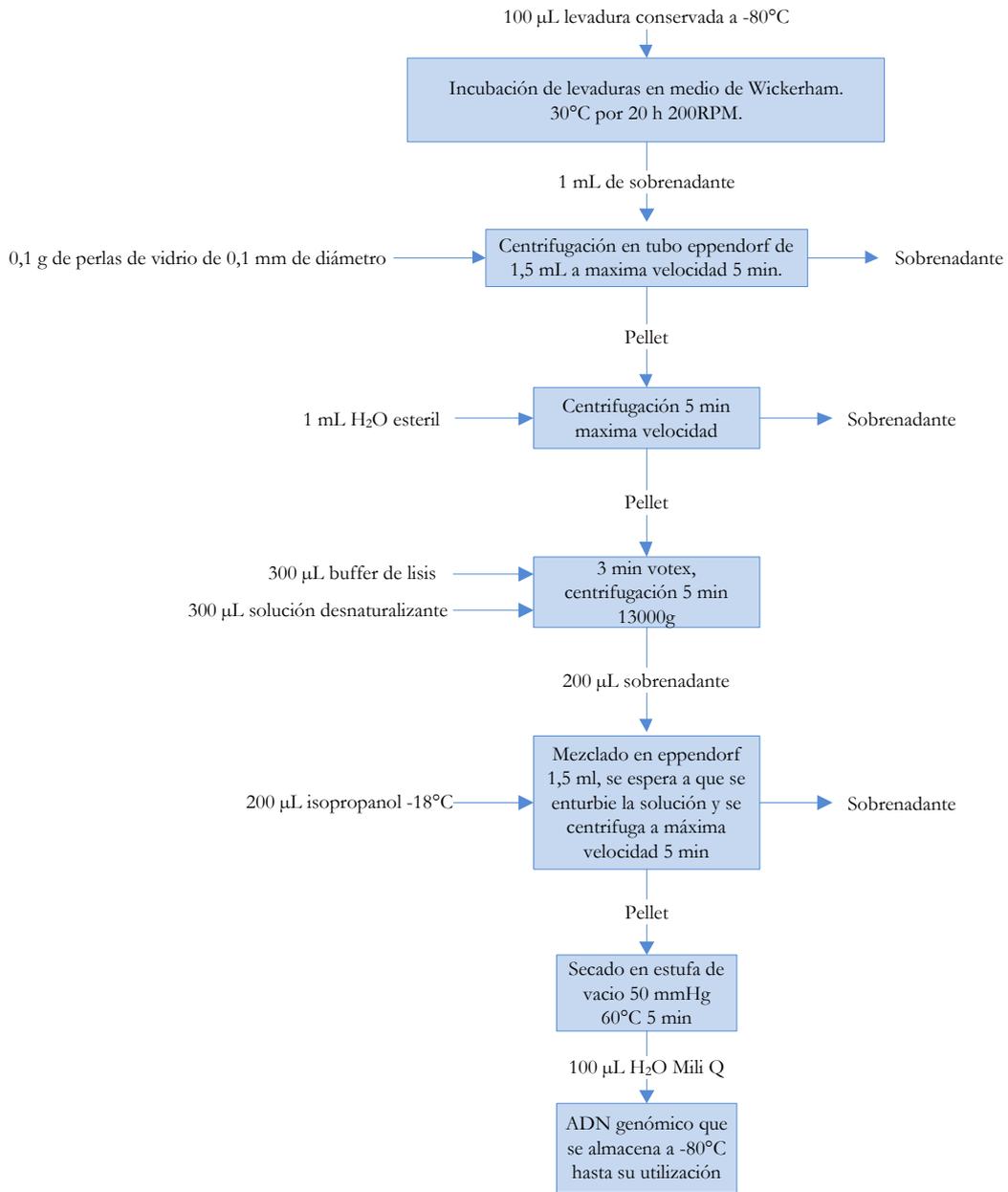


Figura 4.104. Protocolo de extracción de ADN genómico de levaduras.

3.2.6.2.2 Amplificación por PCR de la región D1/D2

Se siguió el protocolo propuesto por (Kurtzman y Robnett, 1998) con modificaciones, se emplearon los “primers” NL1 y NL4 (ver Anexo Capítulo IV) para amplificar parte del ARNr 26S, específicamente el dominio D1/D2. La mezcla de reacción se preparó en un Eppendorf de 100µL para un volumen final de 50µL (ver Anexo Capítulo IV). Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 4.44. La temperatura óptima de hibridación se determinó con un termociclador MyCycler BioRad®, el que permitió utilizar ocho diferentes temperaturas de hibridación entre los 60°C y los 53°C, dando como resultado una temperatura óptima de hibridación de 58,6°C, lo que se comprobó realizando un gel de agarosa al 1% y visualmente comprobando con que temperatura se correlacionaba la banda más nítida y de mayor grosor, lo que demuestra gran cantidad de ADN amplificado. Una vez obtenida la temperatura óptima se realizó el mismo protocolo con la temperatura determinada anteriormente pero para las muestras incógnita. Las PCR de las levaduras se llevaron a cabo en un termociclador MRC PCR-300. Una vez terminada la PCR también se comprobó la integridad del ADN amplificado en un gel de agarosa al 1%. El ADN amplificado se guardó a -18°C hasta su envío a secuenciar.

Tabla 4.44. Condiciones de reacción de PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	4 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	35
Hibridación	58,6°C	40 segundos	
Extensión	72°C	60 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

3.2.6.2.3 Secuenciación de la región D1/D2

El producto de amplificación de cada levadura fue enviado para su purificación y secuenciación a Macrogen (Corea), de acuerdo a procedimientos estandarizados utilizando un equipo ABI3730XL (AppliedBiosystems, California, Estados Unidos). Cada

muestra fue secuenciada dos veces, la primera con el primer NL1 y la segunda con el primer NL4. Se realizó de esa forma ya que los extremos 3' de las lecturas de los instrumentos de secuenciación son de muy baja calidad, obteniéndose de esta forma dos secuencias para cada una de las levaduras. Para el análisis de identificación taxonómica de las levaduras se utilizó el algoritmo de alineamientos locales BLAST sobre las bases de datos nucleotídicas no redundantes para seleccionar las secuencias homólogas más cercanas a la secuencia consenso creada con el Gap4. Se escogió la secuencia con mayor score, cobertura y porcentaje de identidad, y con el E-value más cercano a cero para asignar el género y la especie a la levadura.

3.3 Análisis fisicoquímicos de la bebida

Las muestras para análisis fueron tomadas a diferentes tiempos de fermentación. Dependiendo el tiempo de fermentación se tomaron volúmenes de 10 o 150 mL. Los sólidos en suspensión se removieron mediante centrifugación (15 minutos a 7000 g) y en general se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis. El pH y la temperatura se midieron dentro del recipiente de fermentación.

3.3.1 pH y acidez

El pH y la acidez total de las muestras se midió por potenciometría. Para la acidez total se colocaron en un vaso de precipitado de 100 mL, 10mL de muestra y 30 mL de agua destilada, se agitó y se llevó la muestra hasta pH 8,2 con NaOH 0,1N (ver Anexo Capítulo IV). Los resultados se expresaron como g ácido láctico %, ya que el ácido láctico es la especie predominante en la fermentación.

3.3.2 Cromatografía de ácidos orgánicos en capa delgada

La cromatografía en capa delgada (TLC) se utilizó para confirmar la presencia de ácido láctico mediante la técnica descrita por Delanoe y col. (2003). En este caso se utiliza una fase móvil cuya mezcla de solventes se informa en el Anexo Capítulo IV, que tiene la ventaja de no necesitar un tratamiento posterior ya que contiene un indicador ácido-base para detectar los ácidos orgánicos, y una vez seco los resultados se pueden evaluar directamente. El solvente utilizado contiene el indicador de pH verde de bromocresol, que cambia de color desde el amarillo hasta el azul en el rango de pH 3,8–5,4 de manera que los ácidos aparecen como manchas amarillas sobre un fondo azul. Se

utilizaron placas de sílice clásicas TLC 60 Merck (Merck, Darmstadr, Alemania) sembrándose 30 μL de patrón de ácido láctico al 0,3% v/v y 15 μL de muestra. Las placas se llevaron a cuba cromatográfica hasta que el frente de corrida quedo a 1cm del final de la placa. Luego se secaron las placas con aire caliente, dejando a la vista manchas de color amarillo correspondientes al ácido orgánico sobre fondo azul.

3.3.3 Determinación de ácidos orgánicos por HPLC

Para la determinación de ácidos orgánicos por HPLC los sobrenadantes fueron filtrados a través de filtro de membrana de nylon de 0,44 μm previo a su inyección en el equipo. Se cuantificó ácido acético y ácido láctico utilizando patrones en un rango de concentración de 1 a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El HPLC estaba compuesto por una bomba binaria Waters 1525, un detector de fotodiodos en serie Waters 2998, un bucle de inyección de 20 μL . La columna utilizada fue Bio-Rad Aminex 87-H, como fase móvil se utilizó H_2SO_4 0,009N, la temperatura de la columna fue de 60°C y la longitud de onda del detector fue de 214 nm. Los análisis de los cromatogramas se realizaron con el software PeakFit v4.12.

3.3.4 Determinación de azúcares por HPLC

Los azúcares fueron analizados a los diferentes tiempos de fermentación mediante un equipo de HPLC (Waters modelo 996, Millipore Corp., Milford, MA, USA). Las muestras para determinar azúcares se centrifugaron en tubos tipo Falcon® de 15mL a temperatura ambiente durante 10 minutos a 7000g en centrifuga Eppendorf 5430 y luego se filtraron a través de membrana de nylon de 0,44 μm para que las muestras estuvieran en condiciones de ser inyectadas. La columna utilizada para la determinación fue una columna Varian C5 NH_2 (i.d. 4,6mm), 25 cm de largo, con un detector de índice de refracción. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo–agua 70:30 con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. Los estándares utilizados fueron de glucosa, fructosa y sacarosa (Sigma Aldrich), con una concentración máxima de 20 mg/mL de azúcar. Los cromatogramas fueron analizados por el software PeakFit v4.12 (Framingham, MA, USA).

3.3.5 Determinación contenido alcohólico

La determinación de alcohol en los destilados del medio se realizó por picnometría o con un alcoholímetro según OIV/OENO (OIV, 2009).

4 Resultados

4.1 Ensayo I. El “saber hacer” de la Aloja

La Aloja fue preparada en la Ciudad de Santiago del Estero, en la casa de la productora Nancy Campos. Para hacer la bebida se utilizaron vainas recogidas en el Parque Aguirre situado en la ciudad de Santiago del Estero, una vez realizado esto las vainas se extendieron sobre una mesa y se seleccionaron las mejores, el criterio de selección se basó en la sanidad de las vainas y la ausencia de orificios producidos por insectos. Se pesaron cuatro kilogramos de vainas y se las dividió en dos grupos de acuerdo al proceso que se iba a seguir para fermentar. Dos kilogramos de vaina, fueron lavados con agua potable y partidos en mitades, luego se empezó con la molienda húmeda en mortero de madera de algarrobo para la cual se agregó de forma secuencial las vainas limpias y luego el agua; todo el contenido del mortero se molió hasta obtener una pasta. La pasta obtenida se pasó a un recipiente de acero inoxidable al que se agregó cantidad suficiente de agua de lluvia para completar los cinco litros. A este proceso se lo denominó fermentador acero (FAc). El proceso descrito anteriormente se repitió con los otros dos kilogramos de vaina, cambiándose para el proceso el tipo de agua, utilizando para el segundo método agua de red de Santiago del Estero y un recipiente plástico para la fermentación, denominando a este proceso como fermentador plástico (FPlas). Los dos recipientes se dejaron tapados a la intemperie a temperatura ambiente. A las 24 h se agregaron dos litros más de agua y se continuó la fermentación. Luego de 48 h el medio se filtró por un lienzo para separar los sólidos del líquido. El filtrado obtenido es la “Aloja”. Las muestras para análisis fueron tomadas a tiempo cero, 12 h, 24 h antes y después del agregado de agua, 36 h y finalmente 44-48 h. Todos los procedimientos se efectuaron siguiendo la práctica real de la elaboradora, la cual implica el uso de las instalaciones domésticas, sin uso de guantes y la utilización de agua de lluvia de varios días. En la Figura 4.105 a la Figura 4.108 se pueden apreciar los procedimientos descritos, el “saber hacer” de la Aloja y las condiciones de trabajo totalmente rudimentarias.

Cabe destacar que en los días de elaboración el clima fue muy caluroso (media histórica 29-30°C), en la Tabla 4.45 se indican las temperaturas ambiente durante el proceso de elaboración.

Tabla 4.45. Temperatura de los días de estancia y temperaturas medias para el mes de diciembre.

Día	T°C Media	T°C Máxima	T°C Mínima
19	29,6	41,2	17,2
20	32,6	41,7	23,4
21	33,7	43,2	24,2
22	34,6	44,2	27,0

Media histórica Diciembre 29-30°C



Figura 4.105. La imagen de la izquierda muestra la recolección manual de las vainas de algarrobo y la de la derecha el proceso de selección de las vainas.



Figura 4.106. Imagen del mortero de algarrobo a la derecha, a la izquierda se puede apreciar cómo quedan las vainas luego de la molienda húmeda.



Figura 4.107. En la figura de la izquierda se puede apreciar como las vainas se pasan a baldes y se mezclan con agua para la fermentación. La figura de la izquierda muestra los dos baldes utilizados para fermentar, en la foto superior el balde de acero inoxidable y en la inferior el balde de plástico.



Figura 4.108. Ecurrido manual y posterior filtrado de la bebida.

4.2 Análisis de la fermentación

La fermentación de la algarroba es un proceso espontáneo que se inicia al ponerse en contacto la flora microbiana epifítica del fruto con agua. La molienda húmeda es indispensable para disgregar el tejido y facilitar la extracción de los componentes solubles, en particular el azúcar que es la fuente de carbono para los microorganismos, y también la dispersión de los microorganismos en el medio. El fenómeno más característico del proceso es la acidificación rápida del medio que se manifiesta en una disminución del pH

inicial de 6,0 a 4,5 luego de 12 h de fermentación. Esta situación es debida a la actividad de los microorganismos que da lugar a la formación de ácidos orgánicos. Dado que no se agregan compuestos que inhiban microorganismos indeseables, como es el metabisulfito de potasio en la vinificación o sal en la fermentación de vegetales, es evidente que la acidificación es la única barrera frente a patógenos en el proceso de la Aloja. En la Tabla 4.46 se muestra la evolución del pH y acidez total y en la Figura 4.109 se incluye la concentración de azúcares totales en los dos procesos (FAC y FPlas). Dentro del error experimental y teniendo en cuenta que no se efectuaron réplicas de cada condición de fermentación se puede concluir que ambas fermentaciones siguieron una cinética similar. La disminución del pH y el concomitante incremento de la acidez titulable continúan hasta las 36 h estabilizándose finalmente en 3,3 y 0,75% respectivamente. A las 24 h y por el efecto del agregado de agua tanto los azúcares totales como la acidez disminuyeron, el cambio de pH no fue tan apreciable debido a que este parámetro tiene una escala logarítmica. Un análisis cualitativo de ácidos orgánicos mostró que el ácido láctico es el ácido no volátil predominante (Figura 4.110). La temperatura del medio de fermentación varió entre 27°C (mañana) y 42-43 °C (tarde). Las temperaturas elevadas evidentemente promovieron una intensa actividad fermentativa.

Tabla 4.46. Cinética del pH y acidez en función del tiempo (Ensayo I).

Tiempo (h)	Ferm Ac		Ferm Plas	
	pH	Acidez %	pH	Acidez %
0	6.06	0.10	6.00	0,07
12	4.50	0,36	4.50	0,33
24	4.24	0,70	4.29	0,56
24D*	4.27	0,51	4.24	0,46
36	3.82	0,73	3.79	0,58
44	3.82	0,76	3.83	0,77

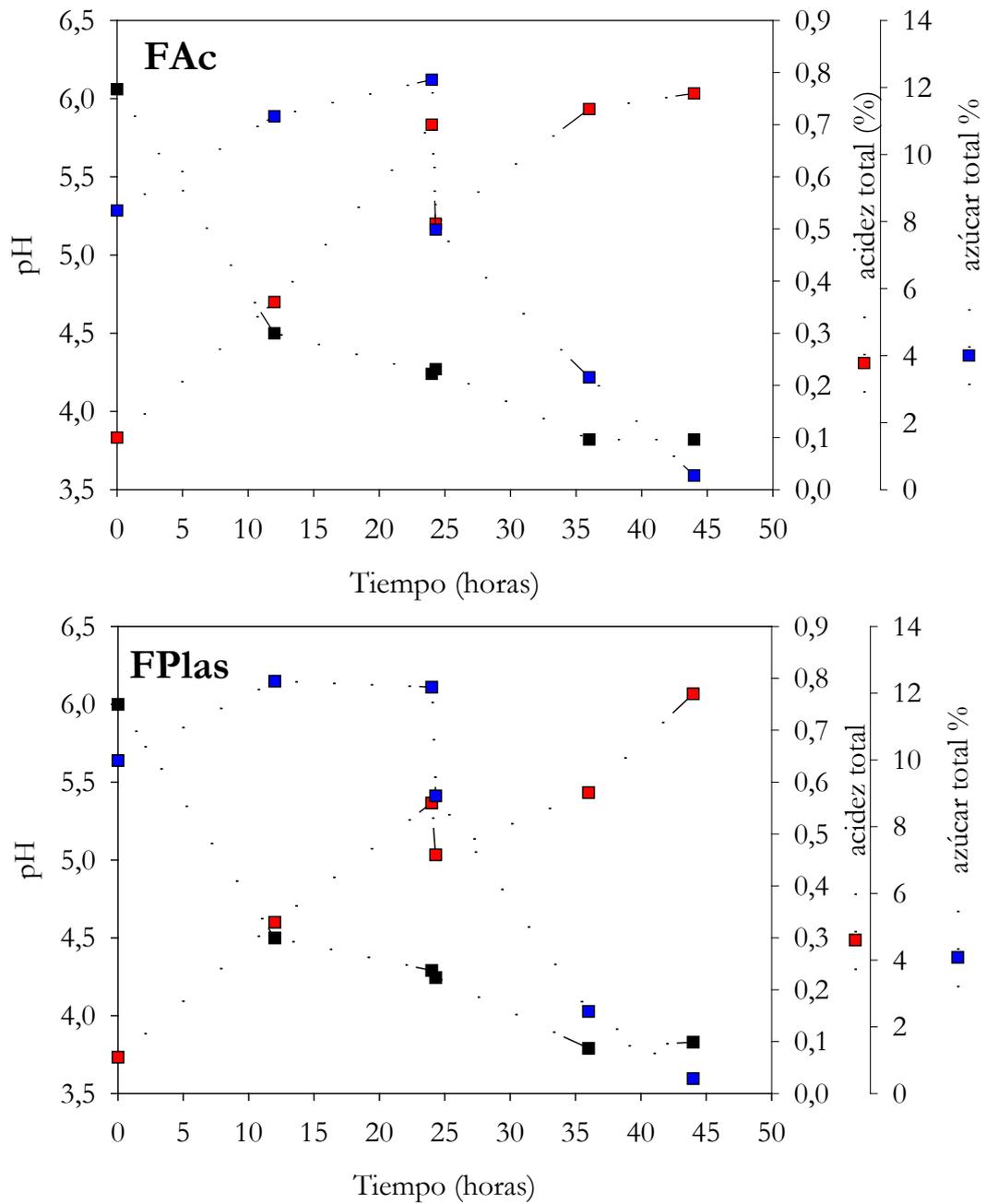


Figura 4.109. Cinética de la fermentación (Ensayo I).

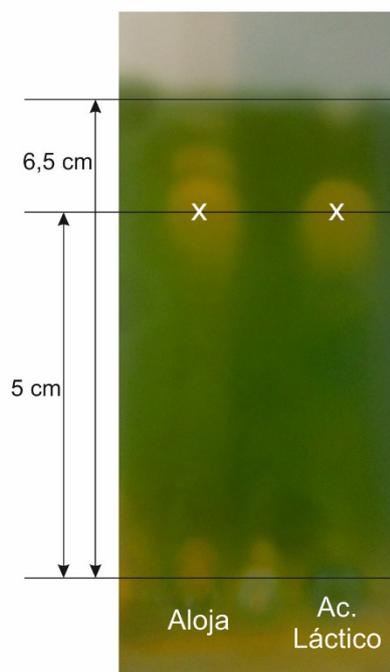


Figura 4.110. TLC de ácidos orgánicos de muestra de aloja a 44 h de fermentación. $R_f = 0,77$.

La cinética de consumo de azúcar muestra claramente que durante el período de mayor acidificación, hasta las 24 h, el nivel de azúcar en el medio se mantiene relativamente alto e incluso aumenta desde un 8-9 % inicial hasta 12%. A partir de las 24 h la concentración de azúcar disminuye marcadamente y a las 48 h el valor es inferior a 0,5%. La interpretación de esta cinética no es tan directa. Si consideramos la composición de los frutos del ensayo I, el 40% de la vaina húmeda es azúcar siendo mayormente sacarosa. Para la relación inicial de peso vainas:agua inicial (1:2,5), la concentración teórica inicial de azúcar en el medio, es decir aquella que se obtendría asumiendo una extracción completa en el volumen de agua agregado, es del 16% o sea el doble del valor inicial medido. Por lo tanto es evidente que al inicio el azúcar no ha sido extraído en forma completa y que el aumento de la concentración en el medio es debido a que la difusión de azúcar de los sólidos es mayor que su consumo, en este aumento hay que considerar también un efecto de concentración debido a que las partes sólidas de la vaina absorben agua disminuyendo el volumen efectivo de medio líquido. El análisis por HPLC muestra que la sacarosa es el azúcar predominante (85-90%) hasta las 24 h de fermentación, luego solo se detectan glucosa y fructosa en concentraciones aproximadamente iguales lo cual sugiere que son productos de la hidrólisis de la sacarosa.

La determinación de alcohol a las 44 h dio valores de $6,46 \pm 0,062\%$ y $7,69 \pm 0,129\%$ (v/v) para las fermentaciones FAc y FPlas respectivamente.

El análisis microbiológico permitió completar el análisis del proceso (Tabla 4.47). Únicamente se hicieron recuentos iniciales, a las 24 y 44 h de bacterias lácticas y levaduras en medios selectivos. También se incluyó medios para *Staphylococcus* y enterobacterias (EB), en estos casos solamente se hicieron estriados para verificar su presencia sin cuantificar. La siembra en el medio para *Staphylococcus* spp. dio negativo desde el inicio mientras que las EB dieron negativo recién a las 44 h lo cual se atribuye a la acidificación del medio ya que es conocido que estos microorganismos no crecen en ambientes ácidos.

Los recuentos iniciales se evaluaron luego de una hora de preparado el medio, por lo tanto son valores aproximados ya que no se efectuó una extracción exhaustiva de los microorganismos de las vainas. Los datos de recuentos fueron del orden de 10^5 UFC/mL lo cual corresponde a un orden similar por gramo de vaina. Los recuentos de BAL se incrementaron 3 órdenes en 24 h alcanzando valores de $2-4 \times 10^8$ UFC/mL lo cual explica la intensa fermentación láctica durante ese período (Tabla 4.47). Las colonias aisladas en MRS fueron de color crema observándose que correspondían a bacilos Gram positivos y catalasa negativos, propiedades características de las BAL. Los recuentos de BAL se mantuvieron hasta el final. También se aislaron levaduras pero en este caso la situación fue diferente. Las levaduras crecieron durante toda la fermentación pero el mayor aumento ocurrió entre las 24 y 44 h durante el período de mayor consumo de azúcar. En cuanto a las levaduras se observaron dos colonias bien definidas, una colonia de apariencia rugosa, que se encontró predominantemente a las 24 horas y una colonia de apariencia cremosa la que se aisló de las placas de 44 horas. Esta última levadura presentó características típicas de *Saccharomyces* spp. lo cual es consistente con la presencia de niveles moderados de alcohol en el medio al final de la fermentación.

Tabla 4.47. Recuento de microorganismos en el Ensayo I.

Medio	Fermentador	T0	T24	T44
WL	Fac	7.20E+04	1.90E+06	9.60E+07
	Fplas	1.03E+05	2.60E+05	3.00E+07
MRS	Fac	1.60E+05	4.20E+08	1.70E+08
	Fplas	1.70E+05	2.30E+08	1.90E+08

Los resultados obtenidos en la elaboración de Aloja siguiendo la receta de la elaboradora familiar permitieron conocer en que consiste la fermentación del fruto del algarrobo para hacer la bebida. El proceso es extremadamente simple, las vainas se recolectan secas como corresponde al fruto maduro y mediante una molienda húmeda y el agregado de agua comienza una fermentación espontánea promovida por los microorganismos epifíticos y el ambiente anaeróbico del recipiente debido a la ausencia de mezclado y aireación. El proceso global es relativamente corto, a juzgar por el consumo de azúcares fermentables y el crecimiento microbiano, de no más de 3 días. La fermentación podría dividirse en dos etapas considerando el rol de los microorganismos y la fermentación predominante: una primera hasta las 18-24 h caracterizada por una intensa producción de ácido que disminuye el pH del medio de 6,4-6,6 inicial a 4,5, la acidez total alcanzada durante esta etapa es de aproximadamente 0,7%. El desarrollo de bacterias lácticas hasta recuentos del orden de 3×10^8 UFC/mL indica que son estas bacterias las principales productoras de ácido. De hecho el ácido láctico fue el principal ácido orgánico detectado en el medio de fermentación. A las 24 h la “bebida” tiene aún un ligero sabor dulce y es agradable. La presencia de levaduras fue otra característica de la fermentación. A partir de las 24 h las levaduras aumentan en número de manera considerable debido, entre otros factores, al medio ácido que favorece su crecimiento. Si bien la fermentación láctica continúa, esta no explica el gran consumo de azúcares que se observa entre las 24 y 48 h. La determinación de alcohol dio valores de 6,5-7,5 % (v/v) lo cual indica que en este período la mayor actividad fermentativa está asociada al metabolismo de las levaduras, podríamos considerarla como la etapa de la fermentación alcohólica. La observación microscópica del medio de fermentación y de las colonias de levaduras aisladas a las 48 h muestran células de morfología globosa típicas de levaduras del género *Saccharomyces* spp. lo cual es consistente con lo anteriormente mencionado. A las 44 h la bebida es agria y alcohólica por lo cual sensorialmente no es agradable. Esto explica por qué en las recetas se le incorpora azúcar para beberla. La presencia de EB era esperada ya que estas bacterias están presentes en todas las fermentaciones de vegetales y pueden también tener su origen en el suelo de donde se recolectan las vainas y el agua. Las EB prácticamente desaparecen a las 48 h lo cual es atribuible al efecto combinado de la acidificación del medio y el etanol. No obstante la fermentación láctica debe considerarse como la principal barrera contra patógenos en la fermentación de la Aloja,

habida cuenta que no se agregan al medio compuestos inhibitorios como nitratos, NaCl o metabisufito.

4.3 Fermentaciones en laboratorio

4.3.1 Estandarización del proceso

La experiencia obtenida en la preparación de Aloja se tomó como referencia para diseñar un proceso base para los ensayos de laboratorio. Los mismos tuvieron como objetivo central reproducir la bebida lograda en la temporada anterior en la ciudad de Santiago del Estero, evaluar la reproducibilidad del proceso con frutos recolectados de dos años sucesivos y continuar con la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la misma. La materia prima empleada fue descrita en Materiales y Métodos, para estandarizar el agua empleada se utilizó agua de pozo proveniente del acuífero Puelche de la zona de Arana, partido de La Plata. En cada fermentación se emplearon 2 kg de vainas seleccionadas y 5 litros de agua.

La bebida se elaboró de la siguiente manera:

- 1- En un mortero de algarrobo adquirido en Santiago del Estero, similar al utilizado en el primer ensayo, se realizó una primera molienda en seco de 500 g de vaina.
- 2- Una vez que las vainas estuvieron bien trituradas se les agregó 200 mL de agua de pozo y se continuó con la molienda durante 5 minutos hasta obtener una pasta. La menor humedad de los frutos recolectados en el 2013 requirió un poco más de agua para la molienda húmeda.
- 3- Una vez obtenida, la pasta se pasó a un balde de plástico con capacidad para 10L.
- 4- El proceso se repitió 4 veces hasta moler 2 kg de vainas.
- 5- Obtenidas la totalidad de las vainas se agregaron 4,2 L de agua atemperada a 30°C para lograr los 5 L finales.
- 6- Los baldes se llevaron a un cuarto a temperatura constante de 30°C durante 48 horas periodo durante el cual se tomaron muestras para analizar a diferentes tiempos.

Las fermentaciones se hicieron con frutos recolectados en diciembre del 2012 y 2013. En el primer caso los frutos provinieron de tres localizaciones geográficas diferentes efectuando una sola fermentación con cada uno de los lotes luego de tres

meses de conservación de los frutos (lotes A, B y C; Ensayo II). Con la cosecha 2013 se realizó una fermentación con 3 réplicas utilizando frutos de 2 meses de conservación (Réplicas R1, R2 y R3, Ensayo III) y posteriormente una a los 4 meses de almacenamiento (Ensayo IV). En la Figura 4.111 se muestra la molienda seca efectuada en el laboratorio y el tamaño de las partes de las vainas trituradas en dicho proceso. En tanto que en la Figura 4.112 se pueden ver como quedaron las vainas luego del proceso de molienda húmeda y el fermentador con medio al inicio.



Figura 4.111. Mortero de algarrobo procedente de la provincia de Santiago del Estero. Molienda en seco.



Figura 4.112. Molienda húmeda, pasta y fermentador con medio al inicio.

4.4 Resultados

4.4.1 Cinética de fermentación

El análisis de los procesos realizados en las dos cosechas sucesivas mostraron una dinámica de fermentación comparable con lo observado en el Ensayo I. Dentro de cada ensayo no hubo diferencias importantes entre lotes lo cual puede explicarse porque la composición de la algarroba de los 3 lotes de cosecha de los distintos lugares resulto similar y en el Ensayo III se emplearon tres réplicas de un mismo lote de cosecha. La mayor diferencia de los ensayos de laboratorio respecto al Ensayo I se observó en el pH inicial y la cinética de acidificación. En estos casos el pH promedio inicial del medio y el de las 12 h fue de $6,76 \pm 0,054$ ($n=7$) y 5,5-5,8 comparados con el valor de 6,0 y 4,5 respectivamente en la elaboración casera. Estas diferencias pueden atribuirse en parte a la temperatura controlada de las fermentaciones de laboratorio y a la calidad del agua que pudo influir en el pH inicial. En la Figura 4.113 se muestra la evolución del pH y la temperatura en los lotes de los tres ensayos donde se evidencia que en todos los ensayos la acidificación fue más lenta que la observada en el Ensayo I e incluso el pH final de la bebida fue ligeramente superior, alrededor de 4,1 en comparación con el Ensayo I que fue de 3,83.

Se observa claramente la homogeneidad de los datos obtenidos en los lotes de los Ensayos II y III, habiendo en cambio una diferencia significativa en la cinética de acidificación del Ensayo II en comparación con las del Ensayo III. Sin embargo cabe

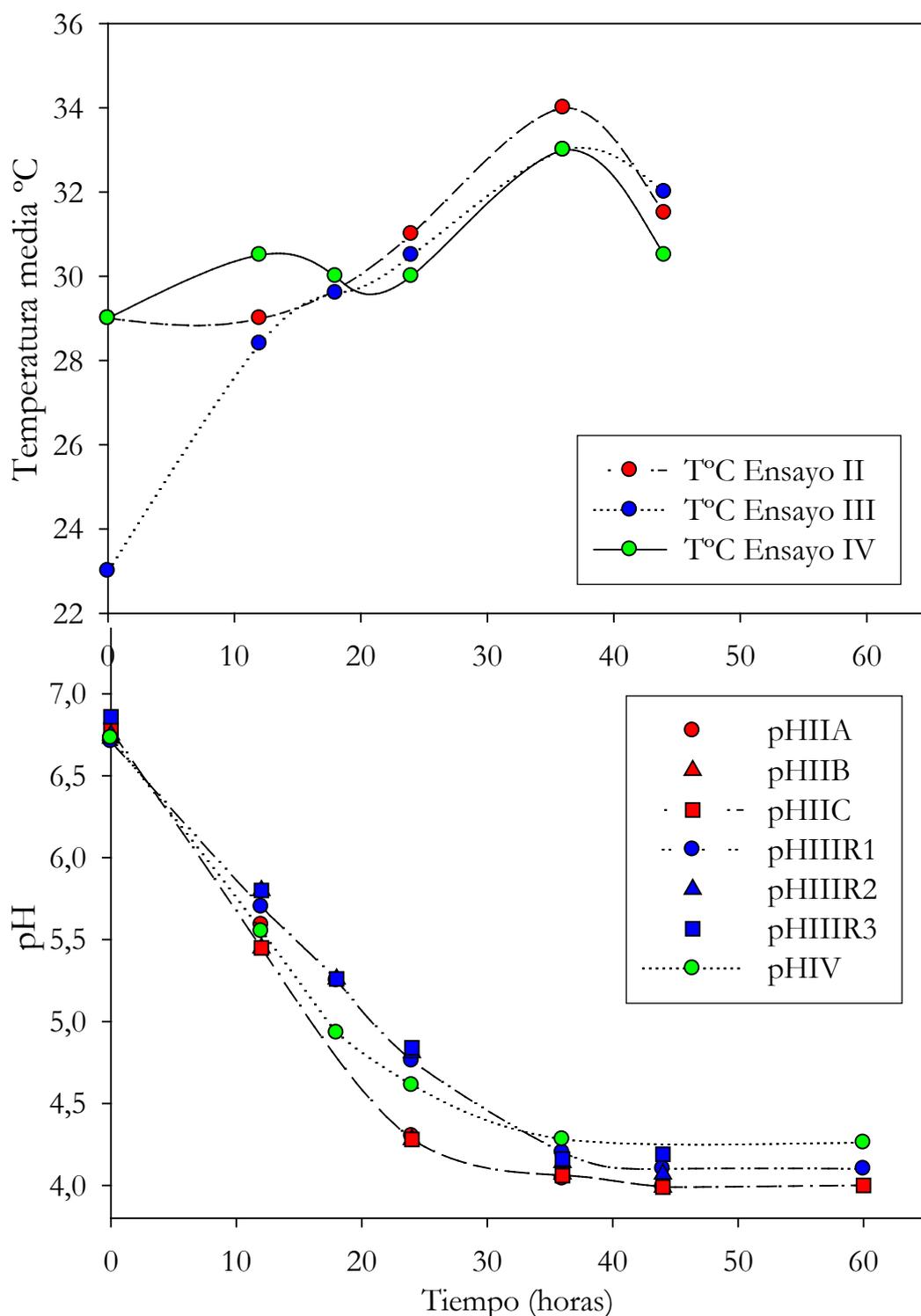


Figura 4.113. Evolución del pH y la temperatura en las fermentaciones de los 3 ensayos. A los fines de clarificar la figura las líneas solo se indican en uno de los lotes de cada ensayo (rojo Ensayo II; azul Ensayo III y verde Ensayo IV).

aclarar que en el Ensayo III la temperatura inicial no fue 30°C sino 22 °C lo cual sin duda afectó la cinética de la fermentación. También se puede observar que en todos los casos la temperatura aumenta entre 3 y 4 °C entre las 24 y las 36 h que coincide con el período

de mayor velocidad de consumo de azúcar. En la Figura 4.114 se muestran los datos obtenidos en los 3 ensayos referidos a los parámetros pH, acidez total, azúcares totales y temperatura como así también los recuentos viables de los cuatro grupos de microorganismos estudiados: mesófilos totales (MT), enterobacterias (EB), bacterias lácticas (BAL) y levaduras (Lev).

Al final de la fermentación, a juzgar por el consumo de azúcar, la acidez total alcanzó en promedio un valor de 0,85% para todas las fermentaciones. El análisis por HPLC de ácidos orgánicos de muestras de Aloja de 48 h del lote B del ensayo II permitió confirmar la presencia mayoritaria de ácido láctico y en menor proporción ácido acético. En estas muestras la suma de ambos ácidos, según la cuantificación del cromatograma, fue del 1,1%, la cual es ligeramente superior a la acidez total obtenida por titulación en dicha muestra (0,9%). La concentración de ácido láctico y ácido acético fue de 0,85% y 0,25% respectivamente. El ácido acético es un metabolito de la fermentación y puede ser producido por las levaduras, las EB o las BAL. La cinética de consumo de azúcar es muy similar a la descrita en el ensayo I. En las primeras 18 h la concentración de azúcar en el medio se mantiene relativamente alta (alrededor del 10-12%) y se consume mayoritariamente entre las 18 y 36 h, período durante el cual se observa el mayor aumento de acidez total y la producción de alcohol, es la etapa de mayor intensidad fermentativa en los ensayos de laboratorio lo cual se corresponde con el aumento continuo de la temperatura del medio que llega a un máximo valor a las 36 h.

El pH inicial del medio cercano a la neutralidad y rico en azúcares fermentables genera un aumento muy rápido de las EB y BAL en las primeras 12 h de fermentación dando lugar a la acidificación pronunciada del medio. El máximo recuento de EB se alcanza cerca de la 18 h y el de las BAL a las 24 h con valores promedio de $1,8 \times 10^8$ y 10^9 UFC/mL respectivamente. Las EB comienzan a declinar su número debido a la acidificación y a partir de las 48 h en adelante ya no se detectan (crecimiento negativo en McConkey sembrando 0,1-0,2 mL de medio sin diluir). Las BAL comienzan a declinar a partir de las 36 h pero mantienen al final recuentos del orden de 10^8 UFC/mL. Los recuentos en MRS dieron los mismos valores incubados aeróbicamente como en anaerobiosis lo cual indica que las BAL asiladas de la Aloja son aero-tolerantes. Las colonias son típicamente de color crema medianas que se observan nítidamente en las placas del medio MRS a las 48-72 h de incubación (Figura 4.115).

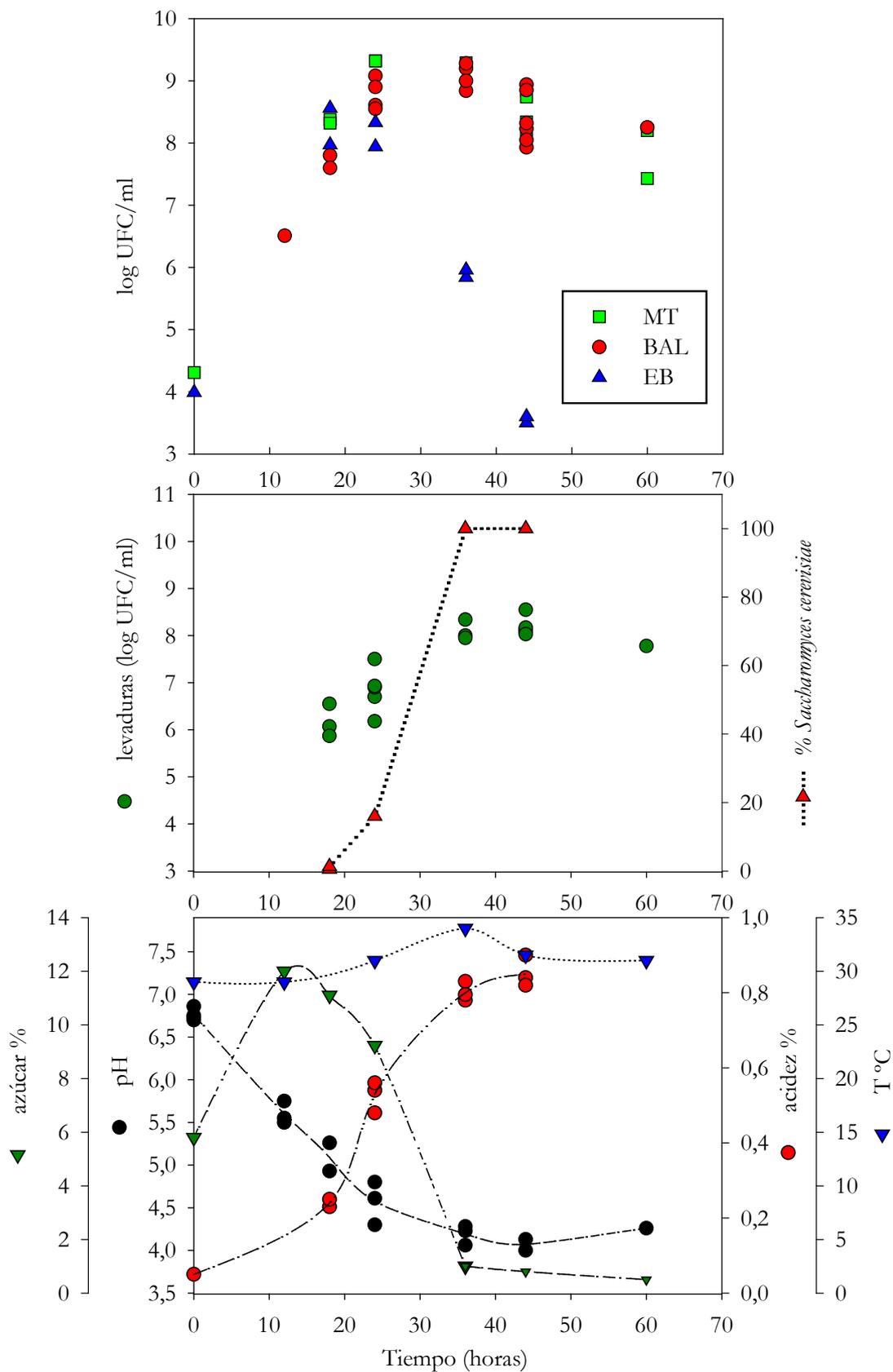


Figura 4.114. Evolución de distintos parámetros de proceso y recuentos microbianos en las fermentaciones de los 3 ensayos. A los fines de clarificar la figura los valores de pH y acidez total son el promedio de todos los lotes de cada ensayo.

La observación microscópica de estos aislamientos a lo largo del proceso mostró bacilos o cocos Gram positivos y catalasa negativo (Figura 4.116). La diferenciación de las colonias de ambos tipo de BAL fue dificultosa. Los cultivos de ambas bacterias en caldo MRS muestran la presencia de láctico en consistencia con el medio del cual se aislaron (Figura 4.117).

Es interesante destacar la dinámica que se observa en el medio para mesófilas aeróbicas totales (MT). En este medio desarrollan en 24 h de incubación colonias grandes, algunas gomosas bien diferenciadas. Luego de 48-72 h de incubación comienzan a verse colonias pequeñas solo observables con lupa o a tras luz. Estas colonias son muy difíciles de diferenciar entre sí. Estos dos tipos de colonias características corresponden a las EB y BAL respectivamente, lo cual se determinó haciendo estriados cruzados a partir de colonias puras en los medios McConkey y MRS, observación microscópica con contraste de fase y coloración de Gram. Esta situación es consistente con el hecho que los recuentos de MT hasta las 24 h son siempre mayores que los observados en el medio MRS. A medida que las EB desaparecen los recuentos tienden a coincidir, esto se observa claramente a partir de las 36 h de fermentación.

A partir de las 18 h la presencia de levaduras es notoria observándose claramente dos tipos de colonias en el transcurso de la fermentación, las rugosas de bordes irregulares (R) que predominan entre las 18 y 24 h y las cremosas y lisas (L) que colonizan finalmente el medio. A las 36 h las colonias L son las únicas que se observan en la placas en las diluciones altas. Al microscopio las levaduras R se ven como células ligeramente elongadas y las L globosas. El desarrollo de las levaduras partir de las 24 h puede atribuirse a que el pH del medio es más favorable (5,0) o a la liberación de factores nutricionales de las bacterias que estimulan su crecimiento o ambos (Figura 4.118). A las 44-48 h el nivel de alcohol en el medio varió entre 6,6 y 7.2%. Este metabolito es mayoritariamente producido por la actividad fermentativa de las levaduras.

Es interesante destacar que el seguimiento de la fermentación mediante la observación microscópica es un buen parámetro de cómo evoluciona el sistema. A las 16 h se observa una gran cantidad de bacilos medianos, de bordes rectos muy móviles, estos resultaron ser las EB. Estos bacilos se mantienen hasta las 24 h, luego pierden la movilidad y desaparecen completamente al final. Simultáneamente desarrollan bacilos finos no tan rectos y de forma cocoide en forma de hojuelas de a pares típicas que se

corresponden con los aislamientos del medio MRS. En la Figura 4.119 se muestra una microfotografía del final de la fermentación en donde se aprecian claramente los bacilos y las levaduras (L) con forma globosa.

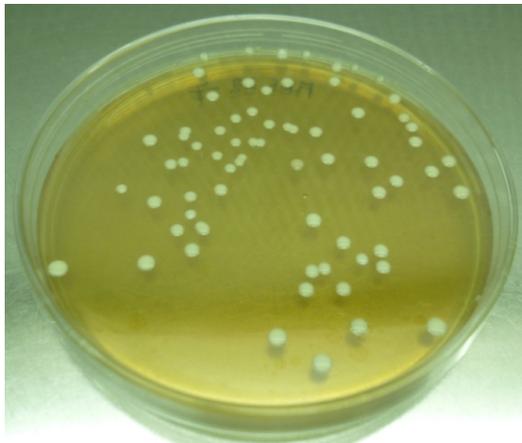


Figura 4.115. Colonias típicas de bacterias lácticas en medio MRS. En general corresponden a bacilos Gram +.

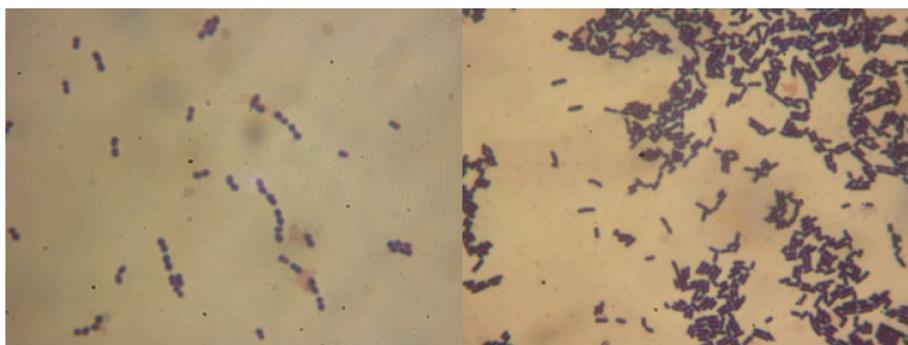


Figura 4.116. A la izquierda cocos aislados, de a pares o en cadena, Gram +, a la derecha bacilos aislados Gram + de colonias aisladas del medio MRS. Muestra lote B Ensayo II 24 h.

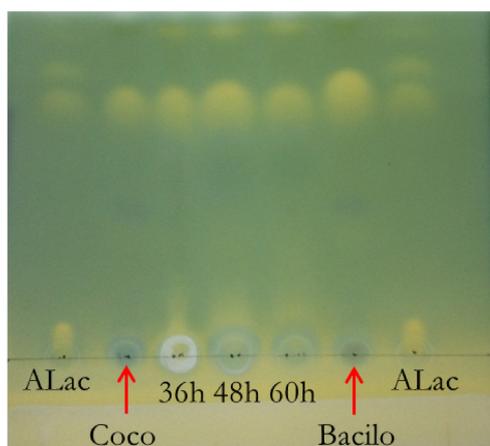


Figura 4.117. TLC de ácidos orgánicos. Las muestras de coco y bacilo son sobrenadantes de cultivos en MRS líquido, las de Aloja corresponde a muestras de 36, 48 y 60 h del lote 2 Ensayo II.

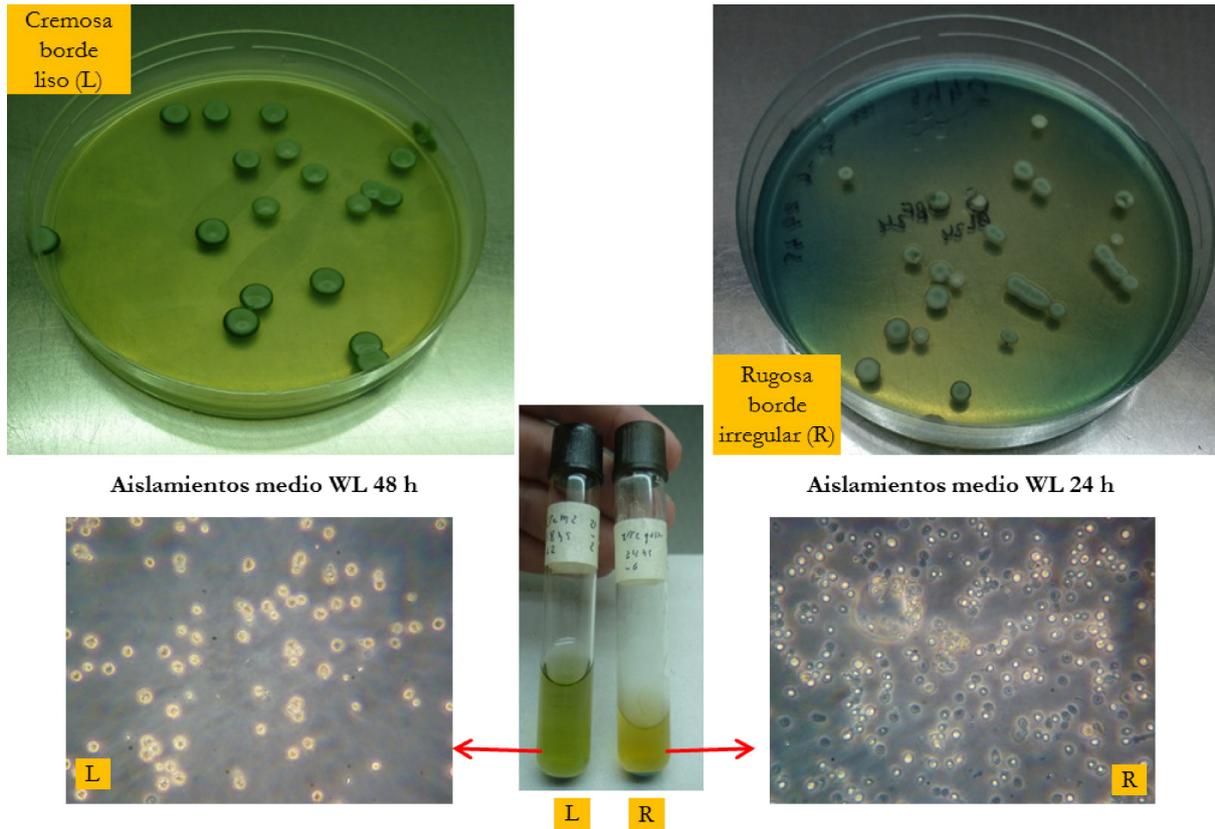


Figura 4.118. Aislamiento de levaduras en medio WL. En los tubos se observa los cambios en el medio WL líquido producidos por las levaduras, se puede apreciar que las levaduras que provienen de las colonias rugosas forman velo.

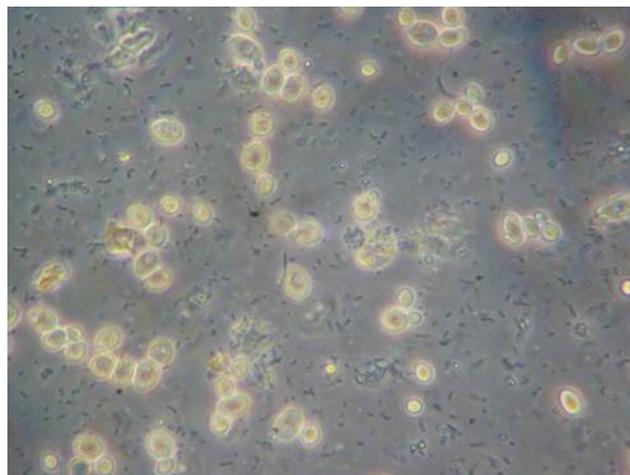


Figura 4.119. Microfotografía de contraste de fase (1250 x) de la Aloja de 48 h de fermentación.

4.4.2 Identificación y caracterización de los microorganismos fermentadores

A partir de los aislamientos de bacterias y levaduras se procedió a su identificación combinando pruebas bioquímicas y métodos moleculares. Las EB en McConkey crecieron como colonias rosas o rojizas indicando que metabolizan la lactosa del medio por lo cual se consideran del tipo coliformes que incluyen géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*. A las 12 h y particularmente entre las 18 y 24 h se puede observar en el medio de fermentación mediante el microscopio de contraste de fase una gran cantidad de bacilos medianos muy móviles que desaparecen totalmente a las 36-44 h. Estas características se corresponden con las observadas en las colonias de McConkey y las grandes colonias gomosas típicas del medio PCA. En un trabajo realizado con las vainas del Ensayo III y mediante el análisis por MALDI-TOFF de 40 colonias tomadas al azar del medio McConkey se identificó el 50% de las EB como *Enterobacter*, 15-16% a *Escherichia* y *Citrobacter* y en menor proporción *Klebsiella* (Ferreiro, 2015). A excepción de *Klebsiella*, las demás coliformes son móviles que coincide con la observación microscópica. La presencia de *E. coli* fue confirmada empleando el medio EMB, ya que las mismas colonias identificadas por MALDI-TOFF dieron en este medio el característico brillo verde metálico (Pathak y Gopal, 2001).

En relación a las BAL se identificaron los dos aislamientos correspondientes a los bacilos y los cocos mediante secuenciamiento del ADN_r 16S. Se identificó al bacilo y al coco como *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium* respectivamente.

Con respecto a las levaduras se determinó que la R crece en agar lisina y por lo tanto es una no-*Saccharomyces* mientras que la L no desarrolló que es una características típicas de *Saccharomyces* spp. El secuenciamiento de la región D1/D2 del ADN_r 28S permitió identificar esta levadura como *Saccharomyces cerevisiae* y a la levadura de la colonia rugosa como *Wickerhamomyces anomalus* (*Hansenula anómala*). Estos resultados son consistentes con la evolución del alcohol en la Aloja. A partir de las 24 h la levadura *Saccharomyces* comienza a predominar y es la única aislada a las 36 h. Su crecimiento coincide con el período de mayor consumo de azúcar y la producción de alcohol.

Los test de actividad enzimática para *Wickerhamomyces anomalus* dio positivo únicamente para poligalacturonasa (Figura 4.120) mientras que todos fueron negativos para *Saccharomyces cerevisiae*.

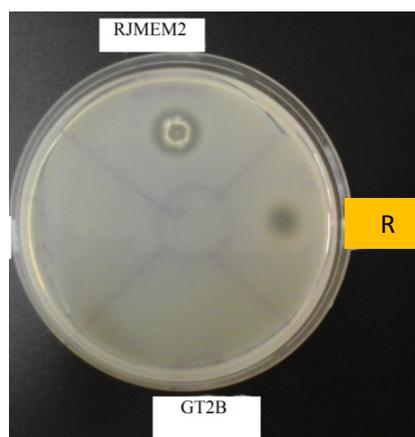


Figura 4.120. Tests de poligalacturonasa en placa. RJMEM2 control positivo (*Saccharomycopsis crataegensis*), GT2B control negativo (*Saccharomyces cerevisiae*). Foto: gentileza de (Brea, 2015)

4.5 Discusión y conclusiones parciales

En el presente trabajo se estudió el proceso de elaboración de Aloja, una bebida rústica obtenida por la fermentación espontánea de los frutos de la algarroba. A partir de la entrevista realizada con una elaboradora artesanal se conoció el “saber hacer” de la Aloja. El proceso de elaboración casera es sumamente simple y consiste en una molienda húmeda de los frutos utilizando en general un mortero de algarrobo, el agregado de una determinada cantidad de agua para fluidificar la pasta molida y la incubación de la mezcla en recipientes cerrados a temperatura ambiente por un determinado tiempo. Dentro de este concepto de proceso existen múltiples recetas o combinaciones de materia prima, agua y condiciones de fermentación que hace difícil definir la Aloja como un producto único. Por otra parte la bebida no se conserva, se consume en el momento y ese “momento” es difícil de definir ya que cada elaborador suele tener su propia receta o concepto de la bebida. A pesar de estas diferencias, es claro que la Aloja es un proceso de fermentación llevado a cabo por la flora epifítica del fruto y los microorganismos que se van incorporando al fruto desde su recolección en el suelo hasta el procesamiento, como así también los que pueden estar presentes en los utensilios, en especial el mortero que se emplea para moler el fruto.

La microbiota epifítica, es decir, los microorganismos normalmente presente en la superficie de la materia prima vegetal comestible, es muy variable. Su composición depende de si las partes se cosechan cerca o en el suelo mismo. La susceptibilidad de la materia prima al ataque de la flora epifítica depende mucho de su contenido de humedad.

Así las frutas secas que contienen menos del 50% de agua no presentan problemas de deterioro bacteriano debido a su baja actividad acuosa, esta situación es la que prevalece en las vainas de algarrobo. En este trabajo los frutos de algarroba fueron recolectados en distintas zonas de Santiago del Estero durante el mes de diciembre. Estas vainas están sometidas a una intensa radiación solar, altas temperaturas diurnas y son recolectadas del suelo cuando caen al madurar. La fermentación espontánea de estos frutos muestra claramente que la microflora fermentativa sobrevive en las vainas hasta casi 6 meses de almacenamiento de los frutos a 4°C en ambiente protegido de la luz y humedad. Por lo tanto la elaboración de la bebida puede hacerse en principio a lo largo del año lo cual es muy importante porque evita la necesidad del procesamiento inmediato o su congelación, como ocurre con las frutas frescas.

Los estudios realizados demostraron que la fermentación es llevada a cabo por tres grupos de microorganismos: enterobacterias, bacterias lácticas y levaduras. Las BAL y las EB son las responsables de la acidificación inicial del medio. La presencia de enterobacterias (EB) en los alimentos es en general visto como un factor negativo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria ya que cepas de algunas especies son patógenas o provocan el deterioro de la materia prima o el alimento elaborado (Baylis y col., 2011). Sin embargo las EB, en particular las coliformes, se encuentran ampliamente distribuidas en suelos, semillas y vegetales y por lo tanto es inevitable que estén presentes al inicio de la fermentación ya que se introducen junto con la materia prima, excepto que la misma sea pasteurizada lo cual no siempre es posible por su potencial efecto negativo en el producto o simplemente por no ser un procedimiento práctico. Quizás por este motivo el rol de las EB en la elaboración de alimentos fermentados ha sido poco estudiado en comparación con las BAL y levaduras. No obstante hay que tener en cuenta que las EB compiten por los nutrientes y producen metabolitos que podrían tener cierta incidencia en las características sensoriales y nutricionales del producto. Algunos estudios de identificación de EB en la Aloja llevados a cabo con los frutos del ensayo III, demostraron la presencia de coliformes del género *Enterobacter* como mayoritario y de *Citrobacter* y *E. coli* en menor proporción (Ferreiro, 2015). Estas EB tienen un metabolismo de ácidos mixtos (*Citrobacter*, *Escherichia*) o butanodiólica (*Enterobacter*) y aportan al medio diversos compuestos como ácido láctico, etanol, ácido succínico, 2,3

butanodiol, ácido acético, entre otros, en distintas proporciones (Converti y Perego, 2002, Oh y col., 2008).

Al inicio de la fermentación de vegetales siempre hay un período inicial en el cual el ambiente aun no es restrictivo, el medio es poco ácido y hay nutrientes disponibles. Garrido-Fernandez y col. (1972) reportaron la presencia de bacilos Gram negativos no esporulados pertenecientes a los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Aeromonas* y *Achromobacter* en las salmueras de cuatro variedades de aceitunas negras durante los primeros días de la fermentación. Hurtado y col. (2008) estudiaron la fermentación de las aceitunas arbequinas de mesa y encontraron niveles máximos de EB a los 5 días en la zona más superficial de la salmuera con recuentos del orden de 10^5 - 10^7 UFC/ml (medio VRBG), el 80 % de los aislamientos correspondieron a *Proteus vulgaris* y el 20% restante a *Providencia rettgeri*. Quintana (1986) encontraron un máximo de EB a los 4-7 días en salmueras al 2% con un predominio de *Citrobacter freundii* (96%) y *Proteus mirabilis* (4%). En la elaboración de chucrut las coliformes como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae* o *E. agglomerans* están presentes en los primeros días de la fermentación, luego la acumulación de ácido láctico provoca la declinación de la población hasta su desaparición a los 5 días. En una fermentación típica del chucrut las enterobacterias crecen rápidamente en los primeros 2 a 3 días provocando un caída del pH de 6,5 a 4,4 y alcanzando recuentos cercanos a 10^8 UFC/mL. A partir de ese momento, cuando la fermentación láctica se dispara, las EB comienzan a disminuir en el recuento viable y no se detectan luego de 10 días de fermentación. Entre los 2 y 5 días de proceso la acidez láctica aumenta hasta un valor de 0,9-1,0% que se mantiene constante hasta los 10 días de fermentación y luego se incrementa por acidificación de bacterias lácticas más acidofílicas (Nout y Rombouts, 2000, Doyle y Buchanan, 2012).

Una característica muy interesante de la Aloja es la velocidad con la cual ocurre la fermentación, a diferencia de los procesos mencionados, la fermentación de la algarroba dura entre 60 y 72 h, a juzgar por el agotamiento de los azúcares. Esto puede ser explicado porque no se adiciona al medio inicial inhibidores como nitratos, NaCl o metabisulfito de potasio, práctica utilizada en las fermentaciones cárnicas, de vegetales o el vino para controlar el crecimiento de hongos y bacterias indeseables, estos compuestos pueden restringir la actividad de las BAL y hacer más lenta la acidificación.

El consumo de Aloja no parece ser un problema desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. En muchos alimentos fermentados la fermentación láctica es la principal responsable de la completa desaparición de las EB o de la inhibición de anaerobios estrictos como *Clostridium botulinum* que no desarrolla a pH <4,6 (Doyle y Buchanan, 2012).

Lindgren (1993) determinó que concentraciones de ácido láctico entre 0,02 y 0,1% en un medio líquido en anaerobiosis a pH 4,2-5,4 eran inhibitorias de las EB. El efecto inhibitorio aumenta con la disminución del pH debido a que la forma no disociada del ácido es la que actúa como permeabilizante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Alakomi y col., 2000).

Otro factor de stress para las EB a considerar es el etanol. Semanchek y Golden (1996) en un estudio con la cepa de *E.coli* enterohemorrágica O157:H7 observaron una pérdida completa de viabilidad (6,4 log CFU/mL inicial, límite de detección 0,5 log) luego de 3 días de fermentación de la sidra a 20°C lo cual se atribuyó al efecto combinado de la acidez y el alcohol (acidez sidra 0,3-0,7 % como ácido málico, etanol 5-6%). Jordan y col. (1999) observaron un efecto sinérgico entre el lactato (0,45%) y el etanol (5%) en el efecto bactericida de ambos compuestos sobre la misma cepa de *E. coli*. El efecto fue más pronunciado a pH < 5,0.

En base a estas consideraciones es evidente que en la Aloja la fermentación láctica inicial y la acción combinada del ácido láctico con el etanol a partir de las 24 h en adelante son las principales barreras al desarrollo de las EB y otros potenciales patógenos. Las concentraciones de ácido láctico y etanol son superiores a las que ejercen el efecto bactericida lo cual explica la rápida desaparición de las EB de la Aloja en comparación con los tiempos reportados en otras fermentaciones, como las mencionadas anteriormente de la oliva o el chucrut.

Las BAL presentes en la Aloja fueron bacilos y cocos identificados como *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*. La presencia de *L. plantarum* era esperable en parte porque esta especie es cosmopolita en la mayoría de vegetales. Emerenini y col. (2013) identificaron *Lactobacillus plantarum* en un 36% de las colonias aisladas de frutas y un 27% de las aisladas de hortalizas, porcentaje mayoritario a cualquier otra bacteria lo que demostró que esta especie es cosmopolita en la mayoría de vegetales. Su presencia explica el rol que tiene en las fermentaciones del chucrut, aceitunas y materias primas

vegetales en general (Nout y Rombouts, 2000). Por su parte Valan Arasu y col. (2015) encontraron que las primeras 24 horas de fermentación para silos de pastura la bacteria predominante es el *L. plantarum* con crecimientos en el orden de $5,8 \times 10^8$ UFC/g, lo que demuestra que puesta en condiciones de fermentación esta bacteria es un microorganismo que tiene una tasa de crecimiento elevada y por lo tanto produce una marcada acidificación del medio. El metabolismo de los azúcares por parte de *L. plantarum* puede ser homo o heterofermentativo. Estudios metabólicos con la cepa heterofermentativa WCFS1, cuyo genoma se ha secuenciado Kleerebezem y col. (2003), mostraron que el 80% de la glucosa es metabolizada a lactato bajo condiciones de limitación de C en cultivos continuos (Teusink y col., 2006). Con una cepa homofermentativa, Giraud y col. (1991) observaron un rendimiento de 0,7 g ácido láctico/g glucosa en cultivos batch con pH inicial 5,0.

El género *Enterococcus* incluye a un conjunto de microorganismos extremadamente versátiles. Los enterococos forman parte de la microbiota intestinal normal de individuos sanos, y están presentes en muchos alimentos fermentados, particularmente quesos, embutidos y productos vegetales. Poseen propiedades tecnológicas de interés como sus actividades glicolítica, lipolítica y proteolítica, y la producción de bacteriocinas (Moreno y col., 2006) y también pueden resultar patógenas para los humanos. De hecho en la última década, estos organismos han adquirido cada vez más importancia como patógenos nosocomiales, a pesar de su baja virulencia pueden ser patógenas (Schillinger y Holzapfel, 1995). *Enterococcus faecium* es homofermentativa y ha sido encontrada en varios alimentos fermentados siendo empleada como inóculo en procesos de ensilado, elaboración de quesos, etc. (Giraffa, 2002); las cepas de *Enterococcus* suelen ser productoras de aminas biogénicas, propiedad que debe ser tenida en cuenta para un análisis más pormenorizado de la Aloja (Gardini y col., 2001).

Con respecto a las levaduras se encontró como especie dominante en las primeras horas de la fermentación a *Wickerhamomyces anomalus*, re-clasificación de la especie *Pichia anomala* (Kurtzman y col., 2008). Esta levadura se la ha encontrado en ambientes muy diferentes como frutas, ensilados, materiales vegetales, granos de cereales, entre otros; es poco fermentativa y en la vinificación predomina en medios con bajo tenor de alcohol siendo a su vez altamente productora de ésteres como acetato de isoamilo o acetato de etilo (Walker, 2011). El genoma de *Wickerhamomyces anomalus* ha sido recientemente

secuenciado (Schneider y col., 2012). Por otra parte y como era de esperar *Saccharomyces* predomina en la etapa de la fermentación alcohólica. Es interesante destacar las potenciales aplicaciones de *W. anomalus* para conferir aroma en vinos (Suárez-Lepe y Morata, 2012, Sabel y col., 2014) y el uso de cultivos secuenciales de *Wickerhamomyces anomalus* y *Saccharomyces cerevisiae* para aumentar la complejidad sensorial de sidras (Ye y col., 2014). Esta última aplicación es equivalente a lo que se observa en la elaboración de Aloja y es probable que el aroma a éster que ocurre en las primeras horas de la fermentación derive de los compuestos volátiles que produce esta levadura. La cepa aislada de la Aloja mostró una cierta actividad pectinasa, propiedad que también fue observada en otra cepa de la misma especie aislada de cáscara de naranja (Martos y col., 2013).

Un balance de materia aproximado basado en la estequiometría de las fermentaciones permite inferir como se distribuye el consumo de azúcar de la algarroba durante la elaboración de la Aloja. Las vainas contienen en promedio 40% de azúcar fermentable como sacarosa, por lo tanto para la relación agua-fruto empleada la concentración teórica de azúcar para fermentar sería del 16%. Si tenemos en cuenta los rendimientos de la fermentación, la producción de 0,85-0,9% de ácido láctico implica el consumo de ~ 1,1% de azúcar, mientras que para la producción de 7% de alcohol por las levaduras se necesitan entre 12 y 13% de azúcar (Lepe y Leal, 1990). Por lo tanto solo una mínima fracción de la fuente de C se destina a productos derivados de la fermentación bacteriana y al crecimiento de estos microorganismos (<10 %), mientras que cerca del 75-80 % del azúcar es consumido en la fermentación alcohólica. Esto explica claramente la cinética de consumo de azúcar y los perfiles de temperatura que ocurren entre las 24 y 36 h período en el cual las levaduras *Saccharomyces* crecen y dominan la fermentación.

Una característica a destacar del proceso es la evolución sensorial de la bebida, hasta las 24-36 h tiene un sabor dulzón que enmascara la acidez láctica siendo el aroma y sabor ligeramente agradables. El *flavor* de chocolate típico de la algarroba se mezcla con cierto olor cetónico atribuido al metabolismo fermentativo de las bacterias o las levaduras que aparece en los primeros tiempos. El olor a etanol empieza a sentirse a partir de las 24 horas. A medida que avanza la fermentación y la producción de alcohol aumenta con la consiguiente disminución del azúcar, la bebida se vuelve agria y alcohólica lo cual es poco agradable al gusto. El olor a alcohol se hace más notorio a las 48 h. Es común que la

Aloja se consume con agregado de azúcar y bien fría para neutralizar en parte estas características organolépticas.

Estimar un rendimiento de Aloja en base al peso de vainas empleadas es dificultoso ya que depende del proceso empleado (relación agua:vainas) y de cómo se separan los sólidos (prensado o filtración simple). En nuestro caso la recuperación de líquido luego de filtrar por un lienzo fue de aproximadamente un 52% en base al volumen de agua empleado, esto representa 1,3 litros de Aloja por kg de vaina utilizada. Obviamente la bebida se puede diluir o se le puede incorporar azúcar con lo cual el rendimiento podría ser más alto.

Cabe preguntarse ¿qué es la Aloja realmente? y ¿qué consume la gente? En la Figura 4.121 se puede observar el medio en el fermentador cerca de las 60 horas previo a la filtración y la bebida una vez filtrada.



Figura 4.121. Fermentador a las 60 horas a la izquierda y aloja filtrada a la derecha.

En la Tabla 4.48 se indican los valores de algunos parámetros de la bebida y los recuentos a las 24 h y las 48-60 h cuando las EB ya han declinado su número significativamente o no se detectan. Como puede verse además de alcohol (que es mayor que al de una cerveza pero menor al del vino por litro) los consumidores ingieren una alta concentración de bacterias y levaduras viables si es que la bebida no se pasteuriza. Es interesante resaltar que varias cepas de los microorganismos identificados en la Aloja como *L. plantarum*, *E. faecium* y *W. anomalus* presentan propiedades interesantes para ser empleados en alimentos fermentados como probióticos, productor de bacteriocinas y

compuestos antifúngicos individualmente o en co-cultivos (Leroy y col., De Vries y col., 2006, Coda y col., 2011, Schneider y col., 2012).

Tabla 4.48. Características de la Aloja a las 24 y 60 h.

Tiempo (h)	pH	Acidez total (%)	Azúcar (%)	Alcohol (%)	Recuento viable log UFC/ml		
					BAL	Levaduras	EB
24	4,56 ± 0,25	0,53 ± 0,04	10,92 ± 3,2	-	8,73 ± 0,25	7,03 ± 0,59	7,0 - 8,1
48-60	4,08 ± 0,12	0,85 ± 0,04	<0,5	6,7 ± 0,5	8,31 ± 0,39	8,14 ± 0,22	0 - < 10 ³

Cabe finalmente destacar que las vainas de algarroba se cosechan entre mediados de diciembre y enero y que luego deben conservarse secas para hacer los estudios de fermentación. No se han hecho estudios sistemáticos para determinar cómo evoluciona la flora microbiana en función de las condiciones y tiempo de almacenamiento. Es de esperar que ocurran cambios y por lo tanto las condiciones iniciales del proceso no serán las mismas a medida que el tiempo de conservación aumenta. También tiene que influir el año de cosecha (condiciones de clima) y cómo se recolecta y transporta el fruto, el agua empleada en el proceso, la molienda, entre otros. A pesar del gran número de variables involucradas, se ha observado en el transcurso de 3 años de ensayos bajo las mismas condiciones de fermentación en el laboratorio con vainas cosechadas en distintos lugares, años y tiempos de almacenamiento (entre una semana y varios meses), que el proceso fermentativo en líneas generales sigue la misma cinética y que la bebida evoluciona dentro de cierto rango de valores que le son característicos como acidez, alcohol, entre otros.

La composición química de las vainas no es uniforme habiendo diferencias, por ejemplo, en el contenido de azúcar. Es de esperar que estas variaciones puedan afectar los niveles finales de alcohol ya que esta fermentación llevada a cabo por el *Saccharomyces cerevisiae* es responsable de gran parte del consumo de azúcar de la algarroba.

Una investigación más detallada de la microbiología de la Aloja sin duda permitirá identificar con más detalle la flora microbiana, sus propiedades fermentativas y su impacto en las propiedades funcionales, nutricionales y sensoriales de la bebida. Las cepas aisladas de la Aloja incluyendo *S. cerevisiae* no solo son de interés para conocer y preservar la biodiversidad sino que ameritan ser investigadas en sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Conclusiones generales

1 Conclusiones generales

El estudio integral realizado en este trabajo de tesis con el fruto del árbol de algarrobo (*Prosopis* sp.) se basa en varios motivos, uno de ellos radica en que la República Argentina constituye el mayor centro de diversificación del género *Prosopis* con la mayor cantidad de especies endémicas. Otro aspecto a tener en cuenta es que la mayoría de las especies de *Prosopis* spp. presentan elevada resistencia a la sequía, temperaturas extremas y alta salinidad como también capacidad para la mejora de suelos áridos a través de la fijación de nitrógeno, lo que le confiere valor en sistemas agro-forestales. En Argentina, se ha estimado que los bosques naturales de *Prosopis* spp. han sido reducidos a aproximadamente un tercio de su área original en 400 años, debido a las actividades antropogénicas. Por lo que la reforestación con especies de algarrobo para la producción del fruto con fines alimentarios, contribuiría no solamente al desarrollo de las comunidades regionales, sino también a disminuir el daño ambiental causado por la deforestación.

Las comunidades regionales del noroeste argentino asocian al fruto de algarrobo y sus productos con sus orígenes e identidad, por lo que investigaciones sobre las propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales de vainas y harinas derivadas del fruto de diferentes especies de *Prosopis* spp. nativas de Argentina permiten contar con conocimiento que permita revalorizar este fruto como ingrediente alimentario. Es en este sentido que los conocimientos alcanzados en este trabajo de tesis contribuyen a dicha revalorización y se resumen a continuación.

1.1 Vainas

La vaina de *Prosopis nigra* (algarrobo negro) es un tanto más pequeña que la de *Prosopis alba* (algarrobo blanco) y contiene menor número de semillas. El rendimiento en harina fue mayor para *P. alba* que para *P. nigra*, pero con valores superiores al 70% en ambos casos. Los parámetros de composición de vainas de *P. alba* fue dependiente del año y zona de recolección. *P. alba* presentó un contenido significativamente mayor de sacarosa que *P. nigra*.

1.2 Harinas

La harina de *P. alba* con la que se elaboraron diversos productos (bocaditos, panificados dulces) presentó menor contenido de proteínas, lípidos y fibra dietaria total, aunque mayor contenido de azúcares solubles, alcanzando valores de sacarosa superiores al 50%. El alto contenido de fibra obtenido para ambas *Prosopis* spp., pero especialmente para *P. alba*, hace de estas harinas un ingrediente ideal para su aplicación en productos panificados enriquecidos en fibra. Por otro lado el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante fue menor en vainas de algarrobo blanco.

En el caso de las harinas, la proveniente de *P. alba* presentó mayor contenido de K, Mg e Fe, pero menor contenido de Ca, Zn y Mn. De todos modos, el contenido de Ca de las harinas de algarroba (160 - 180 mg/100 g harina b.s.) resultó mayor que los informados para harina de trigo (15 mg/100 g harina) y poroto.

La harina de *P. nigra* presentó mayor contenido de lípidos que la de *P. alba*, los lípidos de ambas harinas tienen mayor proporción de ácidos palmítico, oleico y linoleico (AG mayoritarios); y menor proporción (AG minoritarios) en esteárico, araquídico, α -linolénico y araquidónico.

Muchos de los componentes nutricionalmente importantes de un fruto del tipo leguminosa se encuentran en la semilla; las semillas de *P. alba* y *P. nigra* presentaron algunas diferencias. La semilla de *P. alba* presentó mayor contenido de calcio y magnesio que la de *P. nigra*. Estas semillas presentaron una fracción goma (un galactomanano) con una relación molar Man/Gal de 1,35 para *P. nigra* y 1,56 para *P. alba*. Se identificaron entre 13 y 14 ácidos grasos para las semillas de *P. alba* y *P. nigra*, siendo para ambas el linoleico el ácido graso predominante, seguido por el ácido oleico y el palmítico.

El contenido de proteínas resultó mayor para *P. nigra*, aunque con una proporción aminoacídica semejante. Las proteínas de ambas especies de *Prosopis* no fueron deficientes en lisina ni en aminoácidos azufrados, como ocurre con otras proteínas vegetales, lo que las convierte en un buen complemento nutricional. Asimismo, el alto contenido de ácidos aspártico y glutámico como de arginina hacen de estas proteínas, y de la harina de algarroba, un ingrediente adecuado para alimentos para deportistas. Estas proteínas no presentan actividad antitriptica y el análisis mediante anticuerpos policlonales dio como

resultado ausencia de prolaminas lo que significa que estas harinas son ingredientes aptos para productos libres de gluten destinados a personas con celiaquía.

El contenido de polifenoles de *P. nigra* resultó el doble que el de *P. alba*, tanto en semilla entera como en cada parte de la misma, encontrándose el mayor valor en la capa externa o testa. La actividad antioxidante siguió el mismo comportamiento que el contenido de polifenoles, sin embargo resultó significativamente mayor en semillas de *P. nigra*.

El análisis comparativo de una harina de vaina entera (con semillas) y otra de pulpa (sin semillas) demuestra que se puede utilizar la semilla para la obtención de proteínas o goma como fibra soluble y la fracción remanente ser utilizada en productos panificados sin mayores variaciones en el perfil nutricional de los mismos.

Entre las propiedades físicas a evaluar en harinas, una de las más importantes es la actividad acuosa, relacionada con la estabilidad frente al almacenamiento. El contenido de humedad de la harina de *P. alba*, para la misma actividad acuosa ($a_w = 0,7$), resultó mayor que el de la harina de *P. nigra* a 20°C lo que sugiere que la primera puede ser almacenada en un ambiente de mayor humedad. A su vez las curvas de humedad % vs. a_w para *P. alba* se ajustaron, para todas las temperaturas, al modelo de GAB; asimismo el aumento de temperatura disminuyó el contenido de agua de la monocapa (W_m).

1.3 Productos

Los bocaditos presentaron variación de color con el tiempo de cocción y al tiempo final los de mayor aumento fueron las formulaciones con azúcar, sola en la formulación o aportada por la algarroba; mientras que la de menor producción de color resultó la formulación con cantidades equivalentes de los tres aglutinantes. La dureza y masticabilidad resultó mayor en las formulaciones con mayor contenido de algarroba, mientras que los bocaditos más blandos fueron los que no contenían esta harina. Sin embargo, tanto el bocadito que contiene solamente azúcar y el de proporciones equivalentes de aglutinantes presentaron igual aceptabilidad global. Esta última formulación, con iguales proporciones de azúcar, miel y harina de algarroba fue elegida por su mejor apariencia, con igual percepción de aroma y dulzor que el bocadito formulado con azúcar.

Conclusiones generales

Los panificados tipo *muffins* con harina del fruto de algarrobo blanco (*P. alba*) resultaron de mejor calidad que los preparados solamente con harina de maíz o de arroz, tanto desde el punto de vista de las características físicas de aspecto, color y volumen, como de propiedades de textura y sensoriales. La muestra con mayor contenido de harina de algarrobo fue la que presentó menor dureza y consistencia, menor masticabilidad y mayor adhesividad, lo que confiere sensación de humedad al panificado. La miga a su vez resultó ser menos resiliente y elástica. Asimismo, este producto presentó una miga con mayor porcentaje de área ocupada por alvéolos y mayor densidad de alvéolos por unidad de área. Este panificado resultó ser el de color más oscuro, amarronado, por lo que puede constituir un mimético de productos a base de chocolate libre de gluten.

Un producto típico de la región del noroeste argentino elaborado con vainas enteras de algarrobo blanco es la bebida fermentada llamada *aloja*. Las recetas para preparar *aloja* se han ido transmitiendo en forma oral de generación en generación, ya que es una práctica artesanal casera, que depende del elaborador y la región en donde se elabora. Las vainas tienen una microbiota epifítica muy variable y dependiente de la humedad del fruto. Los resultados obtenidos demostraron que el proceso de fermentación es relativamente corto, a juzgar por el consumo de azúcares fermentables y el crecimiento microbiano, de no más de 3 días. La fermentación puede dividirse en dos etapas: una primera hasta las 18-24 h caracterizada por una intensa fermentación láctica que disminuye el pH del medio de 6,4-6,6 inicial a 4,5 lo cual asegura una cierta barrera para los microorganismos patógenos; la acidez alcanzada durante esta etapa es de aproximadamente 0,7 % p/v (expresada como ácido láctico) y la bebida tiene aún un ligero sabor dulce. En la segunda etapa se intensifica la fermentación alcohólica asociada al crecimiento de levaduras en la cual los azúcares se agotan y el nivel de alcohol llega a 6,5 – 7,5 % p/v, a las 44 h la bebida es agria y alcohólica. Mediante el aislamiento en medios selectivos se siguió la evolución de la población microbiana observándose dos tipos de colonias de levaduras y un tipo de bacteria láctica. Utilizando métodos moleculares se logró identificar dos especies de bacterias lácticas *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium* estas especies están presentes en fermentados vegetales y tienen potencial como probióticos. También se lograron identificar dos tipos de levaduras *Wickerhamomyces anomalus* y *Saccharomyces cereviceae*.

A pesar del gran número de variables involucradas (condiciones climáticas previas a la cosecha, forma de recolección y transporte, condiciones de conservación de las vainas, tipo de molienda, características del agua empleada en el proceso) se ha observado en el transcurso de 4 años de ensayos bajo las mismas condiciones de fermentación en el laboratorio con vainas cosechadas en distintos lugares, años y tiempos de almacenamiento (entre una semana y varios meses), que el proceso fermentativo en líneas generales siguió la misma cinética y que la bebida evolucionó dentro de cierto rango de valores de acidez, grado alcohólico, entre otros, que le son característicos. Una investigación más detallada de la microbiología de la *aloja* sin duda permitirá identificar con más detalle la flora microbiana, sus propiedades fermentativas y su impacto en las propiedades funcionales, nutricionales y sensoriales de la bebida.

De lo expuesto, se concluye que si bien las vainas de algarrobo han sido utilizadas tradicionalmente en productos regionales y de consumo local como la *aloja*, su espectro de aplicación puede ampliarse a diversos tipos de alimentos formulados. Las buenas propiedades fisicoquímicas y nutricionales de la harina de algarrobo, hacen que la misma constituya un ingrediente saludable e ideal para la elaboración de diferentes productos horneados dulces, como bocaditos y panificados tipo *muffins*.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis confirman la versatilidad del fruto del algarrobo como una importante materia prima para la elaboración de productos destinados a consumidores en general pero resultando apta también para regímenes libres de gluten.

Anexo

1 Anexo Capítulo I

1.1 Reactivos de Carrez

1.1.1 Solución de Carrez I

Disolver 3,6 g de Hexacianoferrato de potasio $K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ en 100 mL de H_2O (d).

1.1.2 Solucion de Carrez II

Disolver 7,2 g de sulfato de cinc $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 mL de H_2O .

1.2 Reactivo de Mortimer

Disolver 0,016 g de rojo de metilo y 0,083 g de verde de bromocresol en etanol, luego llevar a volumen en matraz de 100 mL.

1.3 Reactivos para determinar antioxidantes

1.3.1 Solución madre $ABTS^{\bullet+}$

El radical fue preparado pesando 7 mmol de la sal amoniacal de ABTS y 2.45 mmol de $K_2S_2O_8$ a las que se disolvieron en 1L de H_2O (bd) y se lo dejo reaccionar toda la noche a $20^\circ C$ en la obscuridad.

1.3.2 Solución de reacción

La solución de reacción de $ABTS^{\bullet+}$ fue preparada diluyendo la solución madre con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.03 a 734 nm.

1.4 Hemoglobina bovina

Pesar 2 g de hemoglobina y disolverla en NaOH 0,5N, agregar 64 mL de agua y 36 g urea, dejar en reposo una hora para que la espuma se destruya, luego agregar 8 g más de urea y ajustar el pH a 8 con solución de H_3PO_4 .

La urea al ser un agente caotrópico produce la desnaturalización de la hemoglobina, lo que facilita el ataque de la proteasa durante la reacción.

1.5 Reactivos utilizados en electroforesis

1.5.1 Buffer de extracción

Buffer utilizado para la extracción de proteínas solubles, el mismo se preparó con H₂O (mq) y todos los reactivos utilizados para prepararlo son grado electroforético Sigma.

Reactivo	Concentración
Trizma® base	0,086 M
Glicina	0,090 M
EDTA	0,003 M
pH 8	

1.5.2 Buffer muestra

Buffer utilizado para la siembra de proteínas en el gel, el mismo se preparó con H₂O (mq) y todos los reactivos utilizados para prepararlo son grado electroforético Sigma.

Reactivo	Concentración
Trizma® base	0,086 M
Glicerol	40 % P/V
Azul de bromofenol	0,02 % P/V
pH 8	

1.5.3 Gel apilador

Reactivos	Concentración
Acrilamida (30% P/V) – Biscacrilamida (0,8%P/V)	400 µL
Buffer stacking	750 µL
Agua bidestilada	1850 µL
Temed (0,4% V/V)	3 µL
Persulfato de amonio (10% P/V)	100 µL
Volumen total	3 mL

1.5.4 Gel separador

Gel separador al 11%	
Reactivos	Concentración
Acrilamida (30%P/V) – Biscacrilamida (0,8%P/V)	2400 µl
Buffer separador 4X	1500 µl
Agua bidestilada	2100 µl
Temed (0,4%)	6 µl
Persulfato de amonio (10%)	50 µl
Volumen total	6 mL

1.5.5 Buffer stacking

Reactivo	Concentración
Trizma® base	6 % P/V
SDS	0,4 % P/V
pH 6,8	

1.5.6 Buffer separador

Reactivo	Concentración
Trizma® base	18,1 % P/V
SDS	0,4 % P/V
pH 8,8	

1.5.7 Buffer de corrida 1X

Reactivo	Concentración
Trizma® base	0,3 % p/v
SDS	0,1 % p/v
Glicina	1,44 % p/v
pH 8,3	

1.6 Certificado harinas libres de gluten



Servicio de Determinación
Cuantitativa de Prolaminas
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata



LISIN
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DEL SISTEMA INMUNE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Certificación de Productos Libres de Gluten La Plata, 11 de noviembre de 2015

Solicitante:
Cecilia Puppo

Características técnicas:

La determinación de gliadinas es realizada mediante ensayo inmunoquímico competitivo empleando anticuerpos policlonales, basado en la técnica desarrollada en nuestro laboratorio según la publicación: Chirido et al, Food Agric. Immunol. (1995) 7: 333-343. Dicho ensayo presenta un límite de detección de 0.1 mg de gliadinas por cada 100 gramos de muestra.

Las muestras se analizan en alícuotas de extractos obtenidos por triplicado. Cada una de dichas alícuotas es analizada por duplicado en dos ensayos independientes. Los resultados corresponden al promedio de al menos 12 ensayos y se expresan, en base a peso neto, como miligramos de prolaminas por 100 gramos de muestra (mg/100 g). Se indica como no detectable (nd) el contenido de prolaminas inferior a 0.1 mg/100 g.

En ciertas muestras, el producto es subdividido y el análisis realizado sobre cada uno de los componentes en forma independiente.

Muestras recibidas: 23 de octubre de 2015

Producto	Resultado (mg prolaminas/100g)
P. alba Muestra no identificada	nd
P. Nigra Muestra no identificada	nd



Dr. Fernando Chirido

Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Calles 47 y 115. (1900). La Plata. Argentina (1900)
Teléfonos: [+54] (221) 425 0497 - 423 0121 / 5333 (int 45) | E-mail: fchirido@biol.unlp.edu.ar

2 Anexo Capítulo II

2.1 Planilla de ordenamiento por preferencia

Ordenamiento de preferencia bocadito dulce con semillas

Nombre:.....Evaluador:.....

Usted recibirá cinco muestras de un *snack* dulce a base de semillas. Por favor ordénelas según su grado de preferencia, escribiendo el código de la muestra que más le gusta a la izquierda siguiendo hacia la derecha con las que le gustan menos

.....
 gusta más gusta menos

Observaciones:.....

2.2 Planilla aceptabilidad de bocaditos por atributos

Aceptabilidad de bocaditos a base de semillas

Nombre:.....Evaluador:.....

Muestra 314

	Disgusta								Gusta
Aceptabilidad general	<input type="radio"/>								
Apariencia	<input type="radio"/>								
Cohesividad*	<input type="radio"/>								
Aroma	<input type="radio"/>								
Dulzor	<input type="radio"/>								
Astringencia	<input type="radio"/>								

Muestra 478

	Disgusta								Gusta
Aceptabilidad general	<input type="radio"/>								
Apariencia	<input type="radio"/>								
Cohesividad*	<input type="radio"/>								
Aroma	<input type="radio"/>								
Dulzor	<input type="radio"/>								
Astringencia	<input type="radio"/>								

*Cohesivo: aglutinante, adherente, adhesivo.

Observaciones:.....

3 Anexo Capítulo III

3.1 Planilla utilizada para la evaluación sensorial

Aceptabilidad de panificados libres de gluten

Nombre:.....

Evaluador:.....

Usted recibirá cuatro muestras de panificados libres de gluten con agregado de harina de algarrobo. Por favor, pruebe las mismas siguiendo el orden de la planilla sin comparar entre muestras y marque las casillas de acuerdo a su preferencia.

Muestra 550

	Disgusta								Gusta
Aceptabilidad global	<input type="radio"/>								
Color	<input type="radio"/>								
Aroma	<input type="radio"/>								
Sabor	<input type="radio"/>								
	Baja								Alta
Masticabilidad *	<input type="radio"/>								

Muestra 733

	Disgusta								Gusta
Aceptabilidad global	<input type="radio"/>								
Color	<input type="radio"/>								
Aroma	<input type="radio"/>								
Sabor	<input type="radio"/>								
	Baja								Alta
Masticabilidad *	<input type="radio"/>								

Muestra 967

	Disgusta								Gusta
Aceptabilidad global	<input type="radio"/>								
Color	<input type="radio"/>								
Aroma	<input type="radio"/>								
Sabor	<input type="radio"/>								
	Baja								Alta
Masticabilidad *	<input type="radio"/>								

Muestra 211

	Disgusta								Gusta
Aceptabilidad global	<input type="radio"/>								
Color	<input type="radio"/>								
Aroma	<input type="radio"/>								
Sabor	<input type="radio"/>								
	Baja								Alta
Masticabilidad *	<input type="radio"/>								

*Masticabilidad: Resistencia del panificado a desintegrarse en la boca cuando se lo mastica.

4 Anexo Capítulo IV

4.1 Medios de cultivo

4.1.1 Medio WL

El medio WL se preparó de acuerdo a la siguiente tabla; como primer paso se agregó el cloranfenicol y se lo solubilizó en agua debido a su baja solubilidad, luego se agregaron el resto de los componentes y se llevó a pH con HCl. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se incubó a 30°C durante 7 días momento en el cual se realizó el recuento de microorganismos, prestando atención a la morfología de las colonias y al aroma que emiten durante el crecimiento.

Compuesto	g/L
Glucosa	50
Peptona	5
Extracto de levadura	4
KH ₂ PO ₄	0,55
ClK	0,425
ClCa	0,125
SO ₄ Mg	0,125
Cl ₂ Fe	0,0025
SO ₄ Mn	0,0025
Verde de bromocresol	0,022
Agar	15
Cloranfenicol	0,1
pH 5,5	

4.1.2 Medio MRS

El medio MRS utilizado fue adquirido ya formulado al laboratorio Britania (Buenos Aires, Argentina). Se suspendieron 64 g/L del polvo en agua destilada, se llevó a ebullición hasta completa disolución de los componentes. Se lo autoclavó 15 minutos a 121°C, cuando el medio de cultivo estuvo a una temperatura inferior a los 50 °C se le agregó dentro del flujo laminar cantidad suficiente de cicloheximida para lograr una concentración de 40 ppm. Se inoculó en superficie incubándose a 30°C de forma aeróbica durante 5 días, tiempo al cual se hizo el recuento de organismos. El MRS líquido

utilizado también fue Britania, la composición es igual difiriendo únicamente en que el medio líquido no lleva agar.

Compuesto	g/L
Peptona	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Glucosa	20
K ₂ HPO ₄	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
SO ₄ Mg	0,2
SO ₄ Mn	0,05
Agar	13
Monoleato de sorbitan	1 mL
pH 6,4 ± 0,2	

4.1.3 Medio Mac Conkey

Medio utilizado para el desarrollo de microorganismos de fácil desarrollo aerobios y anaerobios facultativos Gram negativos, a partir de muestras de agua y alimentos. Todas las bacterias de la familia de las enterobacterias desarrollan en este medio.

Compuesto	g/L
Peptona de carne	15
Peptona de gelatina	17
Tripteina	1,7
Lactosa	10
Mezcla de sales biliares N°3	1,5
NaCl	5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5
pH 7,1	

4.1.4 Medio VRBA

Medio selectivo para recuento de coliformes en alimentos.

Compuesto	g/L
Extracto de levadura	3
Peptona	7
Sales biliares	1,5
Lactosa	10
NaCl	5
Agar	15
Rojo Neutro	0,03
Cristal Violeta	0,002
pH 7,4	

4.1.5 Medio MSA

Medio utilizado para el crecimiento de bacterias Gram positivas, contiene alta concentración salina haciéndolo selectivo para estafilococos.

Compuesto	g/L
Extracto de carne	1
Peptona de carne	5
Tripteina	5
Manitol	10
NaCl	75
Rojo de fenol	0,025
Agar	15
pH 7,4	

4.1.6 Medio PCA

El medio PCA utilizado fue adquirido ya formulado al laboratorio Britania. Se suspendieron 23,5 g/L del polvo en agua destilada, se llevó a ebullición hasta completa disolución de los componentes. Se autoclavó 15 minutos a 121°C, cuando el medio de cultivo estuvo a una temperatura inferior a los 50 °C se le agregó dentro del flujo laminar cantidad suficiente de cicloheximida para lograr una concentración de 40 ppm. Se inoculó en superficie incubándose a 30°C durante 24-48 h, tiempo al cual se hizo el recuento de microorganismos.

Compuesto	g/L
Extracto de levadura	25
Tripteina	50
Glucosa	1
Agar	15
pH 7,2 ± 0,2	

4.1.7 Medio de Wickerham

Medio utilizado para el crecimiento de levaduras que van a ser utilizadas para la extracción de ADN.

Compuesto	g/L
Glucosa	10
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3

4.1.8 Medio EMB

El medio EMB utilizado fue adquirido ya formulado al laboratorio Britania, este medio fue utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales, permitiendo el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

Compuesto	g/L
Peptona	10
Lactosa	5
Sacarosa	5
Fosfato dipotásico	2
Agar	13,5
Eosina	0,4
Azul de metileno	0,065
pH 7,2	

4.1.9 Medio Luria Bertani (EB)

Medio de cultivo apto para el crecimiento de enterobacterias.

Compuesto	g/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
pH 7,5	

4.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleada para diferenciar organismos denominados Gram positivos que se colorean de color azul y las bacterias Gram negativas las cuales se tiñen de color rojo; esta coloración diferencial se debe a propiedades diferenciales que tienen las paredes bacterianas. En esta tinción se fijan las bacterias mediante un frotis, se agrega cristal violeta y se deja actuar 120 segundos. Se coloca solución de Lugol durante 60 seg y se lava con agua. Luego se decolora durante 10 seg con la mezcla acetona:agua 1:1. Se agrega safranina durante 120 seg y se lava con agua. Se observa al microscopio óptico (aumento?? Marca, ciudad, país) la coloración de las colonias.

4.3 Prueba de la catalasa

La catalasa y la peroxidasa son enzimas que destruyen el H_2O_2 dando como reacción positiva la aparición de burbujas de oxígeno. Para realizar la prueba se toman bacterias de un cultivo sólido se extienden en un portaobjeto y se le agrega una gota de H_2O_2 , si la reacción es catalasa positiva se ve desprendimiento de O_2 , si es catalasa negativa no hay reacción.

4.4 Hidróxido de sodio para determinación de acidez

Se preparó una solución 0,1 N de hidróxido de sodio con agua destilada hervida enfriada temperatura ambiente. La solución se tituló usando biftalato de potasio ($C_8H_5O_4K$) previamente secado a $105^\circ C$ durante 8 horas, como estándar interno. Se pesó 1 g de biftalato de potasio con una precisión de cuatro dígitos $0,2000g \pm 0,002$ al que se le agregó 10mL de agua destilada hervida con pipeta de doble aforo. Esta solución

se tituló con el hidróxido a valorar, calculándose la normalidad siguiendo la siguiente ecuación:

$$N(\text{NaOH}) = \frac{g_{\text{debiftalato pesados}} * 1000}{\text{mL NaOH gastados} * PM_{\text{biftalato}}}$$

4.5 Fase móvil para TLC

Se prepara la fase móvil utilizando los compuestos y cantidades descritos en la tabla.

Compuesto	Cantidad
n-butanol	100 mL
Agua destilada	100 mL
Ácido fórmico	10,7 mL
Verde de bromocresol 1% P/V	15 mL

En un vaso de precipitado a temperatura ambiente y en agitación se agrega el agua destilada, el ácido fórmico, la solución de verde de bromocresol y el n-butanol; se lleva a ampolla de decantación durante toda la noche descartando al día siguiente la fase no coloreada

4.6 Geles de agarosa

4.6.1 Soluciones de trabajo

4.6.1.1 *Buffer TAE (50X)*

Compuesto	Cantidad
Tris Base	242 g/L
Ácido acético glacial	57,1 mL / L
EDTA	14,6 g /L
La solución de trabajo utilizada es 1X	

4.6.1.2 *Bromuro de etidio*

El bromuro de etidio es un agente intercalante, utilizado en electroforesis en gel de agarosa, cuando se expone a luz UV emite un tono rojo anaranjado que se

intensifica luego de haberse unido a las cadenas de ADN. Se prepara una solución madre de 10 mg / mL en agua destilada.

4.6.1.3 *Buffer de muestra*

Compuesto	Cantidad
Azul de bromofenol	0,025 % p/v
Glicerol	70 % p/v
EDTA	12 mM
H ₂ O (bd) c.s.p	100 mL

4.6.2 Preparación de los geles

Se midió con probeta la cantidad necesaria del buffer TAE 1X, luego se trasvasó a un erlenmeyer, se agregaron los gramos de agarosa necesaria según el porcentaje del gel que se desee armar se calentó en microondas hasta que la agarosa estuvo completamente soluble. Cuando la temperatura de la solución disminuyó al punto en el que se pudo tomar el erlenmeyer de la base con la mano, se agregaron 4 µL de bromuro de etidio al 1% p/v cada 100 mL de solución. Se preparó el gel en un molde especial para ese fin.

4.6.3 Desarrollo de los geles

Una vez preparados los geles, los mismos se sumergieron en buffer TAE 1X hasta que quedaron totalmente tapados. Una vez cubiertos por el buffer se sembraron 6 µL de muestra compuesta por 5µL de muestra de ADN y 1 µL de buffer de corrida. En una de las calles de gel se sembró un marcador de pares de bases que sirve para identificar cuantos pares de bases tiene la muestra que se está corriendo. Una vez sembrado se les aplicó corriente a 100 V (150 mA) durante una hora. El ADN que está cargado negativamente migra hacia el cátodo. Los geles una vez terminados de correr se observaron con luz UV a 260 nm, la que hace que el ADN intercalado con bromuro de etidio fluoreszca.

4.7 Biología molecular

4.7.1 Primers Bacterias

27F (Forward 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

1492R (Reverse 5'- TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')

4.7.2 Primers Levaduras

NL-1 (Forward 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')

NL-4 (Reverse 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')

4.7.3 ARNr 16s

En la tabla se muestran todos los reactivos utilizados para la amplificación del ARNr 16S. La mezcla de reacción se preparó dentro un tubo eppendorf de 100µL en baño de hielo, teniendo ciertos recaudos como poner el ADN o molde en primer lugar asegurándose que la gota quede en el fondo del tubo. El agua utilizada fue MiliQ o agua destilada filtrada por filtro de membrana de 0,22 µm y esterilizada en autoclave 15 minutos 121°C. El último recaudo es que la polimerasa se agregó sin sacar del frízer.

Orden	Reactivos	Concentración inicial	Concentración en la mezcla de reacción	50 µL finales mezcla de reacción
1	ADN	150 ηg / µL	~3ηg / µL	1 µL
2	H ₂ O			35,25 µL
3	Buffer	10X	1X	5 µL
4	MgCl ₂	50 mM	1,5mM	1,5 µL
5	dNTPS (Invitrogen)*	10 mM c/u	0,4 mM c/u	2 µL
6	Primer 27F (Invitrogen)	10 µM	0,5 µM	2,5µL
7	Primer 1492R (Invitrogen)	10 µM	0,5 µM	2,5µL
8	GoTaq® Polimerasa	5 U / µL	1,25U	0,25 µL

*dNTP: mezcla de desoxinucleotidotrifosfato

4.7.4 Dominio D1/D2 levaduras

En la tabla se muestran todos los reactivos utilizados para realizar la amplificación del dominio D1/D2 del ARNr 28S. La mezcla de reacción se preparó dentro un tubo eppendorf de 100µL en baño de hielo, teniendo ciertos recaudos como poner el ADN o molde en primer lugar asegurándose que la gota quede en el fondo del tubo, al agua debe ser en lo posible MiliQ o agua destilada filtrada por filtro de membrana de 0,22 µm y esterilizada en autoclave 15 minutos 121°C, el ultimo recaudo es que la polimerasa se agrega sin sacar del frízer.

Orden	Reactivos	Concentración inicial	Concentración en la mezcla de reacción	50 μ L finales mezcla de reacción
1	ADN	150 η g / μ L	\sim 3 η g / μ L	1 μ L
2	H ₂ O			32,75 μ L
3	Buffer Go Taq®Promega	5X	1X	10 μ L
4	dNTPS (Invitrogen)*	10 mM c/u	0,2 mM c/u	1 μ L
5	Primer NL1 (Sigma)	10 μ M	0,5 μ M	2,5 μ L
6	Primer NL4 (Sigma)	10 μ M	0,5 μ M	2,5 μ L
7	Go Taq®Polimerasa	5 U / μ L	1,25U	0,25 μ L

*dNTP: mezcla de desoxinucleotidotrifosfato

4.8 Buffer de lisis para extracción de ADN de levaduras

En la tabla se muestran los componentes del buffer de lisis, todos los reactivos utilizados son aptos para biología molecular, una vez solubilizados los componentes, el buffer se lleva a pH 8.

Compuesto	Cantidad
Triton X-100	2 % p/v
SDS	1 % p/v
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8	

Bibliografía

- ABRAHAM, E. y PRIETO, M. D. R. 1981. Enfoque diacrónico de los cambios ecológicos y de las adaptaciones humanas en el NE árido mendocino. *Cuadernos del CEIFAR*, 8, 107-139.
- ACHI, O. K. 1992. Microorganisms associated with natural fermentation of *Prosopis africana* seeds for the production of okpiye. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42, 297-304.
- ALAEEDINI, A. y GREEN, P. H. R. 2005. Narrative Review: Celiac Disease: Understanding a Complex Autoimmune Disorder. *Annals of Internal Medicine*, 142, 289-298.
- ALAIZ, M., NAVARRO, J. L., GIRÓN, J. y VIOQUE, E. 1992. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography A*, 591, 181-186.
- ALAKOMI, H.-L., SKYTÄ, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K. y HELANDER, I. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66, 2001-2005.
- ANDRADE, R. D., LEMUS, R. y PÉREZ, C. 2011. Models of sorption isotherms for food: uses and limitations. *Vitae*, 18, 325-334.
- AOAC 1998. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Md.: AOAC International.
- APÁS, A. L., ARENA, M. E., DRAKSLER, D. y GONZÁLEZ, S. N. 2008. Utilization of Sugarcane Industrial Residues as Animal Food and Probiotic Medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106, 363-367.
- APHA, A. 1985. WPCF (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association, Washington, DC*.
- ASTM 2013. Standard Specification for Woven Wire Test Sieve Cloth and Test Sieves. West Conshohocken, PA.: ASTM International.
- AYAZ, F. A., TORUN, H., GLEW, R. H., BAK, Z. D., CHUANG, L. T., PRESLEY, J. M. y ANDREWS, R. 2009. Nutrient content of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) flour prepared commercially and domestically. *Plant foods for human nutrition*, 64, 286-292.
- AZLYN, K., TOMA, R., KOVAL, J. y CHRISTOPHER, S. 1989. Formulation and sensory evaluation of a low calorie fiber bar. *Journal of Food Science*, 54, 727-729.
- BALOGUN, A. M. y FETUGA, B. L. 1985. Fatty acid composition of seed oils of some members of the leguminosae family. *Food Chemistry*, 17, 175-182.
- BARMINAS, J. T., MAINA, H. M. y ALI, J. 1998. Nutrient content of *Prosopis africana* seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 325-328.
- BAYLIS, C., UYTENDAELE, M., JOOSTEN, H. y DAVIES, A. 2011. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry*.
- BECKER, R. y GROSJEAN, O.-K. K. 1980. A compositional study of pods of two varieties of mesquite (*Prosopis glandulosa*, *P. velutina*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 22-25.
- BECKER, R., WHEELER, E. L., LORENZ, K., STAFFORD, A. E., GROSJEAN, O. K., BETSCHART, A. A. y SAUNDERS, R. M. 1981. A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science*, 46, 1175-1180.
- BENGOECHEA, C., ROMERO, A., VILLANUEVA, A., MORENO, G., ALAIZ, M., MILLÁN, F., GUERRERO, A. y PUPPO, M. C. 2008. Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food Chemistry*, 107, 675-683.
- BIGNE, F., PUPPO, M. C. y FERRERO, C. 2016. Fibre enrichment of wheat flour with mesquite (*Prosopis* spp.): Effect on breadmaking performance and staling. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 1008-1016.
- BOUSTANI, P. y MITCHELL, V.-W. 1990. Cereal bars: a perceptual, chemical and sensory analysis. *British Food Journal*, 92, 17-22.
- BOWER, J. A. y WHITTEN, R. 2000. Sensory characteristics and consumer liking for cereal bar snack foods. *Journal of Sensory Studies*, 15, 327-345.
- BRAVO, L., GRADOS, N. y SAURA-CALIXTO, F. 1994. Composition and potential uses of mesquite pods (*Prosopis pallida* L): Comparison with carob pods (*Ceratonia siliqua* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 303-306.
- BREA, A. 2015. *Utilización de pectinasas en el proceso de elaboración del vino de ciruela de Berisso*. Tesis para obtener el título de Lic. En Biotecnología y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata.

Bibliografía

- BURKART, A. 1952. *Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas: Descripción sist. de la familia, los generos y las principales especies, de su distribución y utilidad en el país y en las regiones limítrofes. Ilustr. con 130 fig. y. 23 láminas*, Acme Agency.
- BURKART, A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). Part 1 - 2. *Journal of the Arnold Arboretum*, 57, 219-249 // 450-425.
- CAA 2015. Código Alimentario Argentino, Capítulo IX: Alimentos farináceos – cereales, harinas y derivados. ANMAT
- CASHMAN, K. D. y FLYNN, A. 1999. Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 477-487.
- CATTANEO, F., SAYAGO, J. E., ALBERTO, M. R., ZAMPINI, I. C., ORDOÑEZ, R. M., CHAMORRO, V., PAZOS, A. y ISLA, M. I. 2014. Anti-inflammatory and antioxidant activities, functional properties and mutagenicity studies of protein and protein hydrolysate obtained from *Prosopis alba* seed flour. *Food Chemistry*, 161, 391-399.
- CIAN, R. E., GARZÓN, A. G., ANCONA, D. B., GUERRERO, L. C. y DRAGO, S. R. 2015. Hydrolyzates from *Pyropia columbina* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 881-888.
- CIVILLE, G. V., MEILGARD, M. y CARR, B. 1999. Sensory evaluation techniques. Editorial: Elsevier Academic Press.
- CODA, R., CASSONE, A., RIZZELLO, C. G., NIONELLI, L., CARDINALI, G. y GOBBETTI, M. 2011. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and environmental microbiology*, 77, 3484-3492.
- CONVERTI, A. y PEREGO, P. 2002. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 303-309.
- COOK, M. L., KEYSER, W. L., SWANSON, P., ZIELKE, M. W. y ZIELINSKI, W. J. 1984. Food bar. Google Patents.
- CHIRDO, F. G., AÑÓN, M. C. y FOSSATI, C. A. 1995. Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food and Agricultural Immunology*, 7, 333-343.
- CHIRIFE, J. y BUERA, M. 1994. Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated/semimoist food systems. *Journal of Food Science*, 59, 921-927.
- CHOGE, S., PASIECZNIK, N., HARVEY, M., WRIGHT, J., AWAN, S. y HARRIS, P. 2007. *Prosopis* pods as human food, with special reference to Kenya. *Water SA*, 33.
- D'ANTONI, H. L. y SOLBRIG, O. T. 1977. Algarrobo in South American cultures past and present. In: B.B., S. (ed.) *Mesquite: its biology in two desert scrub ecosystems*. Stroudsburg, Pa. : Dowden, Hutchinson & Ross ; [New York] : exclusive distributor, Halsted Press, c1977.
- DA SILVA, C. G. M., DE MELO FILHO, A. B., PIRES, E. F. y STAMFORD, T. L. M. 2007. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). *Food Science and Technology (Campinas)*, 27, 733-736.
- DAKIA, P. A., WATHELET, B. y PAQUOT, M. 2007. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry*, 102, 1368-1374.
- DE MAN, J., ROGOSA, M. y SHARPE, M. 1960. Cultivation medium for lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*, 23, 130-135.
- DE VRIES, M. C., VAUGHAN, E. E., KLEEREBEZEM, M. y DE VOS, W. M. 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
- DELANOE, D., MAILLARD, C. y MAISONDIEU, D. 2003. *El Vino : del análisis a la elaboración*, Zaragoza, Acribia.
- DEMIRKESEN, I., MERT, B., SUMNU, G. y SAHIN, S. 2010. Rheological properties of gluten-free bread formulations. *Journal of Food Engineering*, 96, 295-303.
- DOYLE, M. P. y BUCHANAN, R. L. 2012. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, American Society for Microbiology Press.

- DURÁN, P., ABEYÁ, E., BIGLIERI, A., KOGAN, L. y MANGIALAVORI, G. 2007. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud Documento de Resultados. *In: SALUD, M. D.* (ed.). Buenos Aires, Argentina.
- EDWARDS, U., ROGALL, T., BLÖCKER, H., EMDE, M. y BÖTTGER, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- ELIASSON, A.-C. 2006. *Carbohydrates in food*, Boca Raton, FL, CRC/Taylor & Francis.
- ELIZAQUÍVEL, P., PÉREZ-CATALUÑA, A., YÉPEZ, A., ARISTIMUÑO, C., JIMÉNEZ, E., COCCONCELLI, P. S., VIGNOLO, G. y AZNAR, R. 2015. Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 198, 9-18.
- EMERENINI, E., AFOLABI, O., OKOLIE, P. y AKINTOKUN, A. 2013. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis. *British Microbiology Research Journal*, 3, 368.
- ESCOBAR, B., ESTÉVEZ A, A. M., FUENTES G, C. y VENEGAS F, D. 2009. Uso de harina de cotiledón de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz) como fuente de proteína y fibra dietética en la elaboración de galletas y hojuelas fritas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59, 191-198.
- ESCOBAR, B., ESTÉVEZ, A. y GUÍÑEZ, M. 2000. Almacenamiento de barras de cereales elaboradas con cotiledones de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 50, 152-156.
- ESTÉVEZ, A., ESCOBAR, B., VASQUEZ, M., CASTILLO, E., ARAYA, E. y ZACARIAS, I. 1995. Cereal and nut bars, nutritional quality and storage stability. *Plant Foods for Human Nutrition*, 47, 309-317.
- ESTÉVEZ, A. M., FIGUEROLA, F., BERNUY, E. y SÁENZ, C. 2014. Dietary fibre concentrate from Chilean algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) pods: Purification and characterization. *Food Science and Technology International*, 20, 629-635.
- FAGG, C. y STEWART, J. 1994. The value of Acacia and *Prosopis* in arid and semi-arid environments. *Journal of Arid Environments*, 27, 3-25.
- FAO 2007. Cereals, Pulses, Legumes and Vegetable Proteins. Joint FAO/WHO Food Standards Programme.
- FAO/WHO 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations & United Nations University (2007) Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *WHO Technical Report Series*.
- FASANO, A. y CATASSI, C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120, 636-651.
- FELKER, P. 2009. Unusual physiological properties of the arid adapted tree legume *Prosopis* and their applications in developing countries. *Perspectives in biophysical plant ecophysiology: A tribute to Park S. Nobel*. E. De la Barrera and W.K. Smith ed.: Universidad Nacional Autónoma de México
- FELKER, P. y BANDURSKI, R. S. 1977. Protein and amino acid composition of tree legume seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 791-797.
- FELKER, P., CLARK, P., LAAG, A. E. y PRATT, P. F. 1981. Salinity tolerance of the tree legumes: Mesquite (*Prosopis glandulosa* var. *torreyana*, *P. velutina* and *P. articulata*) Algarrobo (*P. chilensis*), Kiawe (*P. pallida*) and Tamarugo (*P. tamarugo*) grown in sand culture on nitrogen-free media. *Plant and Soil*, 61, 311-317.
- FELKER, P., GRADOS, N., CRUZ, G. y PROKOPIUK, D. 2003. Economic assessment of production of flour from *Prosopis alba* and *P. pallida* pods for human food applications. *Journal of Arid Environments*, 53, 517-528.
- FELKER, P. y GUEVARA, J. C. 2003. Potential of commercial hardwood forestry plantations in arid lands—an economic analyses of *Prosopis* lumber production in Argentina and the United States. *Forest Ecology and Management*, 186, 271-286.
- FELKER, P., LOPEZ, C., SOULIER, C., OCHOA, J., ABDALA, R. y EWENS, M. 2001. Genetic evaluation of *Prosopis alba* (algarrobo) in Argentina for cloning elite trees. *Agroforestry Systems*, 53, 65-76.
- FERREIRO, F. 2015. *Caracterización microbiológica de la Aloja: una bebida autóctona del NOA*. Tesis para obtener el título de Licenciada En Biotecnología y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata.

Bibliografía

- FLYNN, N., MEININGER, C., HAYNES, T. y WU, G. 2002. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 427-438.
- FOWELL, R. 1965. The identification of wild yeast colonies on lysine agar. *Journal of Applied Bacteriology*, 28, 373-383.
- FUGELSANG, K. C. y EDWARDS, C. G. 2007. *Wine microbiology*, New York, NY, Springer.
- GALERA, F. 2000. Las especies del género *Prosopis* (algarrobos) de América Latina con especial énfasis en aquellas de interés económico. [on line]. *Argentina: FAO*.
- GALLAGHER, E., GORMLEY, T. R. y ARENDT, E. K. 2003. Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering*, 56, 153-161.
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E. y SUZZI, G. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International journal of food microbiology*, 64, 105-117.
- GARRIDO-FERNANDEZ, A., DURAN-QUINTANA, M., GONZALEZ-CANCHO, F. y FERNANDEZ-DIEZ, M. 1972. Aceitunas negras maduras en salmuera. II. Estudio físico-químico y microbiológico de la fermentación. *Grasas y aceites*.
- GENTILE, M. 2001. Chiqui: etnohistoria de una creencia andina en el noroeste argentino. *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, 30, 27-102.
- GHARNIT, N., EL MTLI, N., ENNABILI, A. y SAYAH, F. 2006. Pomological characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). *Moroccan J. Bio*, 2, 1-11.
- GIMÉNEZ, A., RÍOS, N., MOGLIA, G. y LÓPEZ, C. 1998. Leño y corteza de *Prosopis alba* Griseb., algarrobo blanco, Mimosaceae, en relación con algunas magnitudes dendrométricas. *Bosque*, 19, 53-62.
- GIOVANNETTI, M. A., LEMA, V. S., BARTOLI, C. G. y CAPPARELLI, A. 2008. Starch grain characterization of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz and *P. flexuosa* DC, and the analysis of their archaeological remains in Andean South America. *Journal of Archaeological Science*, 35, 2973-2985.
- GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171.
- GIRAUD, E., LELONG, B. y RAIMBAULT, M. 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, 96-99.
- GONZALES, R. y CARRILLO, D. 1987. *Nutrición humana. Manual de prácticas*, Ed. Pueblo y Educación, La Habana, Cuba.
- GONZÁLEZ GALÁN, A., CORRÊA, A. D., PATTO DE ABREU, C. M. y PICCOLO BARCELOS, M. D. F. 2008. Caracterización química de la harina del fruto de *Prosopis* spp. procedente de Bolivia y Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58, 309-315.
- GRADOS, N. y CRUZ, G. 1996. New Approaches to Industrialization of Algarrobo (*Prosopis pallida*) Pods in Peru. In: FELKER, P. y MOSS, J. (eds.) *Prosopis: Semiarid Fuelwood and Forage Tree Building Consensus for the Disenfranchised*. Texas: Center for Semi-Arid Forest Resources, .
- GRAY, M. W., SANKOFF, D. y CEDERGREN, R. J. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 12, 5837-5852.
- GREEN, P. H. R. y JABRI, B. 2006. Celiac Disease. *Annual Review of Medicine*, 57, 207-221.
- GRUENDEL, S., GARCIA, A. L., OTTO, B., MUELLER, C., STEINIGER, J., WEICKERT, M. O., SPETH, M., KATZ, N. y KOEBNICK, C. 2006. Carob Pulp Preparation Rich in Insoluble Dietary Fiber and Polyphenols Enhances Lipid Oxidation and Lowers Postprandial Acylated Ghrelin in Humans. *The Journal of Nutrition*, 136, 1533-1538.
- HAGER, A.-S. y ARENDT, E. K. 2013. Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. *Food Hydrocolloids*, 32, 195-203.
- HAGER, A.-S., WOLTER, A., CZERNY, M., BEZ, J., ZANNINI, E., ARENDT, E. y CZERNY, M. 2012. Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of commercial gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *European Food Research and Technology*, 235, 333-344.
- HALSEY, G. 1948. Physical adsorption on non-uniform surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 16, 931-937.

- HALL, R., HAMPL, J. S., STANTON, J. V. y MONTE, W. C. 2003. Acceptability of mesquite as a flavoring agent among Native Americans in Arizona. *Journal of Sensory Studies*, 18, 269-275.
- HAMES, B. D. 1998. *Gel electrophoresis of proteins : a practical approach*, Oxford ; New York, Oxford University Press.
- HOUSE, W. A. 1999. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field Crops Research*, 60, 115-141.
- HURTADO, A., REGUANT, C., ESTEVE-ZARZOSO, B., BORDONS, A. y ROZÈS, N. 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*, 41, 738-744.
- IBAÑEZ, M. A. C. y FERRERO, C. 2003. Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds. *Food Research International*, 36, 455-460.
- INCUPU 1991. *El monte nos da comida En: Salud y Alimentación. Instituto de Cultura Popular. Argentina. Tomo I: 3-7.*
- INTI 2011. Programa de puebas desempeño de productos "barritas de cereal".
- IRAM 1982. IRAM 5650-Parte II Aceites y grasas animales y vegetales. Método rápido de preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos, para su utilización en cromatografía gaseosa.
- JAMES, S. A., O'KELLY, M. J., CARTER, D. M., DAVEY, R. P., VAN OUDENAARDEN, A. y ROBERTS, I. N. 2009. Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. *Genome research*, 19, 626-635.
- JOHNSON, P. y BRENNAN, J. 2000. Moisture sorption isotherm characteristics of plantain. *Journal of Food Engineering*, 44, 79-84.
- JORDAN, S. L., GLOVER, J., MALCOLM, L., THOMSON-CARTER, F. M., BOOTH, I. R. y PARK, S. F. 1999. Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Applied and environmental microbiology*, 65, 1308-1311.
- JOVANOVICH, G., PUPPO, M. A. C., GINER, S. A. y AÑÓN, M. A. C. 2003. Water uptake by dehydrated soy protein isolates: Comparison of equilibrium vapour sorption and water imbibing methods. *Journal of food engineering*, 56, 331-338.
- JUAREZ, E., CAMPOS, N., POGGI, J., HOYOS, G., MALDONADO, S. y FEUILLADE, D. 2003. *Aprovechamiento familiar de la algarroba. Informe Equipo Pro Huerta*. [Online]. Dpto Capital y Silpica.: INTA Available: <http://www.inta.gov.ar/santiago/actividad/extension.htm> 2013].
- KASANA, R. C., SALWAN, R., DHAR, H., DUTT, S. y GULATI, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57, 503-507.
- KIM, E. H. J., CORRIGAN, V. K., HEDDERLEY, D. I., MOTOI, L., WILSON, A. J. y MORGENSTERN, M. P. 2009. Predicting the sensory texture of cereal snack bars using instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*, 40, 457-481.
- KLEEREBEZEM, M., BOEKHORST, J., VAN KRANENBURG, R., MOLENAAR, D., KUIPERS, O. P., LEER, R., TARCHINI, R., PETERS, S. A., SANDBRINK, H. M. y FIERS, M. W. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 1990-1995.
- KOZIOŁ, M. J. 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 35-68.
- KURTZMAN, C. y ROBNETT, C. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
- KURTZMAN, C. P., ROBNETT, C. J. y BASEHOAR-POWERS, E. 2008. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS yeast research*, 8, 939-954.
- L'ARGENTIER, S. M. D. 1990. Bruchidae del noroeste argentino: estudios morfológicos y biológicos de *Pectinibruchus longiscutus* kingsolver (Coleoptera). *The Coleopterists Bulletin*, 44, 29-36.
- LAFONE QUEVEDO, S. A. 1888. *Londres y Catamarca. Cartas a "La Nación", 1883-1885, con apéndices y un mapa histórico*. Buenos Aires: Imprenta y Librería de Mayo.

Bibliografía

- LAMARQUE, A. L., MAESTRI, D. M., GROSSO, N. R., ZYGADLO, J. A. y GUZMÁN, C. A. 1994. Proximate composition and seed lipid components of some *Prosopis* (leguminosae) from argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 323-326.
- LEE, A. R., NG, D. L., ZIVIN, J. y GREEN, P. H. R. 2007. Economic burden of a gluten-free diet. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 20, 423-430.
- LEIVA DÍAZ, E., GIANNUZZI, L. y GINER, S. A. 2009. Apple pectic gel produced by dehydration. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 194-207.
- LEPE, J. A. S. y LEAL, B. I. 1990. *Microbiología enológica:: fundamentos de vinificación*, Mundi Prensa Libros SA.
- LEROY, F., MORENO, M. F. y DE VUYST, L. 2003. Enterococcus faecium RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 235-240.
- LINDGREN, S. 1993. Inhibition of enterobacteria and Listeria growth by lactic, acetic and formic acids. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 18-24.
- LÓPEZ LAUENSTEIN, D., MELCHIORRE, M. y VERGA, A. 2005. Respuestas de los algarrobos al estrés hídrico. *Idia XXI. Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario*. (Jul 2005). a. 5 (8), 216-220.
- LUO, M. R., CUI, G. y RIGG, B. 2001. The development of the CIE 2000 colour-difference formula: CIEDE2000. *Color Research & Application*, 26, 340-350.
- MA, W.-W., HEINSTEIN, P. y MCLAUGHLIN, J. 1989. Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *Journal of natural products*, 52, 1132-1135.
- MARANGONI, A. y ALLI, I. 1988. Composition and properties of seeds and pods of the tree legume *Prosopis juliflora* (DC). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 44, 99-110.
- MARTINEZ MEYER, M. R., ROJAS, A., SANTANEN, A. y STODDARD, F. L. 2013. Content of zinc, iron and their absorption inhibitors in Nicaraguan common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 136, 87-93.
- MARTOS, M. A., ZUBRESKI, E. R., COMBINA, M., GARRO, O. A. y HOURS, R. A. 2013. Isolation of a yeast strain able to produce a polygalacturonase with maceration activity of cassava roots. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33, 332-338.
- MATOS, M. E., SANZ, T. y ROSELL, C. M. 2014. Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. *Food Hydrocolloids*, 35, 150-158.
- MATOS SEGURA, M. y ROSELL, C. 2011. Chemical Composition and Starch Digestibility of Different Gluten-free Breads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 224-230.
- MCKAY, A. 1988. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiology letters*, 56, 355-358.
- MENGEL, K. y VIRO, M. 1974. Effect of Potassium Supply on the Transport of Photosynthates to the Fruits of Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 30, 295-300.
- MEYER, D., BECKER, R., GUMBMAN, M. R., VOHRA, P., NEUKOM, H. y SAUNDERS, R. M. 1986. Processing, composition, nutritional evaluation, and utilization of mesquite (*Prosopis* spp.) pods as a raw material for the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 914-919.
- MOHD ALI, N., YEAP, S. K., HO, W. Y., BEH, B. K., TAN, S. W. y TAN, S. G. 2012. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *BioMed Research International*, 2012.
- MORENO, M. F., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E. y DE VUYST, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106, 1-24.
- NOUT, M. y ROMBOUTS, F. 2000. Fermented and acidified plant foods.
- NUNES, M., MOORE, M., RYAN, L. M. y ARENDT, E. 2009. Impact of emulsifiers on the quality and rheological properties of gluten-free breads and batters. *European Food Research and Technology*, 228, 633-642.
- ODIBO, F. J. C., EZEAKU, E. O. y OGBO, F. C. 2008. Biochemical changes during the fermentation of *Prosopis africana* seeds for ogiri-okpei production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 947-952.
- OGUNSHE, A. A., OMOTOSHO, M. O. y AYANSINA, A. 2007. Microbial studies and biochemical characteristics of controlled fermented Afiyi-a Nigerian fermented food condiment from *Prosopis africana* (Guill and Perr.) Taub. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 620-627.

- OH, Y.-K., PARK, S., SEOL, E.-H., KIM, S. H., KIM, M.-S., HWANG, J.-W. y RYU, D. D. 2008. Carbon and energy balances of glucose fermentation with hydrogen-producing bacterium *Citrobacter amalonaticus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 532-538.
- OIV 2009. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Edition.
- OLMOS, A. F., DE LA FUENTE, C. G., NIETO, J. A. S. y RAMOS, S. V. 2010. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
- OMS 2013a. Directices: ingesta de potasio en adultos y niños: resumen
- OMS 2013b. Directrices: ingesta de sodio en adultos y niños: resumen. Organización Mundial de la Salud.
- PALLMANN, C. L., BROWN, J. A., OLINEKA, T. L., COCOLIN, L., MILLS, D. A. y BISSON, L. F. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 198-203.
- PAPAGIANNPOULOS, M., WOLLSEIFEN, H. R., MELLENTHIN, A., HABER, B. y GALENSA, R. 2004. Identification and Quantification of Polyphenols in Carob Fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and Derived Products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3784-3791.
- PARODI, L. y DIMITRI, M. 2000. *Enciclopedia Argentina De Agricultura Y Jardineria. Tomo 1: Parte Sistemática. Vol 2.*
- PASIECZNIK, N. M., FELKER, P. y ASSOCIATION, H. D. R. 2001. *The 'Prosopis Juliflora'-'Prosopis Pallida' Complex: A Monograph*, HDRA Coventry.
- PATHAK, S. P. y GOPAL, K. 2001. Rapid Detection of Escherichia coli as an Indices of Faecal Pollution in Water. *Indian Journal of Microbiology*, 41, 139-151.
- PROKOPIUK, D., CRUZ, G., GRADOS, N., GARRO, O. y CHIRALT, A. 2000. Estudio comparativo entre frutos de *Prosopis alba* y *Prosopis pallida*. *Multequina*, 9, 35-45.
- PUPPO, M. C., LUPANO, C. E. y AÑON, M. C. 1995. Gelation of Soybean Protein Isolates in Acidic Conditions. Effect of pH and Protein Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2356-2361.
- QUINTANA, D. 1986. Fermentación en medio aeróbico de aceitunas maduras en salmuera con inyección alternante de aire. Estudio de la influencia de la adición de cloruro cálcico sobre la textura. *Grasas y Aceites*.
- RANGEL-MARRÓN, M., WELTI-CHANES, J., CÓRDOVA-QUIROZ, A., CERÓN-BRETÓN, J., ANGUEBES-FRANSESCHI, F. y MORENO-MARTÍNEZ, V. Sorption Isotherms of Mango (*Mangifera Indica* L.) Pulp Freeze-dried. Proceedings of the European conference of chemical engineering, and European conference of civil engineering, and European conference of mechanical engineering, and European conference on Control, 2010. World Scientific and Engineering Academy and Society (WSEAS), 114-118.
- RATTI, C. 2009. *Advances in food dehydration*, Boca Raton, Florida, USA, CRC Press.
- RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M. y RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- RENVOISÉ, A., BROSSIER, F., SOUGAKOFF, W., JARLIER, V. y AUBRY, A. 2013. Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43, 322-330.
- RODICIO, M. D. R. y MENDOZA, M. D. C. 2015. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33, 238-245.
- ROIG, F. 1993. Aportes a la etnobotánica del género *Prosopis*. LADIZA, ed. *Contribuciones Mendocinas a la Quinta Reunión de Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del CIID. Conservación y Mejoramiento de Especies del Género Prosopis*, 99-119.
- SABEL, A., MARTENS, S., PETRI, A., KÖNIG, H. y CLAUS, H. 2014. *Wickerhamomyces anomalus* AS1: a new strain with potential to improve wine aroma. *Annals of Microbiology*, 64, 483-491.
- SAURA CALIXTO, F. 1987. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*). Sugars, tannins, pectins and aminoacids. *Anales de Bromatología* 39, 81 - 93
- SCHILLINGER, U. y HOLZAPFEL, W. 1995. The genus enterococcus. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer.
- SCHNEIDER, J., RUPP, O., TROST, E., JAENICKE, S., PASSOTH, V., GOESMANN, A., TAUCH, A. y BRINKROLF, K. 2012. Genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* DSM 6766

Bibliografía

- reveals genetic basis of biotechnologically important antimicrobial activities. *FEMS yeast research*, 12, 382-386.
- SELIGSON, F. H. y MACKEY, L. N. 1984. Variable predictions of protein quality by chemical score due to amino acid analysis and reference pattern. *The Journal of nutrition*, 114, 682-691.
- SEMANCHEK, J. J. y GOLDEN, D. A. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during fermentation of apple cider. *Journal of Food Protection*®, 59, 1256-1259.
- SHARMA, G., WU, W. y DALAL, E. N. 2005. The CIEDE2000 color-difference formula: Implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations. *Color research and application*, 30, 21-30.
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R. y LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: LESTER, P. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- SIVARAMAN, T., KUMAR, T. K. S., JAYARAMAN, G. y YU, C. 1997. The Mechanism of 2,2,2-Trichloroacetic Acid-Induced Protein Precipitation. *Journal of Protein Chemistry*, 16, 291-297.
- SOBRAL, P. A. y WAGNER, J. R. 2009. Relación entre la Composición y la Actividad Antitriptica de Sueros de Soja y Tofu y Comportamiento Térmico de sus Proteínas Aisladas. *Información Tecnológica*, 20, 65-73.
- SPENCER, D., SPENCER, J. F. T., FENGLER, E. y DE FIGUEROA, L. I. 1995. Yeasts associated with algarrobo trees (*Prosopis* spp.) in northwest Argentina: A preliminary report. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 472-474.
- SUÁREZ-LEPE, J. y MORATA, A. 2012. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in food science & technology*, 23, 39-50.
- SUJAK, A., KOTLARZ, A. y STROBEL, W. 2006. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry*, 98, 711-719.
- SUN-WATERHOUSE, D., TEOH, A., MASSAROTTO, C., WIBISONO, R. y WADHWA, S. 2010. Comparative analysis of fruit-based functional snack bars. *Food Chemistry*, 119, 1369-1379.
- TERÁN, A. L. 1990. Observaciones sobre bruchidae del noroeste argentino VII. *Pseudopachymerina spinipes* (Er.) y *P. grata* n. sp. (Coleoptera). *The Coleopterists Bulletin*, 44, 25-28.
- TEUSINK, B., WIERSMA, A., MOLENAAR, D., FRANCKE, C., DE VOS, W. M., SIEZEN, R. J. y SMID, E. J. 2006. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 40041-40048.
- USDA. 2015. *Agricultural Research Service. 2013. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home Page*, [Online]. Available: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata> 2015].
- VALAN ARASU, M., JUNG, M., KIM, D., PARK, H., ILAVENIL, S., AL-DHABI, N. y CHOON CHOI, K. 2015. Identification and phylogenetic characterization of novel *Lactobacillus plantarum* species and their metabolite profiles in grass silage. *Annals of Microbiology*, 65, 15-25.
- VARNIER, M., LEESE, G. P., THOMPSON, J. y RENNIE, M. J. 1995. Stimulatory effect of glutamine on glycogen accumulation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 269, E309-E315.
- VERGA, A. y NORVERTO, C. 2005. Recursos genéticos, mejoramiento y conservación de especies del género *Prosopis*. *Mejores árboles para más forestadores: El Programa de Producción de Material de Propagación Mejorado y el Mejoramiento Genético en el Proyecto Forestal de Desarrollo Edición: Carlos A. Norberto. SAGPyA-BIRF*.
- VILLAGRA, P., CONY, M. A., MANTOVÁN, N. G., ROSSI, B. E., GONZÁLEZ LOYARTE, M., VILLALBA, R., MARONE, L., ARTURI, M., FRANGI, J. y GOYA, J. 2004. Ecología y Manejo de los algarrobales de la Provincia Fitogeográfica del Monte. *Ecología y Manejo de Bosques Nativos de Argentina. Editorial Universidad Nacional de La Plata*.
- WALKER, G. M. 2011. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 25-34.
- YE, M., YUE, T. y YUAN, Y. 2014. Effects of sequential mixed cultures of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on apple cider fermentation. *FEMS yeast research*, 14, 873-882.
- YUST, M. A. M., PEDROCHE, J., GIRÓN-CALLE, J., VIOQUE, J., MILLÁN, F. y ALAIZ, M. 2004. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 85, 317-320.

- ZARO, M. J., CHAVES, A. R., VICENTE, A. R. y CONCELLÓN, A. 2014. Distribution, stability and fate of phenolic compounds in white and purple eggplants (*Solanum melongena* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 92, 70-78.
- ZOLFAGHARI, R., HARDEN, H. y HUFFMAN, L. 1986. Some Physical and Chemical Properties of Honey Mesquite Pod (*Prosopis glandulosa*) and Applications in Food Products. *Cereal Chemistry*, 63, 104 - 108
- ZUNFT, H. J. F., LÜDER, W., HARDE, A., HABER, B., GRAUBAUM, H. J., KOEBNICK, C. y GRÜNWARD, J. 2003. Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients. *European Journal of Nutrition*, 42, 235-242.