



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTORAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS
ALIMENTOS

*Estudio de las Propiedades físico-químicas, organolépticas y
nutricionales de productos panificados desarrollados utilizando
ingredientes no tradicionales con propiedades funcionales.*

Irene Albertina Rubel

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTORAL EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS
ALIMENTOS

*Estudio de las Propiedades físico-químicas, organolépticas y
nutricionales de productos panificados desarrollados utilizando
ingredientes no tradicionales con propiedades funcionales.*

Irene Albertina Rubel

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015

Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Planta Piloto de Ingeniería Química y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Bahía Blanca, en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería y de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, durante el período comprendido entre el 3 de noviembre de 2009 y el 14 de noviembre de 2015, bajo la dirección del Dr. Diego B. Genovese, profesor adjunto de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Sur e investigador independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. La co-dirección de Dra. Ethel E. Pérez, profesor adjunto de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Sur e investigador adjunto del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Irene Albe Albertina Rubel



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaria General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../....., mereciendo la calificación de

Dedicada

A mí querido Matías por su paciencia y aliento durante estos años
y por haberme apoyado siempre en mis proyectos.

A Jeri por su compañía y alegría.

A mi madre, por acompañarme.

Agradecimientos

Mis agradecimientos son para el Dr. Diego B. Genovese por los conocimientos transmitidos brindados en todo momento, por su apoyo y su paciencia, por su guía y enseñanza brindada constantemente para la concreción de este trabajo.

A la Dra. Ethel E. Pérez y al Dr. Guillermo D. Manrique por sus valiosas sugerencias.

Al Ing. Pedro Forbito por brindarme sus conocimientos y su buena predisposición.

A Clarisa Cicchelli y a la Ing. Eugenia Borsa por su colaboración y apoyo.

Al personal del PLAPIQUI, especialmente al Grupo de Alimentos por la colaboración brindada en el trabajo experimental llevado a cabo en PLAPIQUI.

Quiero agradecer a la Planta Piloto de Ingeniería Química, al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Ingeniería Química de Facultad de Ingeniería de Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. También agradezco al Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología del Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva de Facultad de Ciencias Veterinarias de Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires por proveer los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Al INTA Manfredi y en particular Ing. Julio Mombelli por su colaboración y a los productores Alberto y María del Carmen.

A la Universidad Nacional del Sur por ser el soporte institucional para realizar las tareas de la presente tesis.

También agradezco a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica que conjuntamente con la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas realizaron el financiamiento para el desarrollo de mi labor.

A mis amigos María Inés Palacio, Jorgelina, Gabriela, Luz, Agustina por su compañía y apoyo lo largo de este trabajo.

A mis compañeros del grupo Tecnología de Semillas y Alimentos (TECSE), y demás integrantes del Departamento de Ingeniería Química de Olavarría.

A Nora, Silvia por facilitar las tareas administrativas y por su calidez.

Resumen

Las tendencias de consumo de alimentos funcionales han ido en aumento en la última década, influenciadas por la información adquirida por parte de la población sobre el posible rol positivo de la dieta en la prevención de enfermedades. Sin embargo, la ingesta de fibra y de alimentos que contengan fibra aún es baja. La industria de alimentos se ha focalizado en los beneficios de la incorporación de diferentes fibras en productos alimenticios. En la actualidad existe una gama de fibras disponibles en el mercado. No obstante, la disponibilidad de inulina de topinambur es limitada.

El topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) almacena en su raíz carbohidratos en forma de inulina y/o fructoligosacáridos (16 a 20% del peso fresco del tubérculo). Dichos carbohidratos son cadenas de fructosa unidas por enlaces glucosídicos β -(2-1) que tienen generalmente una unidad de glucosa terminal. Las condiciones de crecimiento y del tiempo de almacenamiento después de la cosecha determinan el grado de polimerización (GP) de la inulina. Estos carbohidratos se consideran prebióticos por ser no digeribles y presentar efectos favorables en la salud del consumidor, estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo. Por esto, y por sus altos rendimientos por unidad de superficie cultivada, el topinambur es un candidato potencial a ser utilizado como materia prima para la producción de alimentos funcionales.

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo general obtener inulina a partir de tubérculos de topinambur, caracterizar dicha inulina y finalmente agregarla a masas de harina de trigo para la obtención de pan blanco enriquecido con fibra dietaria. A tal fin se llevó a cabo el proceso de extracción y purificación de la inulina, el análisis de la composición y capacidad prebiótica de la inulina, de las propiedades reológicas de las masas, y de los parámetros fisicoquímicos y propiedades sensoriales de los panes.

A continuación se detalla la organización del trabajo. En cada uno de los capítulos se describieron los métodos experimentales, los resultados, las conclusiones y la bibliografía consultada.

En el Capítulo 1 se realizó una descripción de las características del topinambur, su composición, su localización en Argentina y las aplicaciones de sus tubérculos.

En el Capítulo 2 se describió el efecto del almacenamiento en frío de los tubérculos por un período de ocho meses, sobre su microestructura y composición. Se realizó la descripción del proceso de extracción y purificación de los carbohidratos ricos en inulina obtenidos de topinambur, que fueron analizados según diferentes aspectos en los sucesivos capítulos. Se procedió a la determinación y análisis del rendimiento de extracción de carbohidratos, contenido y GP de inulina.

En el Capítulo 3 se realizó la caracterización fisicoquímica de los fructanos y se describió el marco regulatorio. Se determinó la actividad prebiótica de la inulina obtenida de los tubérculos a distintos tiempos de almacenamiento refrigerado.

En el Capítulo 4 se describió el efecto de la utilización de los carbohidratos ricos en inulina obtenidos de topinambur en la elaboración de panes. Se procedió a la evaluación de las propiedades reológicas de las masas, y las características estructurales y de textura de los panes, así como también sus parámetros fisicoquímicos y sensoriales.

Palabras Claves: *Helianthus tuberosus* L., inulina, prebiótico, alimentos funcionales, pan.

Abstract

Consumption trends of functional foods have increased in the last decade, influenced by the public learning about the possible positive role of the diet in disease prevention. However, intake of fiber and fiber-containing foods is still low. The food industry has focused on the benefits of incorporating different fibers in foodstuffs. Nowadays there is a range of commercially available fibers. However, availability of Jerusalem artichoke inulin is limited.

Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) stores in its root carbohydrates as inulin and/or fructooligosaccharides (16-20% of the fresh weight of the tuber). Such carbohydrates are fructose chains linked by glycosidic bonds β - (2-1) which generally have a terminal glucose unit. The growth conditions and time of storage after harvesting determine the degree of polymerization (DP) of inulin. These prebiotic carbohydrates are considered to be non-digestible and have favorable effects on consumer's health, selectively stimulating the growth of beneficial bacteria in the digestive tract. For this reason, and because of its high yield per cultivated unit area, Jerusalem artichoke is a potential candidate to be used as feedstock for the production of functional foods.

The overall objective of this work was to obtain and study inulin from Jerusalem artichoke tubers and its subsequent use in bread making, including the evaluation of the composition and prebiotic capacity of the inulin, rheological properties of the doughs, and physicochemical parameters and sensory properties of the breads.

The organization of this work is detailed below. In each chapter the experimental methods, results, conclusions and literature were described.

Chapter 1 is a description of the characteristics of Jerusalem artichoke, its composition, its location in Argentina and tubers applications.

Chapter 2 describes the effect of cold storage of tubers for a period of eight months, on their microstructure and composition. It includes a description of the extraction and purification process of inulin rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke tubers, which were analyzed under different aspects in the subsequent chapters. Carbohydrates extraction yield, inulin content and DP were determined and analyzed.

Chapter 3 presents the physicochemical characterization of fructans and regulatory framework. Prebiotic activity of inulin obtained from the tubers at various times of refrigerated storage was determined.

Chapter 4 describes the effect of using the extracted Jerusalem artichoke inulin on bread making. It includes the evaluation of the rheological properties of the doughs and the structural and textural characteristics of bread, as well as their physicochemical and sensory parameters.

Keywords: *Helianthus tuberosus* L., inulin, prebiotic functional foods, bread.

Índice General

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi

Capítulo 1. Manejo Agronómico del cultivo y composición de los tubérculos de Topinambur (*Helianthus tuberosus L.*)

1. Introducción	1
1.1. Características generales	1
1.1.1. Origen y variedades en Argentina	2
1.2. Cosecha del cultivo	3
1.3. Composición del tubérculo	4
1.3.1. Componentes mayoritarios	4
1.3.2. Componentes minoritarios	5
1.4. Usos de los tubérculos de topinambur y de sus componentes	6
1.4.1. Forrajero	6
1.4.2. Hortícola	7
1.4.3. Industrial	7
2. Materiales y Métodos	8
2.1. Variedad y Origen de los tubérculos	8
2.2. Características del clima, suelo y laboreo del cultivar de Topinambur en Manfredi y su área de influencia	8
2.3. Análisis físico-químico de los tubérculos de Topinambur	10

2.3.1.	Determinación de sólidos solubles refractométricos (° Brix).....	10
2.4.	Esquema Proximal.....	11
2.4.1.	Determinación de Fibra detergente neutro.....	12
2.4.2.	Determinación de Fibra detergente ácida.....	12
2.4.3.	Determinación de Lignina.....	13
2.4.4.	Determinación de Fibra Soluble.....	14
2.4.5.	Determinación del Contenido de Proteínas.....	15
2.4.6.	Determinación de Materia grasa.....	17
2.4.7.	Determinación de Materia Seca.....	18
2.4.8.	Determinación de Cenizas.....	19
2.5.	Análisis Químico Elemental.....	20
2.5.1.	Determinación por espectrómetro por fluorescencia de rayos x.....	20
2.5.2.	Determinación por Absorción atómica.....	20
3.	Resultados y discusión.....	21
3.1.	Análisis físico-químico de los tubérculos de topinambur.....	21
4.	Conclusión.....	24
5.	Abreviaturas.....	25
6.	Referencias.....	26

Capítulo 2. Cambios fisicoquímicos en el topinambur (*Helianthus tuberosus L.*) durante el almacenamiento en frío.

1.	Introducción.....	33
1.1.	Efectos de las condiciones de almacenamiento sobre los tubérculos y su composición.....	33
1.2.	Extracción de fructanos.....	34
2.	Materiales y Métodos.....	36
2.1.	Almacenamiento y acondicionamiento de los tubérculos	36

2.2.	Determinación de sólidos solubles refractométricos (°Brix)	
	de los tubérculos.....	37
2.3.	Materia Seca del tubérculo.....	37
	2.3.1. Curva de deshidratación del tubérculo vs. tiempo.....	36
2.4.	Liofilización de los tubérculos.....	37
	2.4.1. Procesamiento.....	37
2.5.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) de tubérculos liofilizados.....	37
2.6.	Preparación del extracto rico en carbohidratos solubles	38
	2.6.1. Procesamiento.....	38
2.7.	Purificación del extracto rico en carbohidratos solubles.....	38
	2.7.1. Procedimiento.....	39
2.8.	Procedimiento de liofilización de los extractos	39
	2.8.1. Análisis de carbohidratos de extraídos de tubérculos	
	de topinambur.....	40
	2.8.2. Reactivos.....	40
	2.8.3. Procedimiento.....	40
2.9.	Hidrólisis ácida de los CRIp.....	41
	2.9.1. Determinación del tiempo y temperatura de	
	hidrólisis para CRIp.....	41
2.10.	Rendimiento de extracción de carbohidratos y contenido de inulina.....	43
2.11.	Grado de polimerización promedio (GPn) de los CRIp.....	44
2.12.	Análisis Estadístico.....	44
3.	Resultados	44
3.1.	Características de los tubérculos durante el almacenamiento: composición,	
	sólidos solubles y humedad	44
3.2.	Cinética de deshidratación en estufa de los tubérculos	
	de topinambur almacenados.....	46

3.3. Microscopía electrónica de barrido.....	47
3.4. Determinación del tiempo y temperatura óptima de hidrólisis ácida de los CRIp.....	49
3.5. Determinación del porcentaje de hidrólisis para diferentes CRIp.....	51
3.6. Rendimiento de carbohidratos y contenido de inulina de las muestras de CRIp	52
3.6.1. Contenido de inulina de los tubérculos y grado de polimerización de la inulina.....	54
4. Conclusiones.....	58
5. Abreviaturas.....	60
6. Referencias.....	61

Capítulo 3. *Prebióticos y Probióticos*

1. Introducción.....	67
1.1. Características de los Prebióticos y sus beneficios.....	67
1.2. Fructanos: Estructura y Química.....	69
1.2.1. Aplicaciones tecnológicas.....	72
1.2.2. Ingestas normales en la dieta.....	72
1.2.3. Marco regulatorio.....	73
1.3. Probióticos.....	75
2. Materiales y Métodos.....	76
2.1. Reactivos.....	77
2.2. Ensayo de Actividad prebiótica.....	77
2.2.1. Preparación de los medios de cultivos.....	77
2.2.2. Acondicionamiento y almacenamiento de las cepas bacterianas.....	78
2.2.3. Determinación del crecimiento bacteriano en el caldo de cultivo.....	79
2.2.4. Tasa de crecimiento relativo (TCR) de <i>L. paracasei</i>	81

2.2.5. Score de Actividad prebiótica.....	82
2.3. Análisis estadístico.....	83
3. Resultados y Discusión.....	83
3.1. Densidad óptica (DO ₆₀₀).....	83
3.2. Acidez titulable (% de ácido láctico) y pH.....	85
3.3. Crecimiento <i>in vitro</i>	90
3.4. Score de actividad Prebiótica.....	94
4. Conclusiones.....	96
5. Anexo I	97
6. Abreviaturas.....	100
7. Referencias.....	101

Capítulo 4. *Diseño de un alimento funcional: Incorporación de inulina en panes.*

1. Introducción.....	115
1.1. Alimentos funcionales.....	115
1.2. Panificados.....	116
1.2.1. Características de la masa.....	116
1.2.2. Características del pan.....	117
1.3. Panes funcionales: enriquecidos con fibras.....	118
2. Materiales y Métodos.....	120
2.1. Caracterización de materia prima.....	120
2.1.1. Ingrediente funcional.....	120
2.1.2. Harina.....	120
2.2. Elaboración del pan.....	123
2.2.1. Reología de la masa.....	123
2.3. Caracterización de los panificados.....	124

2.3.1. Contenido de humedad.....	124
2.3.2. Contenido de cenizas.....	124
2.3.3. Determinación del volumen específico de pan.....	124
2.3.4. Color.....	125
2.3.5. Estudio de textura	125
2.3.6. Análisis digital de imágenes de la estructura de la miga.....	126
2.3.7. Análisis de imágenes por Microscopía electrónica de Barrido (SEM).....	128
2.3.8. Propiedades organolépticas.....	128
2.4. Datos obtenidos y Análisis Estadístico.....	129
3. Resultados y Discusión.....	129
3.1. Estudios Reológicos de la masa de pan.....	129
3.2. Caracterización y propiedades del pan.....	134
3.2.1. Volumen y humedad.....	134
3.2.2. Color.....	136
3.2.3. Características de la estructura de la miga	138
3.2.4. Microestructura de la miga.....	141
3.2.5. Estudio de textura.....	145
3.2.6. Evaluación Sensorial.....	148
4. Conclusiones.....	150
5. Anexo II.....	152
6. Abreviaturas.....	155
7. Referencias.....	156
 Capítulo 5. Conclusiones generales y trabajos futuros.	
1. Conclusiones generales.....	163
2. Perspectivas y trabajos futuros.....	165

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Composición del tubérculo de topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i> L.).....	5
Tabla 1.2. Composición de minerales, vitaminas, ácidos orgánicos y ácidos grasos del tubérculo de topinambur.....	6
Tabla 1.3. Registro de lluvia 2009- 2010.....	9
Tabla 1.4. Características físicas y químicas del suelo (perfil típico).....	10
Tabla 1.5. Composición del suelo.....	10
Tabla 1.6. Composición de <i>Helianthus tuberosus</i> L.....	22
Tabla 2.1. Parámetros operativos del proceso de extracción.....	38
Tabla 2.2. Constantes de las rectas de calibración de carbohidratos.....	40
Tabla 2.3. Contenido de humedad y sólidos solubles de los tubérculos de topinambur durante el almacenamiento a 4 °C.....	45
Tabla 2.4. Porcentajes promedio de hidrólisis de inulina de tubérculos de topinambur bajo diferentes condiciones de hidrólisis.....	51
Tabla 2.5. Porcentaje de hidrólisis ácida de los CRIp extraídos de tubérculos de topinambur.....	52
Tabla 2.6. Efecto del tiempo de almacenamiento de tubérculos de topinambur sobre el rendimiento de extracción y el contenido de inulina	53
Tabla 2.7. Efecto del tiempo de almacenamiento a 4 °C de los tubérculos de topinambur sobre el grado de polimerización de la inulina.....	58
Tabla 3.1. Valores de Δ DO y el crecimiento para los distintos carbohidratos utilizados por <i>Lactobacillus paracasei</i>	83
Tabla 3.2. Valores de Δ %AL y Δ pH para los distintos carbohidratos utilizados por <i>Lactobacillus paracasei</i>	88

Tabla 3.3. Composición del caldo MRS.....	97
Tabla 3.4. Composición del agar MRS.....	97
Tabla 3.5. Composición del caldo MRS basal.....	98
Tabla 3.6. Composición del agar MRS basal.....	98
Tabla 3.7. Composición del tripteína soja agar (TSA).....	99
Tabla 3.8. Composición del caldo medio mínimo M9.....	99
Tabla 3.9. Composición del caldo LB.....	99
Tabla 4.1. Características de la harina de trigo.....	121
Tabla 4.2. Efecto de la adición de inulina en polvo sobre las propiedades físicas y mecánicas del pan.....	134
Tabla 4.3. Efecto de la adición de inulina en polvo sobre el color de la miga y la corteza.....	137
Tabla 4.4. Efecto de la adición de inulina en polvo sobre las características de los granos de la miga de pan.....	140
Tabla 4.5. Efecto de la adición de inulina en polvo sobre las propiedades mecánicas del pan.....	146
Tabla 4.6. Efecto de la adición de inulina en polvo sobre las propiedades organolépticas del pan.....	149

Índice de Figuras

Figura 1.1. Tubérculo de topinambur (<i>Helianthus tuberosus</i> L).....	1
Figura 1.2. Distribución geográfica del topinambur en Argentina	3
Figura 2.1. Proceso de obtención de inulina a nivel de laboratorio.....	35
Figura 2.2. Contenido de humedad normalizado durante el secado de tubérculos frescos	46
Figura 2.3. Microfotografías SEM de tubérculos de topinambur	48
Figura 2.4. Relación de hidrólisis ácida C/C ₀ de fructanos de topinambur para distintas condiciones de hidrólisis:	49
Figura 2.5. Composición de carbohidratos en tubérculos de topinambur durante el almacenamiento a 4 °C.....	54
Figura 3.1. Estructura química de la inulina.....	70
Figura 3.2. Actividad acidificante del <i>Lactobacillus paracasei</i> en medio MRS basal, enriquecido con carbohidratos fermentables.....	85
Figura 3.3. Variación promedio de pH del medio MRS inculado con <i>Lactobacillus paracasei</i>	86
Figura 3.4. Tasa de crecimiento <i>in vitro</i> de de <i>Lactobacillus paracasei</i> relativa a la glucosa en función del tiempo de incubación.....	90
Figura 3.5. Crecimiento de <i>Lactobacillus paracasei</i> en función del tiempo de incubación en MRS basal.	93
Figura 3.6. Score de la actividad prebiótica (SAP) para los diferentes sustratos utilizando <i>L. paracasei</i>	93
Figura 4.1. Diagrama de un farinograma característico.....	122
Figura 4.2. Curva característica de Análisis de Perfil de Textura (TPA).....	125

Figura 4.3. Fotografía de una rodaja de pan, con el área seleccionada y binarizada.....	126
Figura 4.4. El módulo de almacenamiento frente a la frecuencia angular de masas de harina de trigo con inulina.....	130
Figura 4.5. El módulo de pérdida frente a la frecuencia angular de masas de harina de trigo con inulina.....	132
Figura 4.6. Tangente de módulo de pérdida frente a la frecuencia angular de masas de harina de trigo con inulina.....	133
Figura 4.7. Índice del volumen específico de pan control, y enriquecido con inulina.....	136
Figura 4.8. Fotografía de las rodajas de pan de pan control, y enriquecido con inulina.....	139
Figura 4.9. Microfotografías SEM (magnificación 19-22 X) de la miga de pan control, y enriquecido con inulina.....	142
Figura 4.10. Microfotografías SEM (magnificación 274 X) de la miga de pan control, y enriquecido con inulina.....	144
Figura 4.11. Curvas de fuerza vs. tiempo de panes control, y enriquecido con inulina.....	145

Capítulo 1

Manejo Agronómico del cultivo y composición de los tubérculos de Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)

En este capítulo se presentan el manejo agronómico del topinambur (*Helianthus tuberosus* L.), sus características, composición y aplicaciones de sus tubérculos.

1. Introducción

1.1. Características generales

El topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) es una planta forrajera de ciclo anual que pertenece a la familia de las Compuestas (*Asteráceas*). El topinambur puede cultivarse en diversos tipos de suelos y condiciones climáticas extremas (Cosgrove *et al.*, 1991). Es un cultivo tolerante a la salinidad, a heladas y a la baja humedad, también es poco susceptible a plagas y enfermedades (Long *et al.*, 2010; De Pace *et al.*, 2010).



Figura 1.1. Tubérculo de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)

Los tubérculos de topinambur tienen una piel muy fina y una superficie irregular debido a las protuberancias que forman las yemas y o ramificaciones de los estolones (Kays y Nottingham, 2008). Los tubérculos contienen carbohidratos de alto valor nutricional (**Figura 1.1**) (Danilcenko *et al.*, 2008; Cieřlik *et al.*, 2005; Chekroun *et al.*, 1996) y su

rendimiento (en peso fresco) varía entre 30 y 100 toneladas de tubérculo por hectárea (Schorr-Galindo y Guiraud, 1997; Denoroy, 1996).

El contenido de carbohidratos elevado de los tubérculos junto al excelente rendimiento por unidad de superficie, hacen que el topinambur sea utilizado como materia prima de la industria química, farmacéutica y alimentaria, para la producción industrial de fructosa, inulina y etanol (Kays y Kultur, 2005; Baldini *et al.*, 2004; Ninness, 1999; Meijer y Mathijssen, 1996; Chekroun *et al.*, 1994), así como también con fines hortícola-forrajeros (Rébora, 2008a; Raso, 1990). Por otra parte, el desarrollo del cultivo de topinambur en el país podría reducir la necesidad de importación de los productos tales como inulina. (Passephol, 2008).

Los datos sobre la composición de los tubérculos de topinambur son relativamente escasos en comparación a otras especies vegetales y además, ha sido registrada una variación significativa que se debe a la variación de ciertos parámetros como son las diferencias en la variedad, el tiempo de la cosecha y en las condiciones de producción (Kays y Nottingham, 2008; Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005).

El objetivo específico de este capítulo fue presentar las condiciones de cultivo del topinambur (*Helianthus tuberosus* L.), y caracterizar el tubérculo de topinambur en cuanto a su composición y características fisicoquímicas al momento de la cosecha.

1.1.1. Origen y Variedades en Argentina

El Instituto Nacional de Semillas (INASE) afirma que no hay variedades de topinambur registradas, ni semilleros que comercialicen material identificado (Rébora, 2008b). Sin embargo, Bauer y Laso (1974) caracterizaron cinco variedades (Roso, Bianka, Waldspindel, Topianka y Blanca CR) que se estima que fueron introducidas en nuestro país. En la **Figura 1.2** se muestra la distribución del topinambur en Argentina.

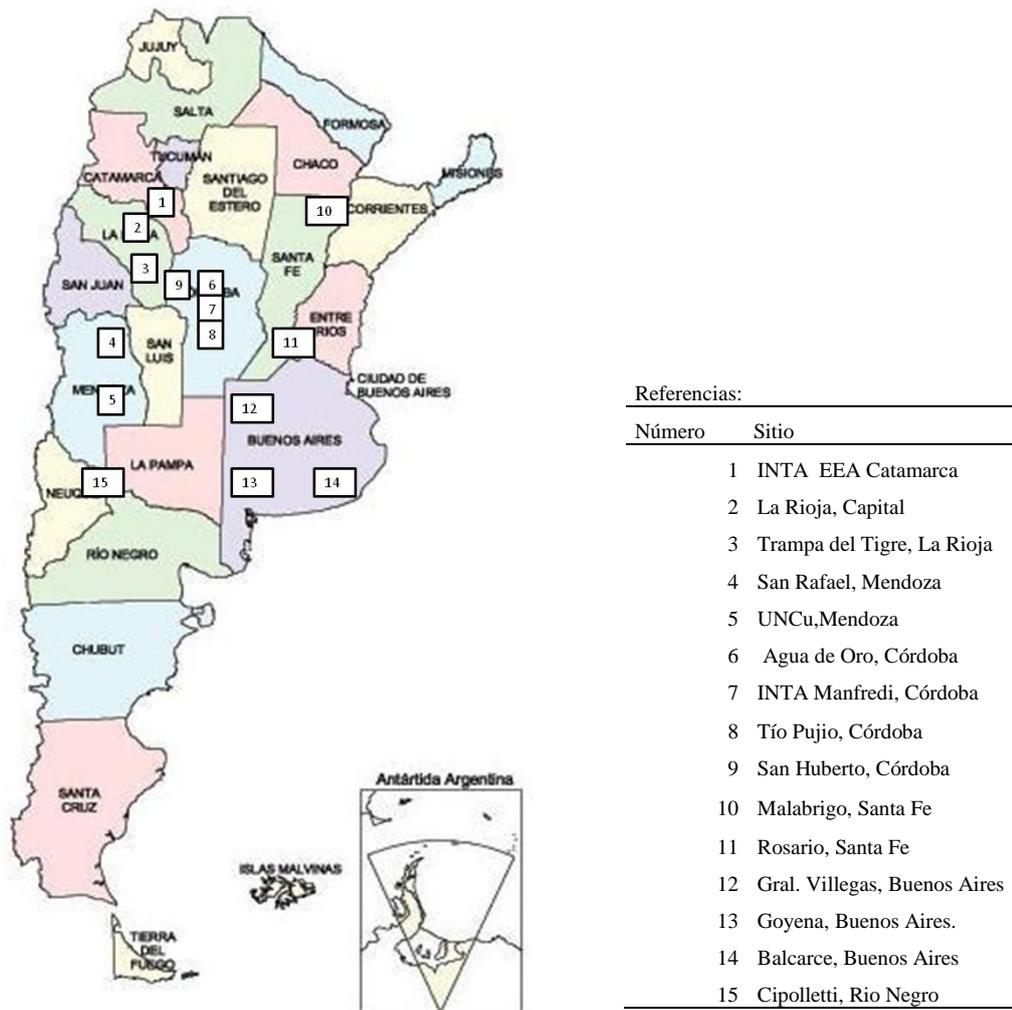


Figura 1. 2. Distribución geográfica del *Helianthus tuberosus* L. en Argentina¹.

1.2. Cosecha del cultivo

Influencia del momento de cosecha sobre el contenido de carbohidratos en el tubérculo

Los fructanos son hidratos de carbono de reserva (Ritsema y Smeekens, 2003) que están presentes en diferentes proporciones en las vacuolas de toda la planta de topinambur (Gupta y Kaur, 2000) principalmente se acumulan en los tubérculos durante su desarrollo.

Los fructanos permiten mantener la estabilidad de las macromoléculas y de las estructuras biológicas (proteínas, membranas) en situaciones de estrés hídrico y de bajas temperaturas (Fujishima *et al.*, 2009; Hellwege *et al.*, 1998). El grado de polimerización (GP) de los fructanos aumenta progresivamente conforme avanza el ciclo de desarrollo,

¹ Cortesía del Ing. Mombelli J. INTA MANFREDI (Córdoba, Argentina).

alcanzando los mayores valores en la floración y disminuyendo hacia el final del ciclo de cultivo (Baldini *et al.*, 2004). En las cosechas tempranas los carbohidratos fermentables (CF) están más polimerizados y los estolones ofrecen mayor resistencia a que los tubérculos se separen, mientras que en las tardías los CF poseen un GP menor y la unión de los estolones a los tubérculos es más débil. El contenido de hidratos de carbono simples (glucosa, fructosa y sacarosa) se mantiene bajo al inicio del desarrollo y aumenta hacia el final del período (Chekron *et al.*, 1994).

El momento óptimo de cosecha, es en la semana 18 a 20 de haber sido plantado, ya que después de las 20 semanas, los tubérculos comienzan a perder peso y firmeza (Chekroun, 1996). Transcurrido dicho período, el contenido de fructanos se mantiene prácticamente constante para las fracciones de GP 3 a 10, mientras que decrecen las de GP 11 a 20 (Rébora, 2008b).

1.3. Composición del tubérculo

La composición de los tubérculos depende del clon (Madrigal y Sangronis, 2007; Chubey y Dorrel, 1974), del estado de desarrollo de las plantas y de la fertilización del cultivo (Denoroy, 1996), de la fecha de cosecha y de las condiciones climáticas de crecimiento y maduración (Coussement, 1999; De Leenheer y Hoebregs, 1994; Pollock y Cairns, 1991). En las **Tablas 1.1** y **1.2** se muestran los componentes de los tubérculos de topinambur.

1.3.1. Componentes mayoritarios

Los tubérculos contienen entre el 75 y 80% de agua, 15-16% de carbohidratos (Kays y Nottingham, 2008; Chekroun, 1996), de los cuales un 5 a 10% corresponde al fructano inulina (Losavio *et al.*, 1997; Fleming, 1979).

Los fructanos pertenecen a la serie homóloga de compuestos lineales de fórmula general GF_n, donde F representa los residuos de D-fructosa, unidos mediante enlaces $\beta(2\rightarrow1)$, G el residuo de D-glucosa terminal, ligado mediante un enlace $\alpha(1\rightarrow2)$ (Ernst y Chatterton, 1996) y n indica el GP. Según la longitud de la cadena se denominan inulina (GP 10-60 y GPn 12) (Madrigal y Sangronis, 2007) o fructooligosacáridos (FOS) (GP 2-7) (Roberfroid *et al.*, 1998). Dentro de un mismo tubérculo de topinambur existe una familia homóloga de polisacáridos con una distribución variable de grados de polimerización de los fructanos (Madrigal y Sangronis, 2007; Coussement, 1999; De Leenheer y Hoebregs, 1994; Pollock y Cairns, 1991; Chubey y Dorrel, 1974).

Algunos autores encontraron que los tubérculos pueden contener entre un 14 y un 19% de fructanos del tipo inulina en base húmeda (Lingyun *et al.*, 2007; Van Loo *et al.*, 1995) lo que representa entre un 60 y 80% del peso seco (Kays y Nottingham, 2008, Kocsis, Liebhard y Praznik, 2007, Gupta y Kaur, 2000, Kiehn y Chubey, 1985).

Tabla 1.1. Composición del tubérculo de topinambur fresco

Constituyentes Principales	Porcentaje (en base húmeda)
Agua	73,0- 81,9 ^{c,g}
Materia seca	19,0- 24,0 ^d
Carbohidratos	16,1- 20,8 ^{c,d}
Fibra dietaria total	12,1 ^g
Fibra insoluble	0,7-2,8 ^{a,e}
Fibra soluble	11,8- 20,0 ^{b,df,g}
Proteína total (N x 6,25)	2,1- 3,6 ^{a,c,d,e,g}
Materia grasa	0,2- 0,4 ^{c,g}
Minerales	1,1- 1,7 ^{c,d,g}

a Xiao Yong Ma, *et al.* (2011) ; b Rumessen, *et al.* (1990) ; c. Uzal, (1991) ; d. Rébora, (2008b); e. Fleming (1979); Passephol, (2008); f. Ragab, *et al.* (2003), g. Souci -Fachman-Kraut, (2000)

La materia seca de los tubérculos está en el rango de 16,4% y 31.9% (Danilčenko *et al.*, 2008; Baldini *et al.*, 2004). Los tubérculos contienen otros carbohidratos simples (Ayerbe y Conde García, 1993) como la glucosa, fructosa, sacarosa y kestosa, 8,54, 8,78, 9,49, y 12,55 mg/ g tubérculo fresco, respectivamente (Matías *et al.*, 2011).

Los carbohidratos presentes en el tubérculo se clasifican en fibra insoluble: celulosa y lignina y hemicelulosas (fracción soluble de la celulosa) y fibra soluble: principalmente inulina y oligofructosa, además de pectinas, mientras que los azúcares simples se encuentran en baja proporción (Ciešlik *et al.*, 2005).

1.3.2. Componentes minoritarios

Los minerales se concentran en la piel de los tubérculos (Mullin *et al.* 1994; Passephol, 2008), siendo elevado el contenido de hierro, niacina, tiamina, fósforo y cobre, así como también de macro elementos tales como calcio, magnesio y potasio (Danilcenko *et al.*, 2011; Cieslik y Sikora, 1999). El contenido de potasio, hierro y sodio es mayor que en otros cultivos de raíz (Xiao Yong Ma *et al.*, 2011; Seiler, 1990).

Tabla 1.2. Composición de minerales, vitaminas, ácidos orgánicos y ácidos grasos del tubérculo de topinambur

Minerales (µg/g)	
Fósforo	780,0- 990,0 ^{c,g}
Calcio	100,0- 230,0 ^{c,g}
Yodo	Trazas ^c
Sodio	220,0 ^g
Magnesio	Trazas- 200,0 ^{c,g}
Potasio	Trazas- 4780,0 ^{c,g}
Hierro	0,4 ^g
Azufre	Trazas ^c
Zinc	Trazas ^c
Vitaminas (µg/g)	
Equivalente de retinol	0,02 ^g
β-Carotenos	0,12 ^g
Vitamina B1	2,00 ^g
Vitamina B2	0,60 ^g
Nicotinamida	13,00 ^g
Vitamina C	41,00 ^g
Ácidos Orgánicos y Ácidos Grasos (µg/g)	
Ácido málico	2000,00 ^g
Ácido cítrico	Trazas- 2300,00 ^{c, g}
Ácido succínico	70,00 ^g
Ácido fumárico	120,00 ^g
Ácido palmítico (16:0)	900,00 ^g
Ácido esteárico (18:0)	50 ^g
Ácido oleico (18:1)	77 ^g
Ácido linoleico (18:2)	1660 ^g
Ácido linolénico (18:3)	430 ^g

a Xiao Yong Ma, *et al.* (2011) ; b Rumessen, *et al.* (1990) ; c. Uzal, (1991) ; d. Rébora, (2008b); e. Fleming (1979); Passephol, (2008); f. Ragab, *et al.* (2003), g. Souci -Fachman-Kraut, (2000)

1.4. Usos de los tubérculos de topinambur y de sus componentes

1.4.1. Forrajero

El topinambur es una especie forrajera de doble producción (forraje verde y tubérculos) (Raso, 1990) y puede reemplazar a un forraje anual o perenne para rumiantes y porcinos (Seiler y Campbell, 2006) debido a los altos contenidos de carbohidratos y su elevado rendimiento por unidad de superficie (Rébora, 2008a). Los tubérculos poseen un balance adecuado de minerales para el mantenimiento de los rumiantes, además de tener un valor energético semejante al del grano de maíz, por lo que es usado para la alimentación invernal. Además los tallos y las hojas pueden utilizarse también como forraje ensilado por ser ricos en grasas y pectinas (Duke, 1983).

1.4.2. Hortícola

Los tubérculos de topinambur se utilizan como hortaliza para alimentación humana (Cosgrove *et al.*, 1991; Duke, 1983), aunque es dificultosa su limpieza debido a su forma irregular y a la fragilidad de la piel. El consumo de tubérculos de topinambur es una alternativa a la papa (*Solanum tuberosum*) y puede consumirse crudo, cocido al vapor o frito (Takeuchi *et al.*, 2011) e incluso encurtido (Duke, 1983), sin perder sus propiedades debido a su alta estabilidad térmica (Panchev *et al.*, 2011).

1.4.3. Industrial

Producción de Bioetanol

El topinambur es un cultivo considerado “energético” por su potencial para producir bioetanol (Pignatelli *et al.*, 2010; Duke, 1983). En el proceso de obtención de etanol se pueden emplear tanto sus tallos como sus tubérculos. Se puede realizar una fermentación directa utilizando distintas cepas de levaduras con capacidad para hidrolizar la inulina como la *Saccharomyces cerevisiae* (Guiraud y Galzy, 1989) o la *Kluyveromyces fragilis* (Baldini *et al.*, 2004; Meijer y Mathijssen, 1996).

La producción de etanol a partir de tubérculos es del orden de 1 L de etanol por cada 12 kg de tubérculos, pudiéndose obtener producciones de 5.000-6.000 L.ha⁻¹ considerando los rendimientos medios de tubérculos de 60-70 t.ha⁻¹ (Fernández, 1998).

Aplicaciones en la industria alimentaria

A partir de los tubérculos puede obtenerse harina, que se utiliza en la preparación de alimentos para diabéticos y celíacos. También, pueden extraerse los fructanos que por poseer bajo valor calórico (1-1,5 kcal/ g) que se pueden aplicar como sustituto de diversos ingredientes, dependiendo de su grado de polimerización promedio (GPn) (Archer *et al.*, 2004; Niness, 1999). De acuerdo al GPn la inulina presenta atributos funcionales distintivos que la hace apta para su utilización como ingrediente y/o coadyuvante de tecnología en la industria alimentaria. También puede utilizarse como fuente de fibra, sustituto de grasas, azúcares u otros macronutrientes, entre otras aplicaciones (Kaur y Gupta, 2002; Hidaka y Hirayama, 1991). La inulina de alto peso molecular puede emplearse como gelificante, agente de volumen y como espesante por su alta capacidad de retención de agua (Pasephol *et al.*, 2008; Archer *et al.*, 2004), además puede reemplazar grasas en alimentos simulando su textura (Niness, 1999; Franck, 2000).

A partir de la hidrólisis de la inulina se obtienen jarabes de fructosa y mostos concentrados, ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a su alta solubilidad y baja viscosidad (Kosaric *et al.*, 1984; Guiraud y Galzy, 1982). La fructosa se utiliza como edulcorante bajo en calorías, ya que contiene menos calorías que la sacarosa para un nivel edulcorante equivalente (Cosgrove *et al.*, 1991). Los alimentos en los que se han incorporado fructanos son: refrescos, mermeladas, jaleas y confituras, también en panificados, galletitas, fideos y elaboración de bizcochos para mejorar el valor nutritivo (Coussement, 1999).

Otros usos

El topinambur es utilizado como cultivo anti-erosión para fijar terrazas o suelos inestables (Denoroy, 1996) y también como planta ornamental. Además, es posible utilizar la biomasa aérea del final del ciclo de cultivo como medio para proporcionar materia orgánica del suelo. El topinambur, a su vez podría utilizarse como cultivo para fitorremediación por su capacidad de acumular grandes cantidades de cadmio y eliminar elementos como manganeso y cobalto (Liang *et al.*, 2011).

2. Materiales y Métodos

2.1. Variedad y Origen de los tubérculos

Se utilizaron tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. variedad Bianka gentilmente donados por INTA Manfredi. Originalmente estos tubérculos son provenientes de Lonca Hue (Traslasierra, Córdoba), de donde fueron extraídos y plantados en terrenos del INTA Manfredi (Córdoba). Las muestras de topinambur fueron cosechadas a los 10 meses de su siembra, en mayo de 2010.

2.2. Características del clima, suelo y laboreo del cultivar de Topinambur

Temperaturas y régimen de lluvias

La temperatura media anual fue de 16,8 °C, siendo las mínimas absolutas registradas durante los meses de julio-agosto 2009 de hasta -10 °C y las máximas absolutas, durante los meses de diciembre-enero 2010, con valores de hasta 40 °C. La **Tabla 1.3** muestra la temperatura y la distribución de lluvias durante el cultivo. La primera helada fue a mediados de mayo de 2009 y la última a principios de septiembre de 2009.

Tabla 1.3. Registro de lluvias y temperaturas 2009- 2010

Fecha	Lluvia (mm)	Promedio de lluvia histórico (mm) ^(a)	Temperatura media (°C)	Promedio histórico de temperatura media (°C) ^(b)
Ago-09	0,0	11,5	13,8	11,6
Sep-09	38,0	34,0	12,2	13,7
Oct-09	14,9	73,5	18,3	17,5
Nov-09	40,0	100,9	22,5	20,6
Dic-09	281,5	121,4	22,8	22,9
Ene-10	117,5	119,4	23,4	23,4
Feb-10	162,0	95,4	21,7	22,1
Mar-10	71,5	102,2	21,4	20,0
Abr-10	87,0	55,4	15,5	17,0
May-10	22,0	22,6	11,6	13,0

(a) Promedio de 79 años

(b) Promedio de 46 años

Lat: 31° 49' 12" Long: 63° 46' 00" Altura s.n.m. 292

Fuente: Estación Experimental INTA Manfredi.

Características del suelo

La Estación Experimental Manfredi, está ubicada en la llanura central cordobesa, situada a 31° 49' de latitud sur; 63° 46' de longitud oeste, a 292 m de altura sobre el nivel del mar, en el área geomorfológica de la pampa alta. La zona presenta un relieve de lomas. A una profundidad de 200 cm desde la superficie del suelo se encontraron 570 mm de agua total y 305 mm de agua útil o disponible. El drenaje superficial del agua de lluvia, está caracterizado por la presencia de líneas de escurrimiento, orientadas en general de noroeste a sureste. La ubicación específica del cultivo fue: latitud sur 31° 56' 55'', longitud oeste 63° 44' 30'', altitud 286 msnm.

El suelo es profundo, bien drenado, con capacidad de almacenaje de agua y con alto contenido de limo y carbonato de calcio, está desarrollado sobre sedimentos eólicos, de textura franco- limosa, cuya secuencia de horizontes es A1, A/C, Ck, (**Tabla 1.4 y Tabla 1.5**).

Tabla 1.4. Características físicas y químicas del suelo (perfil típico)

Horizonte	A1	A/C	Ck
Profundidad (cm)	0-20	20-53	53,0
Materia Orgánica (%)	1,98	0,98	
Carbono Orgánico (%)	1,15	0,57	
Nitrógeno total (%)	0,12	0,10	
Arcilla < 2 u (%)	15,40	12,20	11,2
Limo 2-50 u (%)	68,40	71,10	71,9
Arena muy fina 50–100 u (%)	16,20	15,00	15,0
Arena fina 100–250 u (%)	0,80	1,00	0,60
Arena media 250–500 u (%)	0,10	0,05	0,05
Arena gruesa 500–1000 u (%)	0,20	0,05	0,10
Calcáreo CO ₃ Ca (%)	0,00	0,00	4,70
pH en pasta	6,20	7,00	8,20
pH en agua 1:2.5	6,40	7,10	8,30

Fuente: Estación Experimental INTA Manfredi.

Tabla 1.5. Composición del suelo.

Cationes de intercambio (m.e./ 100 g)	A1	A/C	Ck
Ca ⁺⁺	9,2	10,4	
Mg ⁺⁺	1,1	1,5	
Na ⁺	0,2	0,1	0,4
K ⁺	2,8	1,7	0,7
H ⁺	1,5	0,5	
Suma bases me/100 g (S)	13,9	13,6	
Capacidad de intercambio (T)	15,6	14,2	13,7
Saturación con bases % S/T	89,0	96,0	
Saturación con bases % S/T		96,0	

Fuente: Estación Experimental INTA Manfredi.

2.3. Análisis físico-químico de los tubérculos de Topinambur

2.3.1. Determinación de sólidos solubles refractométricos (°Brix)

Principio

La refractometría resulta adecuada para identificar y caracterizar distintos extractos que estén compuestos principalmente por azúcares. El índice de refracción se basa en la medida del ángulo límite de la reflexión total. El contenido de compuestos solubles del extracto de topinambur puede expresarse como °Brix, que indica la concentración total

de azúcares en % (p/v) de una solución con el mismo índice de refracción (Baldini *et al.*, 2004).

Procedimiento

La determinación de sólidos solubles en los tubérculos se realizó con un refractómetro digital Atago (Tokio, Japón). Después de cada período de almacenamiento, se realizaron las determinaciones refractométricas sobre el líquido obtenido del tejido de los tubérculos utilizando una prensa manual portátil. Para extraer la muestra de tejido se cortaron los tubérculos a la mitad y se tomaron las porciones centrales. Cada porción se envolvió en un trozo de muselina, se colocó en la prensa para obtener dicho jugo, que se vertió sobre el refractómetro con ayuda de una varilla de vidrio y se distribuyó formando una fina capa y se dejó 1 min para que se equilibre la temperatura. La determinación del porcentaje de sólidos solubles se realizó mediante la lectura directa de la escala del refractómetro y se expresó como °Brix.

2.4. Esquema Proximal

El esquema proximal estima las fracciones que forman parte de la materia seca. Las fracciones consideradas son: carbohidratos (CA), proteína bruta (PB), cenizas (CE), extractos etéreos (EE).

El balance de materia se expresa como:

$$CA + PB + CE + EE = 100\%$$

El extracto etéreo (EE) se define como la fracción que es soluble en n-hexano y determina el contenido de materia grasa. Este punto no se tuvo en cuenta ya que el porcentaje de lípidos fue menor de 2%.

Los carbohidratos (CA) se obtienen del balance anterior a partir de las otras fracciones analizadas. Los CA están comprendidos por las fracciones de celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas, fructanos, azúcares solubles y otros compuestos orgánicos, e incorpora todos los errores acumulados de las determinaciones anteriores. A continuación se detallan las técnicas utilizadas para obtener cada componente. Todas las mediciones se efectuaron al menos por triplicado.

2.4.1. Determinación de fibra detergente neutro

Permite evaluar de modo rápido el contenido de fibra total en alimentos fibrosos (Guiragossian *et al.*, 1977).

Preparación de la solución de detergente neutro

Por cada litro de agua destilada se agregó: 30 g de laurilsulfato de sodio; 18,61 g de EDTA; 4,56 g de fosfato de hidrógeno disódico; 6,81 g de borato de sodio decahidratado y 10 mL de etilenglicol (2-etoxietanol). Se chequeó que el pH se encuentre dentro del rango de 6,9 a 7,0, ajustándose cuando fue necesario.

Procedimiento

La muestra se colocó en un erlenmeyer de 500 mL con boca esmerilada. Se añadieron 100 mL de la solución de detergente neutro. Se conectó el refrigerante y se colocó sobre la placa calefactora. Se controló que entrara en ebullición rápidamente (3- 5 minutos) y luego se prosiguió hirviendo uniformemente bajo reflujo durante 1 hora. Se filtró el contenido del erlenmeyer a través de un crisol Gooch de porosidad N°1, previamente tarado, empleando vacío. El residuo se enjuagó con aproximadamente 300 mL de agua caliente (80 °C) y finalmente con 10- 15 mL de acetona. El crisol con su contenido se colocó en estufa a 105 °C durante toda la noche. Se dejó enfriar en un desecador y se pesó.

Cálculo

$$\% \text{ FDN} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} 100$$

donde:

P₁ = peso del crisol, en gramos

P₂ = peso del crisol y el residuo, en gramos

P₃ = peso de la muestra en base seca, en gramos

2.4.2. Determinación de fibra detergente ácida (FDA)

La determinación de la fibra detergente ácida evalúa el contenido de lignocelulosa y es un paso previo para la determinación de lignina (AOAC, 2000; Guiragossian *et al.*, 1977).

Preparación de la Solución de detergente ácida

Se añadieron 20 g de bromuro de etiltrimetilamonio, grado técnico, a 1 L de H₂SO₄ 1 N.

Procedimiento

La muestra se colocó en un erlenmeyer de 500 mL de boca esmerilada junto con 100 mL de solución detergente ácida. Se conectó el refrigerante y se colocó en la placa calefactora. El calor se ajustó de manera tal de lograr la ebullición en 3- 5 minutos. Luego, se redujo el calentamiento y la ebullición se prosiguió por 1 hora.

Los sólidos del erlenmeyer se filtraron en un crisol Gooch de porosidad N°1, previamente tarado, utilizando un ligero vacío. Se lavó varias veces con agua caliente (80- 90 °C), posteriormente con acetona hasta que el líquido de lavado fuera incoloro y el enjuague final se realizó con hexano. El crisol con el residuo se colocó en estufa a 105 °C durante toda la noche, se enfrió en desecador y se pesó. El residuo se reservó para determinar el contenido de lignina.

Cálculo

$$\% \text{ FDA} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} 100$$

donde:

P₁ = peso del crisol, en gramos

P₂ = peso del crisol y el residuo, en gramos

P₃ = peso de la muestra en base seca, en gramos

2.4.3. Determinación de Lignina

La lignina detergente ácida utiliza a la fibra detergente ácida, como paso previo al procedimiento. El detergente remueve la proteína y otros materiales solubles en ácido que pueden interferir con la determinación de lignina. El principio del procedimiento es que la fibra detergente ácida es primariamente lignocelulosa, de la cual, la celulosa se disuelve con la solución de H₂SO₄ al 72%. El residuo remanente es lignina y materiales insolubles en ácido (AOAC 973.18, 1990; Guiragossian *et al.*, 1977).

*Procedimiento**Preparación del ácido sulfúrico, 72%*

Se estandarizó el ácido sulfúrico a una densidad de 1,634 a 20 °C o 24 N.

Se pesó el agua necesaria para 1 L de solución en un vaso de precipitado de 2 L. Por una parte, se pesó el ácido necesario en otro recipiente. Gradualmente, se agregó el ácido al agua y se agitó ocasionalmente, mientras la solución se enfrió en un baño de agua.

Se controló la densidad específica de la solución. Para ello, se tomó una alícuota de 5 mL con una pipeta de doble aforo a 20 °C, se la colocó en un recipiente tarado y se pesó en una balanza analítica. Se ajustó la densidad a 1,634 agregando pequeñas cantidades de agua o ácido según fuera necesario y se controló nuevamente la densidad.

El primer paso fue preparar la fibra detergente ácida como se indicó en el punto anterior. Se colocó el crisol en un cristizador. Se cubrió el contenido del crisol con la solución de H₂SO₄ fría (15 °C), al 72%, se agitó el residuo con una varilla de vidrio y se desmenuzaron los terrones que se hubieron formado. Se llenó hasta la mitad el crisol con la solución. Se dejó que drene el ácido y se agitó ocasionalmente. El crisol debió mantenerse a una temperatura de 20- 23 °C, enfriándolo cuando fue necesario. Después de 3 horas, se filtró empleando vacío. Se enjuagó el residuo con agua caliente (80- 90 °C) hasta que el líquido de lavado estuviese libre de ácido. Se llevó el crisol con el residuo a estufa a 105 °C durante toda la noche. Luego, se lo llevó a la mufla a 500 °C por 3 horas. Se enfrió y se pesó.

Cálculo

$$\% \text{ Lignina} = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} * 100$$

donde:

P₁ = peso del crisol, en gramos

P₂ = peso del crisol y el residuo, en gramos

P₃ = peso de la muestra en base seca, en gramos

2.4.4. Determinación de Fibra Soluble

La cuantificación de fibras solubles incluye la cuantificación de los fructanos, polisacáridos no almidón, almidones resistentes y oligosacáridos no digeribles por métodos distintos o bien la utilización de los métodos de AOAC para análisis de fibra dietética (AOAC 985.29 o 991.43) con análisis complementarios de los diferentes oligosacáridos. En el presente capítulo el contenido de fibra soluble fue determinado por medio del Método Enzimático-Gravimétrico, con amilasas, proteasas y amiloglucosidasa, KIT MEGAZYME (AOAC 991.43). Para ello se pesó 1 g de muestra seca y desgrasada y se colocó en un erlenmeyer. Se añadió buffer fosfato para llevar a pH 6,0 ± 0,1 y se agregó 50 µl de enzima α-amilasa. Se colocó a baño maría con agitación a 100 °C durante 15 minutos. Cumplido dicho tiempo, el erlenmeyer se enfrió

a temperatura ambiente, se ajustó el pH a valor de $7,5 \pm 0,1$ utilizando NaOH 0,275 N y se agregó 100 μl de enzima proteasa. Se colocó en baño maría con agitación a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, para solubilizar y depolimerizar proteínas. Luego se ajustó el pH a valor de $4,5 \pm 0,2$ utilizando HCl 0,325 N y se agregó 200 μL de enzima amiloglucosidasa y nuevamente se incubó a $60\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos para hidrolizar almidón a fragmentos de glucosa. Se continuó el análisis adicionando 280 ml de EtOH 95% y se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se realizó el filtrado con sucesivos enjuagues del recipiente utilizando 3 enjuagues de 20 ml de EtOH al 78%, 2 enjuagues con EtOH al 95% y 2 enjuagues con 10 mL de acetona. El residuo se colocó en crisol y se secó bajo vacío en estufa a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante toda la noche (FI).

El porcentaje total de la muestra se calculó según la siguiente ecuación:

Cálculo

$$\% \text{ FDT} = \left[\frac{\text{R} - \text{p} - \text{A} - \text{B}}{\text{m}} \right] \times 100$$

$$\text{B} = \text{RB} - \text{PB} - \text{CB}$$

donde:

R = peso del residuo de la muestra, en gramos

m = peso de muestra seca y desgrasada, en gramos

p = peso de proteínas del R, en gramos

A = peso de cenizas del R, en gramos

B = blanco

RB = Residuo del blanco

PB = peso de proteínas del blanco, en gramos

CB = peso de cenizas del blanco, en gramos

El contenido de fibra soluble es la diferencia entre el porcentaje de fibra dietaria total (FDT) y la fracción de fibra insoluble (FI).

Los valores de fibra soluble obtenidos no involucran a los fructoligosacáridos de bajo grado de polimerización.

2.4.5. Determinación del Contenido de Proteínas

Principio

El método utilizado fue macro-Kjeldahl, empleando un digestor y destilador Büchi (AOAC, 1990; Guiragossian *et al.*, 1977). El tubérculo de topinambur liofilizado se

digirió con ácido sulfúrico concentrado utilizando sulfato de cobre/sulfato de potasio como catalizador, para convertir el nitrógeno orgánico en iones amonio. Se añadió álcali para liberar el nitrógeno, el que se destiló en exceso de ácido bórico. El destilado se tituló con ácido clorhídrico para determinar el amonio absorbido por el ácido bórico.

Reactivos

Se utilizó ácido sulfúrico concentrado de peso específico 1,84, exento de nitrógeno, ácido clorhídrico 0,1 N estandarizado, solución de ácido bórico (40 g de BO_3H disuelto en 1 L de agua), solución de hidróxido sódico exenta de carbonato conteniendo aproximadamente 33 g de hidróxido sódico por 100 g de solución (se disolvieron 500 g de hidróxido sódico en 1 L de agua), sulfato de cobre pentahidratado, sulfato potásico anhidro, solución indicadora mixta (se disolvieron 2 g de rojo de metilo y 1 g de azul de metileno en 1 L de etanol 96% v/v). El cambio de color de esta solución indicadora se produce a pH 5,4. La solución indicadora se almacenó en una botella color topacio en lugar oscuro y fresco.

Digestión de la muestra

La muestra de tubérculo liofilizado se colocó en el tubo del digestor Büchi junto con 10 g de catalizador, una mezcla al 7% de sulfato de cobre con sulfato de potasio. Seguidamente, se añadieron 25 mL de ácido sulfúrico concentrado y se procedió al calentamiento. Se preparó en forma paralela un blanco. Una vez que la solución se aclaró, se prosiguió el calentamiento por 30 minutos más, con lo que se aseguró que toda la materia orgánica se encuentre oxidada. Se retiró y se dejó enfriar. Luego se agregaron cuidadosamente 100 mL de agua.

Destilación

Se preparó una solución de ácido bórico al 4%, a la que se le añadió una solución indicadora. Esta solución se preparó con 0,02 g de rojo de metilo y 0,04 g de verde de bromocresol disueltos en 19 mL de alcohol y 1 mL de agua destilada. La proporción de solución indicadora fue de 5 mL por litro de ácido bórico al 4%. Se colocaron 50 mL de dicha solución ácida, preparada en un erlenmeyer de 250 mL y se situó a la salida del condensador para recoger el amonio destilado. Se añadió a la muestra digerida, hidróxido de sodio al 30% para liberar el amonio, hasta que la solución tomó una coloración azul intensa, como resultado de la formación de un complejo entre iones amonio y cobre, indicó que la cantidad de NaOH fue suficiente para neutralizar el exceso de ácido sulfúrico.

La destilación se llevó a cabo hasta recoger aproximadamente 100 mL de líquido en el erlenmeyer colector (3 minutos). Para determinar el amonio absorbido por el ácido bórico se tituló el destilado con ácido clorhídrico 0,1 N. Paralelamente se realizó un blanco de reactivos.

Cálculo del porcentaje de nitrógeno (% N)

$$\% N = \frac{[(V_1 - V_B) N_{HCl}] 0,014 \times 100}{P_1}$$

siendo:

V_1 = mL de HCl consumidos en la titulación de la muestra

V_B = mL de HCl consumidos en la titulación del blanco

P_1 = peso de muestra en gramos, expresado en base seca

N_{HCl} = normalidad de la solución de HCl

El contenido de proteína bruta se obtuvo multiplicando en valor de nitrógeno por un factor de 6,25

2.4.6. *Determinación de Materia grasa*

Aplicación

El método de Soxhlet es aplicable aunque es menos preciso que otros métodos como el Weibul, Rose Gottlieb.

Principio

La grasa se extrajo con hexano a partir del residuo obtenido en la determinación del contenido de humedad. El solvente se eliminó por evaporación y se pesó el residuo de grasa.

Equipos

Se utilizó un equipo de extracción continua, tipo Soxhlet con un matraz de extracción de unos 150 mL de capacidad, estufa de aire, unidades de calentamiento, baño de agua o baño de vapor y cartuchos de extracción.

Procedimiento

Los tubérculos de topinambur liofilizados se trituraron en un molinillo de cuchillas horizontales. La extracción de aceite se llevó a cabo en un equipo Soxhlet, empleando como solvente n-hexano, grado técnico, siguiendo la norma IUPAC 1.122 (1992). Se dispusieron las muestras trituradas, aproximadamente 10 g, en cartuchos de papel

Whatman N° 3. El proceso se efectuó a una temperatura de 68-72 °C y a presión atmosférica. Se contabilizaron veinte ciclos de extracción para asegurar un contenido bajo de aceite residual en la muestra. Para extraer el disolvente se utilizó un rotaevaporador. El residuo de n-hexano fue removido por una corriente de nitrógeno. El contenido de aceite en el tubérculo de topinambur se expresó como porcentaje en masa del tubérculo triturado, libre de humedad.

Cálculo

$$\text{Grasa extraíble(\%)} = \frac{(P_3 - P_2) \times 100}{P_1}$$

donde:

P₁ = peso de la muestra antes de la desecación, en gramos

P₂ = peso del matraz sin grasa, en gramos

P₃ = peso del matraz con grasa, en gramos

2.4.7. Determinación de Materia Seca. Método de la estufa de vacío:

Aplicación

Los productos que se descomponen en estufa a alta temperatura (100 °C) pueden desecarse a una temperatura inferior, bajo presión reducida y se determina gravimétricamente el contenido de sólidos totales.

Principio

La eficiencia del método depende del mantenimiento de baja presión en la estufa y de la eliminación del vapor de agua de la estufa.

Procedimiento

Se pesó en placas de Petri previamente desecadas y taradas, una cantidad de 3- 5 g de tubérculo de topinambur fresco rallado. Se colocaron las placas de Petri en la estufa de vacío (6,4 kPa) a 65 °C. Se desecó durante 8 horas o bien hasta que la diferencia de peso fuera < 0,002 g. Se retiraron las placas de la estufa y se enfriaron en el desecador antes de registrar el peso.

Cada una hora se retiraron de la estufa las placas con las muestras, se enfriaron en el desecador y se pesaron. Se repitió la operación hasta que la muestra alcanzó peso constante. Se realizó el procedimiento por triplicado y a partir de los datos obtenidos se

calculó el porcentaje de humedad y los sólidos totales de la muestra por diferencia de peso.

Cálculo

$$\text{Sólidos Totales (\%)} = \left(\frac{P_3}{P_1}\right)100$$

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{P_2}{P_1}\right)100$$

donde:

P_1 = peso de la muestra, en gramos

P_2 = pérdida de peso, en gramos

P_3 = peso muestra desecada, en gramos

2.4.8. *Determinación de Cenizas*

Aplicación

El siguiente método es aplicable a los tubérculos de topinambur por tener bajo porcentaje de materia grasa.

Principio

El concepto de residuo de incineración o de cenizas se refiere al residuo que queda tras la combustión (incineración) completa de los componentes orgánicos de un alimento en condiciones determinadas. La materia orgánica se quema a la temperatura más baja posible y la materia inorgánica remanente se determina gravimétricamente. El calentamiento se realiza en etapas, primero para eliminar el agua, a continuación para carbonizar el producto y finalmente, se incinera en horno de mufla.

Procedimiento

La determinación de cenizas se basó en el método AOAC 942.05 (2000). El residuo inorgánico del tubérculo es lo que se denominó ceniza y se expresó como porcentaje en peso de tubérculo seco.

El número de crisoles necesarios se colocó en el horno de mufla durante 30 minutos. Se sacaron los crisoles para enfriarlos en desecador durante al menos 1 hora y una vez enfriados a temperatura ambiente, se pesó cada crisol hasta el mg más próximo. Se pesó con exactitud hasta el mg más próximo alrededor de 5-6 g de producto en cada crisol. Se colocaron las muestras previamente secadas en la estufa de vacío, dentro de crisoles,

para luego llevarlos a una placa caliente bajo campana, y se elevó gradualmente la temperatura hasta que cesó la emisión de humo y las muestras aparecieran totalmente carbonizadas. Se evitó el calentamiento rápido dado que algunas sales funden y absorben carbono que sería difícil de quemar. Se sometió a la combustión de la materia orgánica hasta obtener un residuo blanquecino, libre de carbono para lo cual se colocaron los crisoles en el interior del horno mufla, lo más cerca posible del centro y se incineró durante 3 horas a 550 °C. Se sacaron los crisoles de la mufla y se colocaron en un desecador durante al menos 1 hora, para que se enfríen completamente. Se volvió a pesar cada crisol con sus cenizas hasta el mg más próximo. Se calculó por diferencia el peso y el porcentaje de cenizas.

Cálculo

$$\text{Cenizas (\%)} = (P_2/P_1) 100$$

donde:

P₁ = peso de la muestra, en gramos

P₂ = peso de las cenizas, en gramos

2.5. Análisis Químico Elemental

2.5.1. Determinación por espectrómetro de rayos X

Se determinó utilizando un espectrómetro por fluorescencia de rayos X, marca MagiX con ánodo de rodio, atmósfera de helio, cristales de Fli 200, PX1, PX4, PE y detector de flujo. La atmósfera de helio permite detectar los elementos de la tabla periódica desde el sodio hasta el uranio.

Se preparó una pastilla de tubérculo de topinambur liofilizado y triturado de 10 g, sobre la cual se realizaron las determinaciones.

2.5.2. Determinación por Absorción atómica

El contenido de Mg se corroboró por absorción atómica dado que por fluorescencia de rayos X, se obtuvieron valores bajos.

Principio de absorción atómica

El principio de análisis consiste en eliminar la materia orgánica por digestión húmeda o incineración seca, el residuo se disuelve en ácido clorhídrico diluído. La solución se pulveriza en un equipo de absorción atómica, midiéndose la absorción del metal objeto de análisis, el Mg, a una longitud de onda específica (Osborne y Voogt, 1986).

Equipo y funcionamiento

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica GBC 902 con accesorios. Los componentes principales de este equipo son una fuente de luz, que envía el espectro del elemento de interés, una célula de absorción, en la que se forman los átomos por disociación térmica de la muestra a investigar, un monocromador para la división espectral de la luz, con la rendija de salida que selecciona la línea de resonancia, un receptor, que permite la medida de la intensidad de la radiación, seguido de un intensificador y un indicador, en el que se lee la absorción.

Procedimiento

Se pesaron aproximadamente 5 g de muestra (con una precisión de $\pm 0,001$ g) en un crisol de porcelana. Se colocó el crisol en una placa calefactora, bajo campana, hasta que cesó el desprendimiento de humo y la muestra apareció totalmente carbonizada. Se llevó a la mufla a 550 °C hasta lograr cenizas blancas. Se trataron las cenizas con 5- 10 mL de HCl 6 N hasta mojarlas totalmente y a continuación se desecó cuidadosamente sobre una placa calefactora a temperatura moderada. Luego, se re-añadieron 15 mL de HCl 3 N y se calentó el crisol sobre la placa calefactora hasta que la solución comenzó a hervir. Se enfrió y filtró a través de papel Whatman N° 541 hacia un matraz volumétrico de 100 mL. Se agregaron 10 mL de HCl 3 N al crisol y se calentó la solución hasta que comenzó a hervir. Se enfrió y se filtro hacia el matraz. Se lavó el residuo con agua y se filtro recogiendo los lavados hacia el matraz. Se enfrió la solución y se enrasó al aforo. Para determinar calcio se añadieron 5 mL de solución de cloruro de lantano por 100 mL de solución. Se preparó un blanco tomando las mismas cantidades de los reactivos indicados. Se preparó una solución patrón madre del metal a analizar conteniendo 1000 mg/L. Se construyeron rectas de calibrado con disoluciones de esta solución madre. La longitud de onda a la que se realizaron las mediciones fue 285,2 nm y el reactivo usado como patrón fue $\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$.

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis físico-químico de los tubérculos de Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)

En la **Tabla 1.6** se muestra la composición proximal de los tubérculos de topinambur en base seca al momento de la cosecha.

Por diferencia de los componentes descriptos en la **Tabla 1.6** se obtuvo el porcentaje de carbohidratos, siendo considerada la inulina su componente mayoritario en los

tubérculos de topinambur. A partir de los datos de carbohidratos obtenidos se estimó un contenido de fibra soluble del tubérculo del 77,4% en base seca (equivalente a un 20,7% en base húmeda). Dicho valor se encuentra dentro del rango de valores promedios (de entre 80 y 90% de inulina en base seca y 18,3% en base húmeda) encontrados para diferentes variedades de topinambur (Barta y Patkai, 2007; Kaur y Gupta, 2002). En tanto Somda *et al.*, (1999) informaron un contenido de carbohidratos de 93,26 mg/g base seca (18,9% base húmeda).

Tabla 1.6. Composición de *Helianthus tuberosus* L.

Componentes	% (b.s.)		µg/g m.s.
Cenizas	6,14 ± 0,57	Mg	27
Lípidos	1,16 ± 0,49	Si	65
Proteínas	9,78 ± 0,06	P	632
FDN ⁽¹⁾	5,47 ± 0,17	S	216
Lignina	0,52 ± 0,01	Cl	813
FDA ⁽²⁾	4,95 ± 0,16	K	8626
		Ca	279
		Fe	36

(1) Fibra Detergente Neutra (incluye lignina, celulosa y hemicelulosa)

(2) Fibra Detergente Acidez (incluye celulosa y hemicelulosa)

Kays y Nottingham (2008) también obtuvieron valores en el rango de 14-18% de carbohidratos totales en peso fresco del tubérculo. Otros autores hacen referencia a un rango de valores de contenido de inulina más amplio (del 7 a 30% en base húmeda) y consideran como valores típicos entre 8 y 21% de inulina en base húmeda (Van Loo *et al.*, 1995). Por su parte, Kocsis, Liebhard y Praznik (2007) informaron un contenido de carbohidratos solubles en agua de 62,3% en base seca (16,7%, b.h.) en tubérculos de la variedad Bianka. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en el presente estudio, a pesar de ser tubérculos de la misma variedad lo cual puede deberse al momento de cosecha y tiempo de almacenamiento.

En el tubérculo el contenido de fibras insolubles (lignina y celulosa) es bajo, como así también el de azúcares reductores (glucosa y fructosa) y sacarosa. Los valores obtenidos de cada uno de dichos componentes fueron similares a los determinados por otros autores (Ciešlik *et al.*, 2005). En particular, los valores correspondientes a fibra

insoluble fueron superiores a los presentados por Rakhimov *et al.*, (2003) para la hemicelulosa (fracción de celulosa soluble) que obtuvieron un 1,2%.

La fibra soluble del tubérculo consiste mayoritariamente en inulina y fructooligosacáridos, aunque puede contener pectinas en baja proporción. El contenido de fibra soluble determinado mediante la técnica gravimétrica-enzimática fue de 3,04% (en base seca). Dicho contenido de fibra corresponde principalmente a las sustancias pectínicas del tubérculo, y fue superior al obtenido por Rakhimov *et al.*, (2003), quienes informaron un porcentaje del 1,6% de pectinas.

El contenido de proteínas de los tubérculos (**Tabla 1.6**) estuvo en concordancia con los valores informados por Kocsis, Liebhard y Praznik (2007), quienes obtuvieron porcentajes de entre 9 y 10% en base seca, para la misma variedad de tubérculo. Se considera que el valor nutritivo de las proteínas de los tubérculos de topinambur se debe a que estos no sólo contienen los aminoácidos esenciales, sino también poseen un buen equilibrio aminoacídico que determina su alto valor alimenticio y biológico (Rakhimov *et al.*, 2003).

El porcentaje de materia grasa obtenido fue de 1,16% b.s. y estuvo en concordancia con los valores informados por Kays y Nottingham (2008).

El contenido de humedad inicial de los tubérculos frescos fue 73,22% b.s. y estuvo dentro del rango reportado por León, Gutiérrez y Antolín (2003) de entre 70 y 75%, mientras que otros autores obtuvieron valores aún mayores (80-81%) (Kays y Nottingham, 2008; Souci -Fachman-Kraut, 2000). El contenido inicial de sólidos totales de los tubérculos cosechados fue de 26,78%. Este valor concuerda con los porcentajes obtenidos por Ciešlik *et al.*, (2005), de entre 20,4 a 31,9% de materia seca (sólidos totales), donde los carbohidratos representaron el componente principal. Por otro lado, en contraste con los datos descriptos previamente, Danilcenko *et al.*, (2008) informaron menores valores de contenido de materia seca en los tubérculos recién cosechados (16,4%). Sin embargo, estos mismos autores en otros trabajos (Danilcenko *et al.*, 2011) presentaron valores de entre 20,23 a 24,65% y establecieron que dicho contenido es dependiente del cultivar, lo cual explicaría las diferencias encontradas entre estos y los obtenidos en el presente trabajo.

La medición de los sólidos solubles por refractometría es ampliamente utilizada para determinar la calidad de las partes comercializables de diferentes plantas dado que es una técnica rápida y de bajo costo para determinar carbohidratos solubles (Feller y Fink, 2007). El valor promedio de °Brix de los tubérculos fue de 23,65, encontrándose dentro

del rango de valores informados por Barta y Patkai (2007). Estos investigadores observaron que el contenido de sólidos solubles de cinco cultivares diferentes de topinambur (Tápio sima, Tápio korai, Ceglédi, Gyöngyvér y Rubik) estuvo entre el 20 y 23% b.s. No obstante, Frese y Dambroth (1987) observaron que la lectura del índice de refracción de extractos con diferentes tipos de azúcares deben ser interpretados con cautela ya que cada azúcar tiene un índice de refracción diferente. En el extracto de topinambur los carbohidratos principales son los fructanos y azúcares simples en baja proporción (entre 1 y 2% de sacarosa y 1 a 2% de azúcares reductores) (Barta y Patkai, 2007).

El contenido de minerales totales de los tubérculos fue 0,061g/g (b.s.). Este valor es similar al obtenido por Barta y Patkai (2007) quienes informaron valores superiores a $0,057 \pm 0,039$ g/g (b.s) para las diferentes variedades. Estos autores mencionaron que los niveles de potasio, calcio, fósforo, hierro fueron superiores a los de la ingesta diaria recomendada (100 mg por persona) y coincidentes con los resultados del presente trabajo (**Tabla 1. 6**). Danilcenko *et al.*, (2011) informaron valores de contenido de Ca y Mg superiores (1603 mg/kg y 734,24 mg/kg, respectivamente) a los obtenidos en este estudio, mientras que los de K fueron inferiores (31,26 mg/kg). El alto contenido de Ca asegura el desarrollo y la estabilidad de los huesos, mientras que el potasio y el magnesio son importantes en el equilibrio catiónico del organismo humano, en la contracción muscular y en la transmisión nerviosa (Kang *et al.*, 2007).

4. Conclusión

La composición fisicoquímica de los tubérculos de topinambur (*H. tuberosus* L.) está influenciada por factores fisiológicos, agroclimáticos y por la variedad a la que pertenece el cultivo. Debido a que en Argentina aún no se cuenta con un registro de los cultivares existentes es de fundamental importancia la caracterización fisicoquímica de los tubérculos con los que se trabaja dado su variabilidad composicional. El nutriente principal de los tubérculos de topinambur es la fibra soluble (principalmente fructanos del tipo inulina), sin embargo, tiene un alto contenido de minerales y de proteínas de alto valor biológico. Dichos componentes lo posicionan como cultivo de apreciable valor nutricional e industrial con aplicaciones diversas en el desarrollo de productos alimenticios.

5. Abreviaturas

CA: carbohidratos
CE: cenizas
CF: carbohidratos fermentables
EE: extracto etéreo
FDA: fibra detergente ácida
FDN: fibra detergente neutra
FDT: fibra dietaria total
FI: fibra insoluble
FOS: fructooligosacaridos
GP: grado de polimerización
GPn: grado de polimerización promedio
PB: proteína bruta

6. Referencias

- AOAC. (1990). Official methods of analysis, 15th ed. AOAC International, Gaithersburg, USA.
- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg, Maryland, USA, AOAC International.
- Archer, B. J., Stuart, K., Devereux, J. H. y Baxter, A. L. (2004). Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety food intake in men. *British Journal of Nutrition*, 91(4): 591-599.
- Ayerbe Mateo-Sagasta, L. y Conde García, J. R. (1993). El cultivo de la patata y utilidad de sus tubérculos. *Revista Agricultura*, 727(1): 140-149.
- Baldini, M. D., Danuso, F., Turi, M. y Vannozzi, G. P. (2004). Evaluation of new clones of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for inulin and sugar yield from stalks and tubers. *Industrial crops and products*, 19(1): 25-40.
- Barloy, J. (1988). Identification criteria for Jerusalem artichoke clones. In: Topinambur (Jerusalem artichoke). Commission of the European Communities. Report EUR 11855 EN- FR-IT. Editado por: Grasso G. y Gosse G. 125-136.
- Barta J. y Pátkai G. (2007). Chemical Composition and storability of Jerusalem artichoke tubers. *Acta Alimentaria*, 36(2): 257-267.
- Bauer, H. A. y Laso, R. H. (1974). El cultivo del topinambur (*Helianthus tuberosus* L.). Información técnica, N° 58. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi, Argentina.
- Chekroun, M. B. (1996). Comparison of fructose production by 37 cultivars of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24(1): 115-120.
- Chekroun, M. B., Amzile, J. y Yachioui, M. (1994). Qualitative and quantitative development of carbohydrate reserves during the biological cycle of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22(1): 31-37.
- Chubey, B. B. y Dorrell, D. G. (1974). Jerusalem artichoke: a potential fructose crop for the prairies. *Journal Food Science and Technology*, 7(2): 98-100.

- Cieślik, E., Kopeć A. y Praznik, W. (2005). Healthy properties of Jerusalem artichoke flour (*Helianthus tuberosus* L.). El. J. Polish Agric. Univ., Food Sci. Technol., vol. 8/2/art-37, www.ejpau.media.pl/volume8/issue2/art-37.html.
- Cieslik, E. y Sikora, E. (1999). Correlation between the levels of nitrates and nitrites and the contents of iron, copper and manganese in potato tubers. Food Chemistry, 67(3): 301-304.
- Cosgrove, D. R., Oelke, D. A., Doll, J. D., Davis, D. W., Undersand, D. y Oplinger, E. (1991). Alternative Field Crops Manual. Jerusalem artichoke. Obtenido de En: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/jerusart.html> (28/07/2011).
- Coussement, P. (1999). Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. Journal of Nutrition, 129(7): 1412-1417.
- Danilcenko, H., Jariene, E., Gajewski, M., Cerniauskiene, J., Kulaitiene, J., Sawicka, B. y Aleknaviciene, P. (2011). Accumulation of elements in some organically grown alternative horticultural crops in Lithuania. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 10(2): 23-31.
- Daniľčenko, H., Jariene, E. y Aleknaviciene, P. (2008). Quality of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers in relation to storage conditions. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 36(2): 23-27.
- De Leenheer, L. y Hoebregs, H. (1994). Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. Starch, 46(5): 193-196.
- De Pace, C., Del Puglia, S., Ruggeri, R., Vittori, D. y Rossini, F. (2010). New clones of *Helianthus tuberosus* L. enlarge options for the sustainable integration of bioenergy crops in current cropping systems of central Italy. DOI:10.5071/18thEUBCE2010-OD4.5; ISBN/ISSN: 978-88-89407-56-5. 214-219 pp.
- Denoroy, P. (1996). The crop physiology of *Helianthus tuberosus* L.: a model orientated view. Biomass and bioenergy, 11(1): 11-32.
- Duke, J.A. (1983) *Helianthus tuberosus* L. Handbook of Energy Crops. Disponible en: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Helianthus_tuberosus.html (24/04/2011).
- Ernst, M. N., Chatterton, J. y Harrison, P. A (1996). Purification and characterization of a new fructan series from species of *Asteraceae*. New Phytologist, 132(1): 63-66.

- Frese, L., Dambroth, M. (1987) Research on the genetic resources of inulin containing chicory (*Cichorium intybus*) Plant Breed, 99(4): 308-317.
- Feller, C. y Fink M. (2007) Refraction as a Measure of Soluble Carbohydrates in Storage Roots of Asparagus. HORTSCIENCE 42(1): 57-60.
- Fernández, J. (1998) Production costs of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for ethanol production in Spanish irrigated lands. En: <http://www.eeci.net/archive/biobase/B10245.html>.
- Fleming, S. E. y Groot Wassink. J. W. (1979). Preparation of high fructose syrup from the tubers of Jerusalem artichokes. Critical Review Food Scienc Nutrition, 12(1): 1-28.
- Franck, A. M. E. (2000). Inulin and oligofructose. LFRA Ingredient Handbook: Prebiotics and Probiotics. Leatherhead Publishing, Surrey, 1-18.
- Fujishima, M. K., Furuyama, Y., Ishiro, S., Onodera, E., Fukushi, N., Benkeblia y Shiomi., N. (2009). Isolation and Structural Analysis *In Vivo* of Newly Synthesized Fructooligosaccharides in Onion Bulbs Tissues (*Allium cepa* L.) during Storage. International Journal of Carbohydrate Chemistry. Article ID 493737, 9 pp.
- Guiragossian, V. Y., Van Scoyoc, S. W. y Auxtell, J. D. (1977). Chemical and Biological Methods for Grain and Forage Sorghum, Departament of Agronomy Internacional Programs in Agriculture, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.
- Guiraud, J. P. y Galzy, P. (1989). Inulinases and inulin utilisation by yeasts. Yeast: Biotechnology, Biocatalysis, Editores: Verachtert H., De Mot R., Dekker, M. Inc. Publ. New York, 255-296.
- Guiraud, J. P., Caillaud, J. M. y Galzy, P. (1982). Optimization of alcohol production from Jerusalem artichokes. European Journal Applied Microbiology and Biotechnology. Industrial Microbiology, 14(2): 81-85.
- Gupta, A. K. y Kaur, N. (2000). Fructan metabolism in jerusalem artichoke and chicory. Developments in Crop Science, 26(1): 223-248.
- Hellwege, E. M., Dominique Gritscher, M. R., Willmitzer L. y Heyer, A. G. (1998). Diferences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1- FFT cDNAs. FEBS Letter, 427(1): 25-28.

- Hidaka, H. y Hirayama, M. (1991). Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochemical Society Transactions*, 19(3): 561-565.
- Hoebregs H. (1997) Fructans in food and food products, ion-exchange-chromatographic method: Collaborative study. *Journal of the Assoc. of Official Analytical Chemists* 80: (1) 1029-1037.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (1992) Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th edn., In: Paquot C, Hautfenne A (eds), Blackwell Scientific, London.
- Kang I., Yu Suk Kim M. D., Choongbai Kim M. D. (2007). Mineral deficiency in patients who have undergone gastrectomy. *Nutrition* 23(34): 318-322.
- Kaur, N., y Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27(7): 703-714.
- Kays, S. J. y Nottingham, F. (2008). *Biology and Chemistry of Jerusalem artichoke Helianthus tuberosus L.* CRC Press. USA, 478.p.
- Kays, S. J. y Kultur, F. (2005). Genetic variation in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) flowering date and duration. *HortScience*, 40(6): 1675-1678.
- Kiehn, F. A. y Chubey, B. B. (1985). Challenger Jerusalem artichoke. *Canadian Journal of Plant Science*, 65(3): 803-805.
- Kocsis, L., Liebhard P. y Praznik W. (2007). Effect of Seasonal Changes on Content and Profile of Soluble Carbohydrates in Tubers of different varieties of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 9401–9408
- Kosaric, N., Cosentino, G. P., Wiczorek, A. y Duvnjak, Z. (1984). The Jerusalem artichoke as and agricultural crop, *Biomass*, 5(1): 1-36.
- León, O., Gutiérrez, J. y Antolín G. (2003). Extracción de inulina a partir de cultivos energéticos. II congreso nacional de ciencia y tecnología de los alimentos, pp. 565-568.
- Liang, C., Xiao-Hua, L., Zhang, Z., Zheng, X., Rengel, Z. y Zhao-Pu, L. (2011). Cadmium accumulation and translocation in two Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) cultivars. *Pedosphere*, 21(5): 573-580.
- Lingyun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhuab F. y Fan, Z. (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*, 79(3): 1087-1093.

- Long, X., Huang, Z., Li, Q., Zed, R. y Lui, Z. (2010). Seawater stress differentially affects germination, growth, photosynthesis, and ion concentration in genotype of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal Plant Growth Regulation*, 29(2): 223-231.
- Losavio, N., Lamascese, N. y Vonella, A.V. (1997). Water requirements and nitrogen fertilization in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) grown under mediterranean conditions. *Acta Hortícola*, 449(1): 205-210.
- Madrigal, L. y Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4): 387-396.
- Matías, J., González, J., Royano, L., y Barrena, R. A. (2011). Analysis of sugars by liquid chromatography-mass spectrometry in Jerusalem artichoke tubers for bioethanol production optimization. *biomass and bioenergy*, 35(5): 2006-2012.
- Meijer, W. y Mathijssen, E. (1996). Analysis of crop performance in research on inulin, fibre and oilseed crops. *Industrial Crops and Products*, 5(4): 253-264.
- Mombelli, J. C. (2005). Evaluación agronómica del topinambur *Helianthus tuberosus* L. Parte 1: producción de forraje, 126 pp.
- Mullin, W. J., Modler, H. W., Farnworth, E. R. y Payne, A. (1994). The macronutrient content of fractions from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). *Food Chemistry*, 51(3): 263-269.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they?. *Journal Nutrition*, 129(7): 1402-1406.
- Official methods of analysis of AOAC International (2000), editado por William Horwitz, 17th ed, Gaithersbrg, MD : AOAC International.
- Paseephol, T. (2008). Characterisation of Prebiotic Compounds from Plant Sources and Food Industry Wastes: Inulin from Jerusalem Artichoke and Lactulose from Milk Concentration Permeate (Doctoral dissertation, RMIT University). 197 pp.
- Pignatelli, V., Alfano, V., Correnti, A. y Farneti, A. (2010). An innovative Project for the production of biogás by co-digestion of the topinambur at the landfill of Cupinoro (Bracciano, RM). *Proceedings Venice 2010, Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste*. 8-11 November.
- Pollock, C. J. (1986). Fructan and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist*, 104(1): 1-24.
- Pollock, C. y Cairns, A. (1991). Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1): 77-101.

- Proskey, L., Asp, N.-G., Scheweizer, T. F., DeVries, J. W. y Furda, I. (1988). Determination of insoluble and soluble, and total dietary fibre in foods and food products: Interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71(2): 1017-1023.
- Ragab, M. E., Okasha, K. A., El-Oksh, I. I. y Ibrahim., N. M. (2003). Effect of cultivar and location on yield, tuber quality, and storability of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Growth, yield, and tuber characteristics, XXVI Congreso Internacional Horticultural: Asian Plants: Genetic Resources, Cultural, 620(1): 103-111.
- Rakhimov, D., Arifkhodzhaev, A., Mezhlumyan, L., Yuldashev, O., Rozikova, U., Aikhodzhaeva, N. y Vakil, M. (2003). Carbohydrates and proteins from *Helianthus tuberosus*. *Brief Communications. Chemistry of natural compounds*, 39(3): 312-313.
- Raso, E. (1990). Jerusalem artichoke. Effect of nitrogen-potassium fertilizing. *Terra e Sole*, 45(575-576): 431-433.
- Rébora, C. (2008a). Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.): usos, cultivo y potencialidad en la región de Cuyo. *Horticultura Argentina*, 27(63): 30-37.
- Rébora, C., (2008b). Caracterización de germoplasma de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) por aptitud agronómica e industrial. (Tesis de Maestría en Horticultura. Disponible en Biblioteca de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo).
- Ritsema, T. y Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3): 223-230.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A. y Glenn, R. (1998). The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *Journal Nutrition*, 128(1): 11-19.
- Rodrigues, M. A., Sousa, L., Cabanas, J. E. y Arrobas, M. (2007). Tuber yield and leaf mineral composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) grown under different cropping practices. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(4): 545-553.
- Rumessen, J., Bode, S., Hamberg, O., y Gudmand-Hoyer, E. (1990). Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, absorption, fermentation, and influence on blood glucose, insulin, and C-peptide responses in healthy subjects. *American Journal Clinical Nutrition*, 52(4): 675-676.

- Saengthongpinit, W. y Sajjaanantakul, T. (2005). Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1): 93-100.
- Schorr-Galindo, S. y Guiraud, J. P. (1997). Sugar potential of different Jerusalem artichoke cultivars according to harvest. *Bioresource Technology*, 60(1): 15-20.
- Seiler, G. J. (1990). Protein and mineral concentrations in tubers of selected genotypes of wild and cultivated Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*, *Asteraceae*). *Economic Botany* 44(3): 322-335.
- Seiler, G. J. y Campbell, L. G. (2006). Genetic variability for mineral concentration in the forage of Jerusalem artichoke cultivars. *Euphytica*, 150(1-2): 281-288.
- Somda, Z. C., McLaurin, W. J. y Kays, S.J. (1999). Jerusalem artichoke growth, development, and field storage. II. Carbon and nutrient element allocation and redistribution. *J Plant Nutr*, 22(8): 1315-1334.
- Souci, S. W., Fachmann, W. y Kraut, H. (2000). *Food Composition and Nutrition Tables*, 6th ed., CRC Press. 1300 pp.
- Takeuchi, J., y Nagashima, T. (2011). Preparation of dried chips from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers and analysis of their functional properties. *Food Chemistry*, 126(3): 922-926.
- Uzal, C. (1991). *Praderas y Forrajes*. Mundi-Prensa Libros, S.A. 332pp.
- Van Loo, J., Coussment, P., Leenheer, L., Hoebregs, H. y Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as a natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6): 525-552.
- Whitney, E.N. y Rolfes, S.R. (1999). *Understanding Nutrition*, 8th ed., West/Wadsworth, Belmont, CA.
- Xiao Yong Ma, L. H., Hua Zhang, L., Bo Shao, H., Xu, G., Zhang, F., Tai Ni, F. y Brestic, M. (2011). Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use values. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8): 1275-1282. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/JMPR>.

Capítulo 2

Cambios en las características fisicoquímicas del topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) durante el almacenamiento en frío

Este capítulo describe el efecto del almacenamiento sobre los tubérculos y su composición, además de la obtención y caracterización de los carbohidratos ricos en inulina obtenidos de topinambur.

1. Introducción

1.1. Efectos de las condiciones de almacenamiento sobre los tubérculos y su composición

El almacenamiento a largo plazo de los tubérculos es uno de los principales problemas asociados a la producción comercial del cultivo de topinambur debido a que son difíciles de conservar fuera del suelo, dado que no poseen una peridermis desarrollada. Los tubérculos requieren condiciones de alta humedad durante el almacenamiento para evitar la pérdida de agua, sin embargo, dicha condición favorece al mismo tiempo el desarrollo bacteriano, que conduce a la podredumbre del mismo (Saengthogpinit y Sajjaanantakul, 2005; Modler *et al.*, 1993).

Aún no se ha desarrollado un método rápido y económico para procesar gran cantidad de tubérculos y evitar el alto costo de almacenamiento (Lingyun *et al.*, 2007) que se traduce en grandes pérdidas de la calidad. Las causas principales de la pérdida de calidad son la deshidratación, descomposición y brotación, así como también la degradación de los carbohidratos de reserva (Saengthogpinit y Sajjaanantakul, 2005; Ritsema y Smeekens, 2003; Modler *et al.*, 1993) que están ubicados en las vacuolas celulares de los tejidos frescos de las plantas como soluto en estado coloidal.

Durante el almacenamiento del tubérculo se produce la depolimerización de fructanos catalizada por la acción combinada de enzimas. Las fructano exo- hidrolasas (FH) rompen los enlaces β (2 \rightarrow 1) liberando fructosa y cadenas cortas de polisacáridos (Suzuki y Chatterton, 1996). Por su parte las fructosil transferasas (FFT) catalizan la transferencia de los residuos de fructosa de una molécula de sacarosa a otra y producen

la síntesis de fructanos de bajo grado de polimerización (GP) (Martínez Noël y Pontis, 2000; Schorr-Galindo y Guiraud, 1997; Edelman y Jefford, 1968). También la enzima invertasa actúa sobre la molécula terminal de sacarosa dando como resultado fructosa y glucosa libres (Fukay, 1997).

Kang *et al.* (1993) sugirieron que la temperatura de almacenamiento óptima para evitar variaciones significativas en la composición de fructanos es la temperatura de congelación. No obstante, a dicha temperatura se producen importantes pérdidas de agua y compuestos solubles.

Otras alternativas de conservación de los tubérculos pueden ser bajo tierra (hasta la cosecha primaveral), en cámara a 0 °C y 90- 95% de humedad relativa (HR) o bajo techo con arena granítica seca entre las capas de tubérculos (Rébora, 2008a). La alternativa más utilizada es dejarlos en la tierra y cosecharlos de acuerdo a la capacidad diaria de las instalaciones de procesado (Frese, 1993). También el almacenamiento en cámaras con temperatura y humedad controlada (Rébora, 2008b) en bolsas de polipropileno, a granel o cubiertos con turba húmeda son alternativas viables para la conservación de tubérculos (Danilčenko *et al.*, 2008). Estos autores concluyeron que la conservación de los tubérculos a granel cubiertos con turba húmeda produce las menores pérdidas de peso, aunque hay una disminución del contenido de azúcares totales. Cabezas *et al.* (2002) encontraron que los tubérculos mantenidos durante 30 días a 18 °C presentaron pérdidas de agua de más del 20%, dicha disminución en el contenido de agua está directamente relacionada con la tasa de transpiración de los tubérculos. En tanto, Kang *et al.* (1993) mostró que si bien los tubérculos se mantienen firmes y crujientes por 10 semanas entre 2 y 5 °C y 95% (HR), el tiempo máximo para mantener un alto grado de polimerización promedio (GP_n) de los fructanos es de 3 a 7 semanas. Por lo que, el GP y las características de turgencia de los tubérculos de topinambur podrían verse afectados con el tiempo y la temperatura de almacenamiento de los tubérculos (Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005) lo cual influye en la capacidad de extracción de los fructanos.

1.2. Extracción de fructanos

La solubilidad de los fructanos disminuye con el decrecimiento de la temperatura (Moerman, Van Leeuwen y Delcour, 2004) y su solubilidad en agua disminuye con el grado creciente de polimerización, siendo las moléculas de alto GP las de menor solubilidad.

En la actualidad, la fuente más explotada para la obtención industrial de inulina y fructooligosacáridos es la raíz de *Dahlia spp.* (dalia) y *Chicorium intybus* (achicoria). La estructura de la inulina y su contenido en el órgano de almacenamiento está determinada por la fuente desde donde se extraiga (Coussement, 1999; De Leenheer y Hoebregs, 1994).

La inulina está compuesta por una mezcla polidispersa de polímeros y oligosacáridos. Está constituida por unidades de fructosil con uniones β (2 \rightarrow 1) que puede o no tener una unidad de glucosa terminal mediante un enlace α (1 \rightarrow 2) (Kays y Nottingham, 2007; Carabin y Flamm, 1999; Roberfroid, Gibson, y Delzenne, 1993). Desde el punto de vista químico es una cadena lineal de α - D glucopiranosil, (β - D- fructofuranosil) n-1, β - D-fructopiranosil, (β - D-fructofuranosil, β - D-fructofuranosil) n-1, β - D-fructofuranosil.

La obtención de inulina de cadena larga (GP 10-60; GPn 25) requiere de técnicas de separación física, si se debe eliminar los oligómeros con GP <10 (Zimeri y Kokini, 2002). En el proceso de obtención de inulina, parte de los hidratos de carbono, minerales y péptidos presentes en la matriz vegetal de origen, se extraen conjuntamente con la inulina y deben eliminarse en etapas posteriores. En la **Figura 2.1** se visualiza cada una de las etapas del proceso de extracción de inulina a partir de una fuente vegetal como es el topinambur (*Helianthus tuberosus* L.).

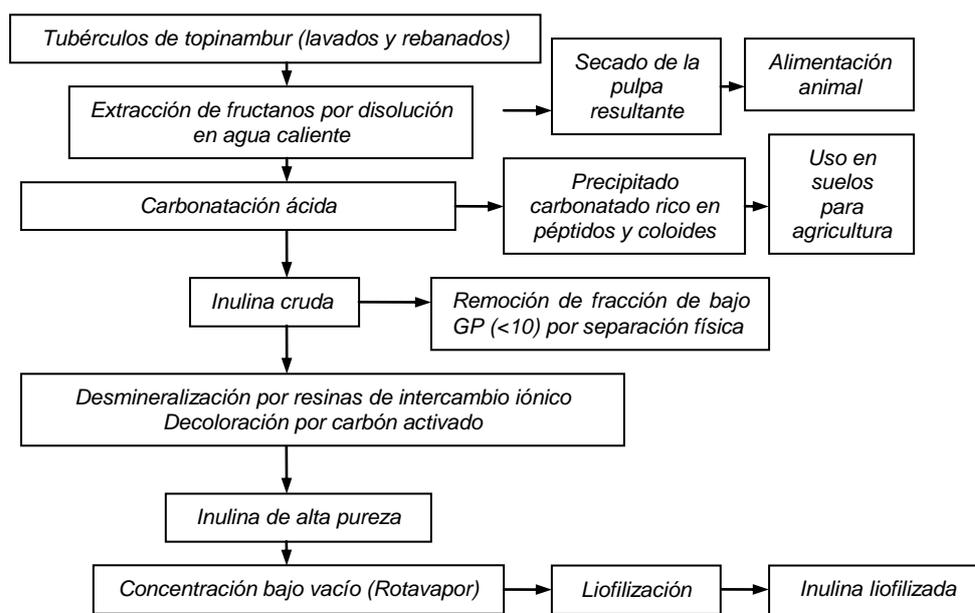


Figura 2.1. Proceso de obtención de inulina a nivel de laboratorio.

La extracción de inulina incluye etapas en medio acuoso, sin la adición de disolventes orgánicos, lo cual es de interés para el uso en la industria alimentaria y para el cuidado del medio ambiente (López-Molina *et al.*, 2005).

Uno de los métodos de extracción de inulina a partir de topinambur requiere de una etapa de extracción con agua hirviendo durante 10-15 minutos (Laurenzo *et al.*, 1999). Los datos presentados por Lingyun *et al.*, (2007) mostraron que el rendimiento de extracción de inulina utilizando agua como solvente aumenta cuando la temperatura y la relación disolvente: sólido aumentan.

Otro método es la precipitación en alcohol, que si bien es eficiente y ampliamente utilizado en el laboratorio se considera antieconómico e inadecuado a escala industrial. Otra alternativa es la extracción asistida por ultrasonido, donde el material interacciona con las ondas sonoras de alta frecuencia, rompe las paredes celulares vegetales facilitando la liberación de compuestos extraíbles. Este método es un método prometedor para mejorar el proceso de extracción. No obstante, la propagación y la interacción de las ondas sonoras altera las propiedades física y química de los componentes que están sometidos a ultrasonido.

El objetivo específico de este capítulo fue estudiar los cambios que se producen durante 8 meses de almacenamiento de tubérculos de topinambur a 4-5 °C y 98% HR, en cuanto a sus características estructurales, su contenido de carbohidratos y grado de polimerización promedio de los fructanos extraídos de los mismos.

2. Materiales y Métodos

2.1. Almacenamiento y acondicionamiento de los tubérculos

Los tubérculos de topinambur (*H. tuberosus* L.) fueron cosechados después de diez meses de plantados, diez días después de su cosecha se lavaron manualmente utilizando un cepillo para eliminar los residuos de tierra y reducir la carga de microorganismos en la superficie, para lo cual se mantuvieron en remojo en una solución de hipoclorito de sodio 0,038 M por 30 minutos (Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005) y se secaron con una corriente de aire. Este procedimiento se repitió a intervalos de 2 meses de almacenamiento, para su mejor conservación. Los tubérculos limpios y secos fueron embalados en bolsas de tejido plástico y almacenados en cámara a 4-5 °C y una humedad relativa mínima de 98%, hasta su uso. Se tomaron lotes de 2 kg de tubérculos

a los 0, 2, 4 y 8 meses de almacenamiento, respectivamente, para su posterior procesamiento y análisis.

2.2. Determinación de sólidos solubles refractométricos (°Brix) en los tubérculos

El principio y el procedimiento de la técnica fueron descritos en el **Capítulo 1**.

2.3. Materia Seca de los tubérculos. Método de la estufa de vacío

El principio y procedimiento de la técnica fue descrito en el **Capítulo 1**.

2.3.1. Curva de deshidratación del tubérculo vs. tiempo

Para trazar la curva de deshidratación vs. tiempo durante el secado en estufa de vacío se registró el peso cada una hora y se calculó la pérdida de humedad durante el secado para cada estadio de almacenamiento de los tubérculos frescos.

2.4. Liofilización de los tubérculos

Para una conservación adecuada de los tubérculos muestreados, se redujo el contenido de humedad a valores inferiores a 15 %, para evitar el desarrollo de hongos sobre la superficie, detener los cambios físico-químicos y así mantener el perfil de hidratos de carbono de los tubérculos por períodos superiores a los 18 meses (Kocsis *et al.*, 2007; Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005).

2.4.1. Procesamiento

Los tubérculos de cada lote fueron cortados en rodajas de aproximadamente 2 mm de espesor, utilizando una procesadora doméstica de alimentos. Las rodajas fueron dispuestas en bandejas de aluminio, se congelaron a -18 °C y se liofilizaron (Rificor L-A-B3-C, Rificor, Argentina) a -40 °C y 0,014 mm de Hg de presión hasta peso constante (72 h). El material liofilizado se almacenó en bolsas con cierre hermético (Ziploc, Argentina) bajo atmósfera de nitrógeno. Las bolsas se dispusieron dentro de cajas plásticas herméticamente cerradas, en un lugar fresco y seco (15-25 °C, 40% HR) hasta su análisis.

2.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de tubérculos liofilizados

Los tubérculos almacenados en frío (4 °C) durante diferentes períodos fueron cortados en rodajas (de un tamaño de 2 mm de espesor y 12 por 12 mm, sin dañar la estructura) y liofilizados. Dichas muestras se montaron sobre una cinta de carbono de doble cara colocada sobre el soporte (*stap*). Se utilizó un microscopio electrónico de barrido

(EVOMA10, Carl Zeiss SMT Ltd., UK) que operó a 20 Kv a presión variable de entre 60 y 80 Pa, para visualizar la microestructura de los tubérculos de topinambur liofilizados mediante imágenes en un rango de magnificaciones entre 19 y 1120 X y se seleccionaron las imágenes representativas.

2.6. Preparación del extracto rico en carbohidratos solubles (CRI)

2.6.1. Procesamiento

Las condiciones de extracción se establecieron en base a los reportes encontrados en bibliografía (Huaxi *et al.*, 2010; Arango Bendoya *et al.*, 2008; Chekroun *et al.*, 1996).

Tabla 2.1. Parámetros operativos del proceso de extracción.

Parámetros	Valores
Tamaño de las rodajas (mm)	12 x 12 x 2
pH del extracto de inulina	6,5- 6,8
Temperatura de extracción (°C)	85
Tiempo de residencia (h)	2
Relación tubérculo liofilizado/ agua (Kg L ⁻¹)	0,125
Sólidos solubles del extracto bruto (°Brix)	10 ± 1

Las rodajas de tubérculos liofilizadas, correspondientes a cada uno de los estadios de almacenamiento se molieron en un molinillo (Braun, México) hasta obtener un polvo homogéneo. A partir de este material, se realizó la extracción de fructanos en un sistema *bach* termostatzado a 85 °C con agitación, empleando agua destilada como solvente, en una relación líquido-sólido 8:1. Este proceso se llevó a cabo durante dos horas (**Tabla 2.1**) (Matías *et al.*, 2011). El extracto se separó mediante etapas sucesivas de filtración por muselina y papel de filtro, a 80 °C. Lingyun *et al.* (2007) determinaron que la variable pH no influye significativamente en el rendimiento de extracción de inulina, por lo cual en este estudio el pH no fue modificado.

2.7. Purificación del extracto rico en carbohidratos solubles

Cuando se realizó la extracción de fructanos a partir de los tubérculos se extrajeron conjuntamente otros compuestos que no son carbohidratos, por lo que fue necesaria una purificación físico-química que incluyó precipitación, sedimentación y filtración del

extracto para remover dichos compuestos (Teodorescu, 2003). En las etapas de purificación se realizaron tratamientos con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y CO_2 . El $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se adicionó en exceso para neutralizar la carga eléctrica de las partículas promoviendo su aglomeración y su sedimentación. La carbonatación disminuyó la alcalinidad del extracto que promovió la formación de cristales de CaCO_3 con colorantes y coloides adsorbidos, además de la coagulación de proteínas. El precipitado resultante se removió por sedimentación y filtración (Huaxi *et al.*, 2010).

2.7.1. Procedimiento

Un volumen de 230 mL de extracto se ajustó a pH 11,2 agregando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sólido y se mantuvo en agitación a 65 °C durante 30 minutos. Luego, se elevó la temperatura a 85 °C y se agregó $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se agitó durante 45 minutos hasta la formación de un precipitado (pH cercano a 12), se separó el precipitado por filtración y se descartó. El filtrado se carbonató por burbujeo rápido con CO_2 a 65 °C, hasta pH 10,8 y luego se centrifugó a 3200 rpm, durante 10 minutos (Presvac DCA-300, PRESVAC S.R.L., Argentina). El sobrenadante obtenido se separó mediante filtración bajo vacío con papel de filtro (S&S N° 859) a 65 °C. Se realizó una segunda etapa de carbonatación por burbujeo con CO_2 , hasta pH 8,9. Finalmente, se centrifugó y se filtró nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores. El extracto obtenido se mantuvo a 65 °C durante 15 minutos con la adición de carbón activado en polvo en una proporción del 1% (p/p). El carbón activado se separó mediante filtración con papel bajo vacío y se obtuvo un extracto límpido amarillo pálido que fue liofilizado para su posterior uso.

2.8. Procedimiento de liofilización de los extractos

Los extractos sin purificar y los purificados, correspondientes a cada uno de los estadios de almacenamiento de los tubérculos, se liofilizaron en frascos de vidrio con tapa a rosca, bajo las mismas condiciones utilizadas para los tubérculos (**Sección 2.4** del presente **Capítulo**). El polvo resultante de cada extracto fue llamado carbohidratos ricos en inulina (CRI y CRIp, donde p significa purificados). Los CRI se almacenaron en los mismos frascos, bajo atmósfera de nitrógeno en un lugar fresco (15- 25 °C) y seco (40% HR) para su posterior utilización como sustrato en el estudio de capacidad prebiótica y en la elaboración de panes funcionales. Los CRIp se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los CRI para su posterior resuspensión y análisis cromatográfico.

2.8.1. Análisis de carbohidratos extraídos de tubérculos de topinambur

2.8.2. Reactivos

Se emplearon oligofruetosacáridos Orafiti P95, inulina HP e inulina GR elaborados por Beneo-Orafiti (Bélgica), y gentilmente donados por Saporiti SA (Argentina), así como glucosa, fructosa y sacarosa de Sigma-Aldrich (EEUU). Según declaración del fabricante, la inulina GR se compone de >99,5% de inulina ($GP_n \geq 10$) y < 0,5% glucosa + fructosa + sacarosa; y la inulina HP contiene > 90% de inulina ($GP_n > 23$) < 4% de glucosa + fructosa y < 8% de sacarosa.

2.8.3. Procedimiento

Se determinó la composición de los CRIP de los diferentes estadios de almacenamiento de los tubérculos de topinambur por HPLC. Para ello se determinaron los contenidos de glucosa, fructosa, sacarosa e inulina en los CRIP. Se considera que mayoritariamente los fructanos presentes inicialmente en los tubérculos son inulina. Los fructanos tienden a precipitar en solución por lo cual las muestras se calientan a 80 °C y se enfrían a temperatura ambiente antes de su análisis (León *et al.*, 2003). Se utilizó un sistema cromatográfico Alliance e2695, (Waters, EEUU), equipado con una columna Aminex HPX-87C (Bio-Rad, EEUU) de 300 mm x 7,8 mm, que se mantuvo a 65 °C, con un bucle de inyección de 10 µL y un detector de índice de refracción (Mod. 2414, Waters, EEUU). Como fase móvil se empleó agua tridestilada a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. El programa de procesamiento de datos utilizado fue Empower 2 (Shimadzu, Japón).

Tabla 2.2. Constantes de las rectas de calibración de carbohidratos.

Carbohidratos	$k=C(\text{mg/mL})/\text{Area}$	r^2
Inulina HP	$5,5720 \cdot 10^{-6}$	0,9929
Sacarosa	$4,4403 \cdot 10^{-6}$	0,9969
Fructosa	$5,4870 \cdot 10^{-6}$	0,9980
Glucosa	$4,7707 \cdot 10^{-6}$	0,9990

La cuantificación se realizó por comparación de áreas a través del método de estándar externo, utilizando las soluciones de referencia a diferentes concentraciones de hidratos de carbono, que fueron desde 1 a 10 mg/mL. Los patrones mencionados se utilizaron

para confeccionar las curvas patrones y sus correspondientes ecuaciones de ajuste, detalladas en la **Tabla 2.2**.

Las muestras de CRIP de cada estadio se diluyeron hasta una concentración de 5 mg/mL de agua grado HPLC, se prepararon dos soluciones a partir de cada CRIP que se pasaron por baño ultrasónico (Sonorex, RK 255H) a 80 °C durante 1 min. Sin filtrar se inyectaron 10 µL de cada una de las muestras al equipo HPLC y se realizó el análisis a cada solución por duplicado.

2.9. Hidrólisis ácida de los CRIP

Dado que el tiempo y la temperatura de calentamiento del proceso de hidrólisis son las variables más influyentes en la hidrólisis ácida de la inulina (León *et al.*, 2003), se desarrollaron ensayos contemplando dichas variables.

2.9.1. Determinación del tiempo y temperatura de hidrólisis para CRIP

Reactivos y procedimiento

El liofilizado correspondiente al extracto purificado (0,01 g de CRIP) se suspendió en 1 mL de diferentes soluciones de ácido clorhídrico 0,001 M y 0,01 M, respectivamente y las suspensiones resultantes se sometieron a distintas temperaturas en baños termostatzados (70 o 90 °C) durante 0,5, 1, 2, 4, 6 y 8 horas, dentro de tubos de ensayo con tapa a rosca y se taparon. Cada hidrolizado se neutralizó en agitación con hidróxido de sodio 0,01 M y 0,001 M, de acuerdo a la molaridad del ácido utilizado, se obtuvieron así hidrolizados de los CRIP para su posterior análisis cromatográfico. El pH de las muestras fue entre 5 y 6, determinado mediante tiras de pH (Neutralit pH 5,5 a 9,0 Merck N° 1.09564.0003). Dicho rango de pH es tolerable por la columna cromatográfica. Los hidrolizados se trasvasaron a viales (Fisher OMC-54195, 1,5 mL) empleando jeringas de plástico estériles, se taparon (Fisher lids & septum OMC-54195) e inyectaron 10 µL de cada muestra al equipo cromatográfico antes descrito, bajo las mismas condiciones de trabajo.

El contenido de carbohidratos hidrolizados y residuales de cada condición de hidrólisis fue calculado en base a la interpretación de los cromatogramas obtenidos y su correlación con las curvas de calibración estándar (**Tabla 2.2**). La relación de hidrólisis se obtuvo graficando los valores de concentraciones finales de cada carbohidrato (C) sobre la concentración inicial de fructanos (C₀) versus el tiempo de hidrólisis (**Figura**

2.4) y se evaluó la eficiencia del tratamiento de hidrólisis mediante las **Ecuaciones 2.1., 2.2, 2.3, 2.4** (Heyraud *et al.*, 1984).

$$C/C_0 = Gl_f / Fct_0 \quad (2.1)$$

$$C/C_0 = Fr_f / Fct_0 \quad (2.2)$$

$$C/C_0 = Sac_f / Fct_0 \quad (2.3)$$

$$\% \text{ de hidrólisis} = 100 - \left[\left(Fct_t / Fct_0 \right) * 100 \right] \quad (2.4)$$

donde:

C/C_0 = Relación de la producción de azúcares en base a la inulina inicial

C = Concentración final del carbohidrato a analizar

C_0 = Concentración inicial de inulina

Fr_f = Fructosa final

Gl_f = Glucosa final

Sac_f = Sacarosa final

Fct_t = Fructanos hidrolizados en la muestra a tiempo t de hidrólisis

Fct_0 = Fructanos en la muestra nativa

Se asume que el contenido de fructanos (Fct) es aproximadamente igual al contenido de inulina.

Condición óptima de hidrólisis ácida

Se determinó como la condición de hidrólisis óptima para los CRIP extraídos de tubérculos de topinambur al momento en que los fructanos ya no mostraron una degradación significativa a través del tiempo (cinética de hidrólisis ácida).

El proceso de hidrólisis ácida bajo la condición óptima determinada previamente se aplicó a los CRIP correspondientes a cada uno de los estadios de almacenamiento, con el fin de caracterizar la inulina en cuanto a su grado de polimerización promedio (GPn). Para ello, se suspendió 0,02 g de cada liofilizado (CRIP) en 2 mL de ácido clorhídrico 0,01 M dentro de un tubo de ensayo con rosca dentro y se taparon. Se realizaron (por duplicado) hidrólisis de las suspensiones resultantes, manteniéndolas a 90 °C durante 6

horas, con agitación (Vortex Decalab S.B.L.). Al término del calentamiento las muestras fueron enfriadas en baño de agua fría y neutralizadas en agitación por vortex con 2 mL de solución 0,01 M (1:100 p/v) de hidróxido de sodio (NaOH, Anedra Num. 6452), obteniéndose así el hidrolizado de los CRIP neutralizado para su posterior análisis cromatográfico. Se determinó el pH de las muestras (con Tiras Neutralit pH 5,5 a 9,0 Merck No 1.09564.0003) para corroborar que esté dentro del rango tolerable por la columna cromatográfica (pH entre 5 y 6). Las muestras CRIP hidrolizadas y neutralizadas se trasvasaron a viales (Fisher OMC-54195, 1,5 mL) empleando jeringas de plástico estériles, se taparon (Fisher lids & septum OMC-54195) e inyectaron 10 μ L de cada muestra al equipo de cromatografía antes descrito, bajo las mismas condiciones de trabajo.

2.10. Rendimiento de extracción de carbohidratos y contenido de inulina

El rendimiento de extracción de carbohidratos (Y) a partir de los tubérculos se calculó como el peso de CRIP por peso de tubérculos deshidratados y se expresó como porcentaje (%). El contenido de inulina de los CRIP (ψ), equivalente a la pureza de la inulina comercial, se calculó como la relación entre el contenido de inulina estimado por HPLC y el contenido de CRIP, expresado en porcentaje (%).

El contenido de inulina (I) por peso de tubérculo seco, se expresó en % y fue estimado por la expresión:

$$I = Y\psi \quad (2.5)$$

Los CRIP extraídos de los tubérculos de topinambur contienen inulina y otros carbohidratos (considerados impurezas), incluyendo la sacarosa (S), la fructosa libre (F_L), y la glucosa libre (G_L). El contenido de estos azúcares se calculó de modo similar al desarrollado para la inulina.

Los contenidos de fructosa y glucosa que provienen de la hidrólisis de la sacarosa (F_s y G_s , respectivamente) fueron calculados por la fórmula:

$$F_s = G_s = \frac{S}{2} \quad (2.6)$$

La **Ecuación 2.6** es válida si se asume la hidrólisis total de la sacarosa.

También se determinaron los niveles de fructosa y glucosa en las muestras, antes y después de la hidrólisis ácida (F_L , G_L y F_T , G_T , respectivamente). Los contenidos de

fructosa y glucosa que provienen de la hidrólisis de la inulina (F_I y G_I respectivamente) fueron calculados por diferencia (Kocsis *et al.*, 2007):

$$F_I = F_T - (F_L + F_S) \quad (2.7)$$

$$G_I = G_T - (G_L + G_S) \quad (2.8)$$

Las Ecuaciones 2.7 y 2.8 son válidas cuando se considera la hidrólisis total de los fructanos.

2.11. Grado de polimerización promedio (GPn) de los CRIP

El procedimiento para determinar el GPn se basa en el principio de análisis del grupo final. El GPn es el valor que corresponde al número total de unidades de sacárido (unidades G y F) en una muestra de inulina dada, dividida por el número total de monosacáridos de glucosa que están presentes en la muestra. Así, el GPn de la inulina para cada CRIP se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$GP_n = \frac{F_I + G_I}{G_I} \quad (2.9)$$

La Ecuación 2.9 es válida cuando se asume que cada molécula de inulina contiene una unidad de glucosa (Kocsis *et al.*, 2007).

2.12. Análisis Estadístico

Todas las mediciones se efectuaron al menos por triplicado. Para cada ensayo, las diferencias estadísticas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de las comparaciones entre las medias con la prueba de Tukey, al nivel de significación del 5%, utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

3. Resultados

3.1. Características de los tubérculos durante el almacenamiento: composición, sólidos solubles y humedad

El contenido de humedad y de sólidos solubles de los tubérculos durante el almacenamiento a 4 °C se muestra en la **Tabla 2.3**. Se observó que el tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la disminución del contenido de

humedad, que pudo ser detectado incluso visualmente, atribuido principalmente a los procesos de respiración y transpiración de los tubérculos. Dichos resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos por otros autores (Cabezas *et al.*, 2002).

Tabla 2.3. Contenido de humedad y sólidos solubles de los tubérculos de topinambur durante el almacenamiento a 4 °C.

Tiempo de almacenamiento (meses)	Humedad (% p/p _{b.h.})	Sólidos Solubles (° Brix)
0	73,2 ± 1,0 a	23,6 ± 0,0 a
2	72,6 ± 1,0 ab	23,5 ± 0,0 a
4	69,0 ± 2,1 bc	24,0 ± 0,1 a
8	68,3 ± 2,7 c	24,6 ± 0,0 a

Las medias con una letra común dentro de una columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

b.h.: base húmeda.

En tanto, el tiempo de almacenamiento no tuvo efecto significativo sobre el contenido de sólidos solubles (°Brix) de los tubérculos, siendo el rango de valores obtenidos de entre 23 y 24 °Brix. Dichos valores fueron similares a los obtenidos por Zubr y Pedersen (1993) y Baldini *et al.* (2004). Saengthongpinit y Sajjaanantakul (2005) también mostraron un aumento no significativo del contenido de sólidos solubles con el tiempo de almacenamiento, hasta los cuatro meses. Este hecho puede atribuirse a que, si bien en periodos de almacenamiento cortos los tubérculos presentan mayores porcentajes de fructanos de cadenas largas, podrían no ser detectados refractométricamente. Este resultado es compatible con el hecho de que la relación F/G permaneció prácticamente constante durante todo el período de almacenamiento (**Figura 2.5**). En apoyo a nuestros resultados Danilčenko *et al.*, (2008) obtuvieron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles de tubérculos almacenados durante periodos superiores a cuatro meses.

Si bien la mayoría de las reacciones enzimáticas y químicas se reducen drásticamente a baja temperatura en los tubérculos de topinambur, continúa produciéndose la depolimerización de fructanos y biosíntesis de nuevas cadenas de fructanos a baja velocidad, lo cual podría explicar las diferencias en el contenido de las fracciones de sólidos solubles totales (Scollo *et al.*, 2011; Fujishima *et al.*, 2009; Danilčenko *et al.*,

2008; Kays y Nottingham, 2007; Rébora, 2008a; Saengthogpinit y Sajjaanantakul, 2005). Por otro lado, Frese y Dambroth (1987) mencionaron que la lectura del índice de refracción debe ser interpretada con cautela, debido a que los extractos vegetales pueden contener diferentes tipos de azúcares con distintos índices de refracción cada uno de ellos.

3.2. Cinética de secado en estufa de los tubérculos de topinambur almacenados

El estudio de la cinética de secado en estufa de vacío de los tubérculos de topinambur de cada estadio de almacenamiento se realizó mediante la curva del contenido de humedad de los tubérculos (X : g agua/g sólido seco) normalizada respecto al valor inicial (X_0) que se muestra en la **Figura 2.2**.

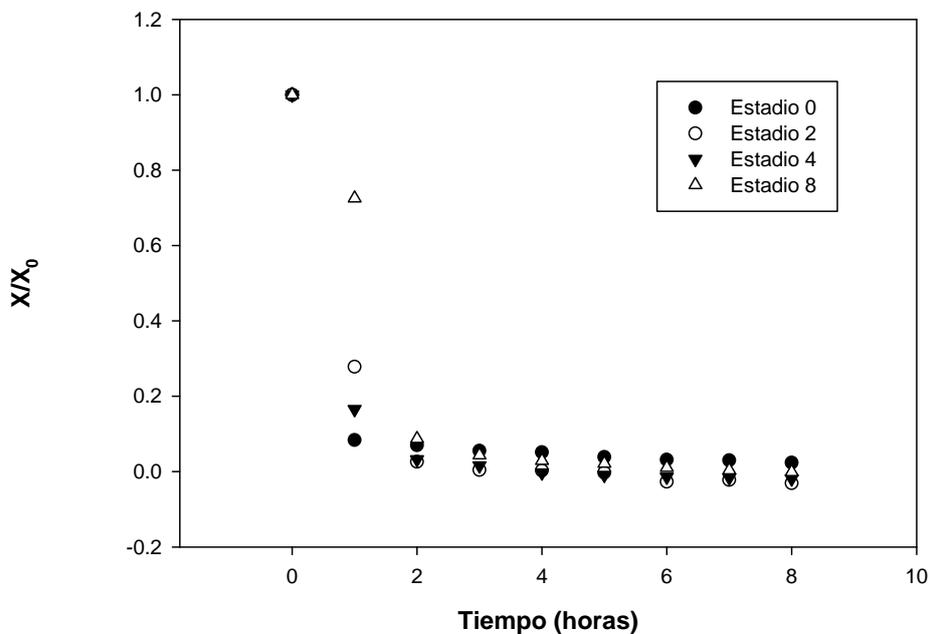


Figura 2.2. Contenido de humedad normalizado durante el secado de tubérculos frescos para los estadios de almacenamiento de 0, 2, 4, y 8 meses.

Se observa que el mayor descenso del contenido de humedad de los tubérculos (g agua/g sólido seco) ocurrió durante la primera hora de secado de los tubérculos, para todos los estadios de almacenamiento. Dentro de dicho periodo de secado, los tubérculos frescos (estadio 0) presentaron la mayor proporción de deshidratación, seguidos por los tubérculos almacenados durante 4 y 2 meses de almacenamiento, siendo menor la pérdida de humedad en los tubérculos de 8 meses de almacenamiento.

La distinta velocidad de secado podría deberse a las diferencias en la microestructura de los tubérculos frescos y almacenados (**Figura 2.3**) o bien a la forma en que el agua está presente (ligada, libre) en los mismos. En el período de secado de 1 a 6 horas el contenido de humedad de los tubérculos disminuyó en forma gradual, presentando valores de humedad similares entre los diferentes estadios. Entre las 6 y 8 horas de secado los valores de humedad de los tubérculos se mantuvieron prácticamente constantes.

3.3. Microscopía electrónica de barrido

En la **Figura 2.3** se muestra el efecto del tiempo de almacenamiento en frío sobre la microestructura de los tubérculos, en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

En el parénquima de los tubérculos frescos (**Figura 2.3-A**) el contorno de la pared celular poligonal resultó más bien redondeado y homogéneo, con celdas de tamaño relativamente pequeño y paredes celulares gruesas. Después de 2 meses de almacenamiento (**Figura 2.3-B**) las células se presentaron más alargadas y hexagonales, con paredes celulares más delgadas. Después de 4 meses de almacenamiento (**Figura 2.3-C**) las células resultaron más deformadas y de tamaño irregular que se asoció con un debilitamiento de las paredes celulares.

Posteriormente, a los 8 meses de almacenamiento (**Figura 2.3-D**) las células resultaron más compactadas o encogidas, lo que se atribuyó a la pérdida de líquido vacuolar de acuerdo con la pérdida de humedad de los tubérculos (**Tabla 2.3**), así como también a la disminución del contenido de carbohidratos de reserva (**Tabla 2.6**).

Se considera que la deshidratación sufrida por los tubérculos durante el almacenamiento en frío fue la causa principal de la pérdida de la turgencia del tejido parenquimático observado en las imágenes. A su vez, dicha deshidratación provocó cambios en la apariencia de las células que lo componen. La elongación y colapso observado de las células del tejido durante el almacenamiento se asociaron al debilitamiento de la pared celular, a la pérdida de agua (**Tabla 2.3**) y a la pérdida de carbohidratos de los tubérculos (**Tabla 2.6**). Además, durante el almacenamiento del tubérculo continúan los procesos metabólicos que requieren de la utilización activa de azúcares reductores por parte de las células del tejido y la cual estimula el envejecimiento de tubérculos (Danilčenko *et al.*, 2008).

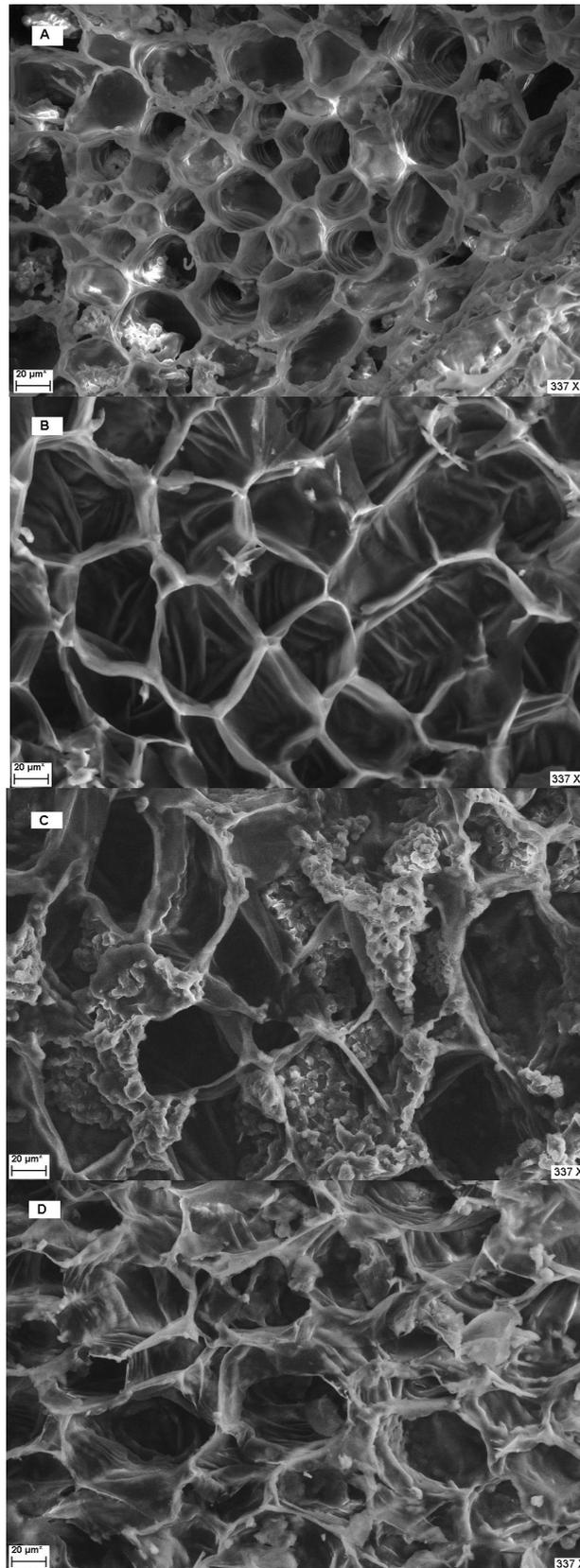


Figura 2.3. Micrografías SEM (magnificación 337 X) del parénquima de tubérculos de topinambur (*H. tuberosus* L.) almacenados a 4-5 °C y 98% HR durante diferentes tiempos: 0 meses (A), 2 meses (B), 4 meses (C), and 8 meses (D).

3.4. Determinación del tiempo y temperatura óptimos de hidrólisis ácida de los CRIp

El contenido de carbohidratos producidos por la hidrólisis en relación a la inulina inicial se muestra en la **Figura 2.4**. Los CRIp sometidos a la condición de hidrólisis menos drástica (70 °C y 0,001 M de HCl) presentaron un aumento progresivo en la relación sacarosa-inulina inicial en las primeras horas de hidrólisis (**Figura 2.4-A**) y una disminución en la relación del contenido de inulina final respecto al inicial a lo largo del tratamiento de hidrólisis, incluso en tiempos prolongados (8 horas) donde la hidrólisis fue de $16,33 \pm 0,15\%$ (**Tabla 2.4**). Dichos valores de porcentaje indicaron que la condición de hidrólisis fue insuficiente.

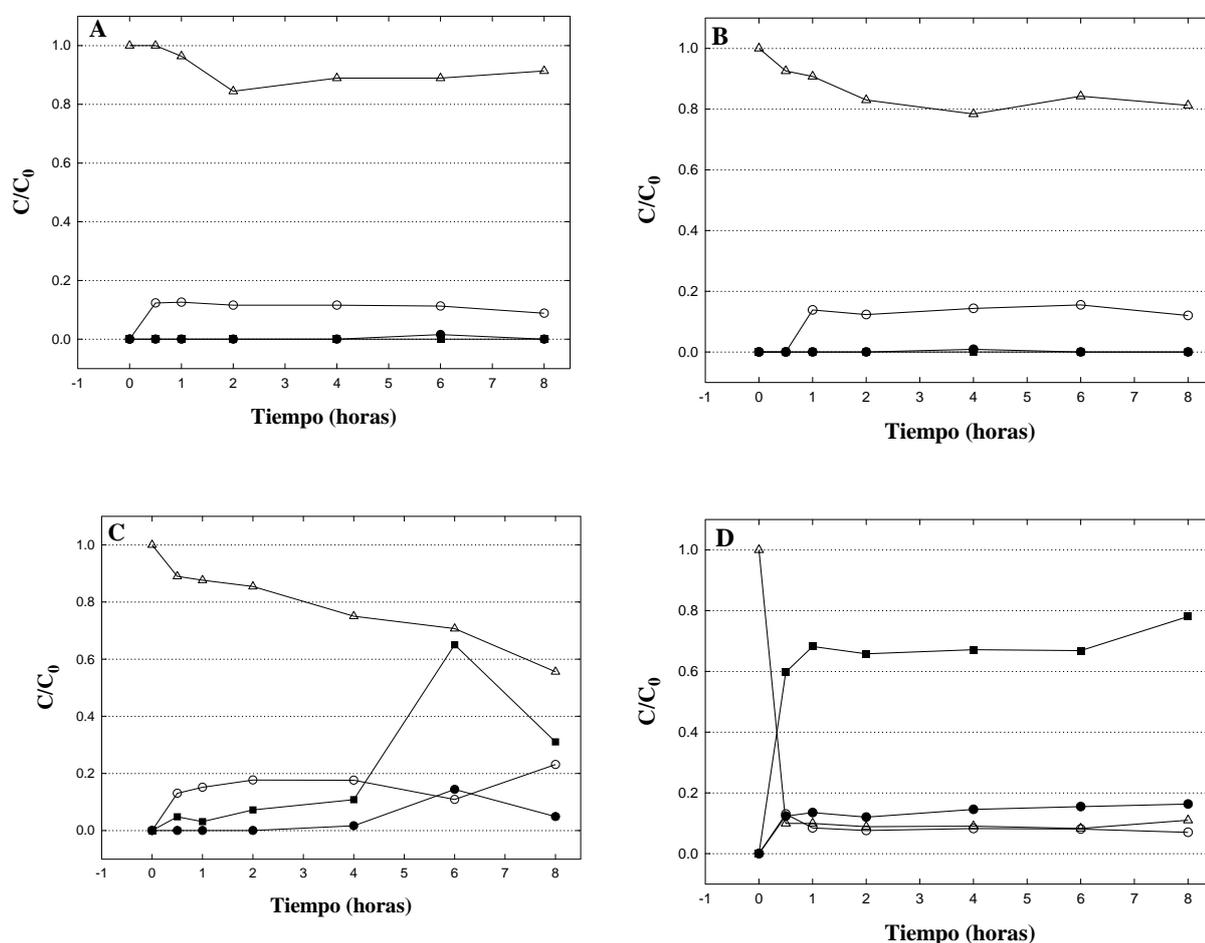


Figura 2.4. Relación de hidrólisis ácida C/C_0 para sacarosa (\circ), glucosa (\bullet), inulina (Δ) y fructosa (\blacksquare) derivados de la hidrólisis ácida de fructanos extraídos de topinambur para distintas condiciones de hidrólisis: **A)** 70 °C, 0,001 M de HCl, **B)** 90 °C, 0,001 M de HCl, **C)** 70 °C, 0,01 M de HCl, **D)** 90 °C, 0,01 M de HCl.

En tanto, la hidrólisis a 90 °C y 0,001 M de HCl presentó una leve disminución de la relación del contenido de inulina final- inicial durante todo el tiempo de hidrólisis, a excepción de la hora 6 que fue en aumento. La relación de sacarosa- inulina inicial se tuvo un aumento en la primera hora, y en tiempos de hidrólisis mayores se mantuvo constante, al igual que la de glucosa- inulina inicial y la de fructosa- inulina inicial (**Figura 2.4-B**), lo cual indicaría un bajo efecto del tratamiento de hidrólisis sobre las cadenas de fructanos (**Tabla 2.4**). En la condición de hidrólisis de 70 °C y 0,01 M de HCl la relación de inulina final- inicial disminuyó gradualmente con el tiempo de hidrólisis. Por su parte la relación de sacarosa-inulina inicial se mantuvo constante entre las 2 y 4 horas de hidrólisis, y aumentó con tiempos de hidrólisis prolongados (mayores a 6 horas). En tanto la relación de glucosa-inulina inicial y de fructosa- inulina inicial fueron en aumento en el período de tiempo de hidrólisis de 2 a 4 horas (0,18 y 0,65 respectivamente) (**Figura 2.4-C**). Este comportamiento en el contenido de sacarosa se debió a que en las primeras horas de hidrólisis de las cadenas de fructanos se liberaron moléculas de sacarosa que posteriormente (6 horas) se disociaron generando los monosacáridos fructosa y glucosa. En los CRIP sometidos a tiempos de hidrólisis prolongados (8 horas) tanto el contenido de inulina final, como de monosacáridos descendió respecto al contenido inicial de inulina, mientras que el contenido del disacárido respecto a la inulina inicial fue en aumento. En concordancia con nuestros resultados, Heyraud *et al.*, (1984) observaron este mismo comportamiento. Bajo la condición de hidrólisis mencionada se produjo un grado de hidrólisis de los fructanos de $43,28 \pm 2,30\%$, por lo que continuó siendo apreciable el porcentaje de fructanos sin hidrolizar (**Tabla 2.4**). Los CRIP sometidos a la condición más drástica de hidrólisis (90 °C y 0,01 M de HCl) presentaron una importante disminución en la relación inulina final- inicial en las primeras horas, al mismo tiempo que se incrementó la relación fructosa- inulina inicial, el incremento del contenido de fructosa fue producto de la hidrólisis de la inulina, que continuó en aumento durante todo el tiempo de hidrólisis. En tanto la relación de sacarosa- inulina inicial se mantuvo prácticamente constante y la relación glucosa- inulina inicial aumentó levemente (**Figura 2.4-D**).

En la **Tabla 2.4** se presentan los porcentajes de hidrólisis para cada condición estudiada y se observó que la hidrólisis a 90 °C y 0,01 M de HCl mostró los mayores porcentajes de hidrólisis en comparación con las demás condiciones de hidrólisis estudiadas, aún en períodos cortos. A su vez, bajo esta condición los porcentajes de hidrólisis no cambiaron significativamente con tiempos menores a las 6 horas, pero sí fue

significativamente mayor el porcentaje obtenido a las 6 horas respecto al período inicial de hidrólisis (**Tabla 2.4**). Por esta razón se estableció como condición óptima de hidrólisis ácida a la aplicación de 0,01 M de HCl durante 6 horas a 90 °C. En apoyo a estos resultados otros autores determinaron valores de rendimiento de hidrólisis ácida similares (93%) en inulina de achicoria a (León *et al.*, 2003).

En tanto, Fleming y Groot (1979) utilizaron condiciones similares a las aplicadas en este estudio para la hidrólisis de extractos de topinambur e informaron porcentajes de hidrólisis similares (de entre 85 y 92%).

Tabla 2.4. Porcentajes promedio de hidrólisis de inulina de tubérculos de topinambur bajo diferentes condiciones de hidrólisis.

Tiempo (horas)	% de hidrólisis de inulina											
	HCl (0,001 M)				HCl (0,01 M)							
	70 °C		90°C		70 °C		90 °C					
0,5	0,70	± 0,01	a	7,72	± 0,29	a	4,30	± 0,29	a	89,32	± 0,25	ab
1	1,23	± 0,01	b	7,39	± 0,06	a	15,33	± 0,05	b	90,12	± 0,04	abc
2	3,50	± 0,00	c	10,84	± 0,04	b	24,29	± 0,99	c	89,87	± 0,21	abc
4	11,70	± 0,08	d	17,27	± 0,02	c	25,65	± 0,59	c	88,93	± 1,84	a
6	13,62	± 0,42	e	18,85	± 0,02	d	31,76	± 1,83	d	91,52	± 0,01	c
8	16,33	± 0,15	f	20,36	± 0,02	e	43,28	± 2,30	e	91,32	± 0,02	bc

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p > 0,05).

3.5. Determinación del porcentaje de hidrólisis para diferentes CRIP

Los CRIP de los diferentes estadios de almacenamiento sometidos a hidrólisis bajo la condición óptima (90 °C, 0,01 M de HCl durante 6 horas) se presentan en la **Tabla 2.5**.

En todos los estadios de almacenamiento de los tubérculos de topinambur el porcentaje de hidrólisis de los CRIP fue de alrededor del 90%. Dicho porcentaje fue similar al obtenido por León *et al.*, (2003).

Tabla 2.5. Porcentaje de hidrólisis ácida de los CRIp extraídos de tubérculos de topinambur.

Estadio de almacenamiento de tubérculos (meses)	% de hidrólisis		
0	94,55	±	0,72 a
2	91,35	±	0,70 b
4	91,14	±	0,06 b
8	89,26	±	0,22 c

3.6. Rendimiento de carbohidratos y contenido de inulina de las muestras de CRIp

En la **Tabla 2.6** se presentan los valores de rendimiento de carbohidratos (Y) y el contenido de inulina (ψ) de las muestras de CRIp obtenidas a partir de tubérculos almacenados en frío durante diferentes períodos (de 0 a 8 meses). Se observó que ambos parámetros decrecieron durante el almacenamiento. La disminución en los valores de Y puede atribuirse al consumo de hidratos de carbono en los procesos bioquímicos post-cosecha que tienen lugar durante el almacenamiento del tubérculo. El valor de Y alcanzado por los tubérculos no almacenados resultó similar al obtenido por Huaxi *et al.* (2010) y superior al reportado por Lingyun *et al.* (2007). Estas comparaciones ponen de manifiesto la influencia del método de extracción utilizado sobre el rendimiento de los carbohidratos obtenido a partir de los tubérculos. En este sentido, Lingyun *et al.* (2007) observaron que el aumento de la temperatura y la relación de disolvente: sólido (v/p) mejora el rendimiento de extracción de la inulina. Estos autores establecieron que la condición de máximo rendimiento de extracción de inulina fue de 83,6% a 76 °C y 10 de relación disolvente: sólido (v/p). En el presente estudio se determinaron los sólidos solubles y el pH de los extractos obtenidos, como parámetros de control del proceso de extracción (**Tabla 2.1**). En tanto, Lorenzo *et al.*, (1999) obtuvieron rendimientos de extracción de inulina del 98,1% con el método de difusión de agua caliente. Un factor importante que puede estar causando la diferencia entre el porcentaje de fructanos extraídos en la presente investigación, en comparación con los reportados en la bibliografía (Mancilla-Margalli y López, 2006) es la edad de la planta (Arrizon *et al.*,

2010). Otro factor es la condición de cultivo que regula el contenido de fructanos del tipo inulina dentro de los sistemas de almacenamiento de la planta en función del nivel de estrés que sufre dicha planta (De Roover *et al.*, 2000). También afecta considerablemente los resultados de extracción y análisis de fructanos el momento de cosecha, el tiempo y condiciones de almacenamiento de una planta, como se mencionó previamente (Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005).

Tabla 2.6. Efecto del tiempo de almacenamiento a 4 °C de los tubérculos de topinambur sobre el rendimiento de extracción (Y) y el contenido de inulina (Ψ) en los hidratos de carbono solubles.

Tiempo de almacenamiento (meses)	Y (% p/p _{m.s.})	Ψ (% p/p _{m.s.})
0	35,0 ± 1,8 a	94,2 ± 3,5 a
2	30,8 ± 1,8 b	90,5 ± 3,8 ab
4	29,5 ± 1,3 bc	90,8 ± 5,0 ab
8	28,4 ± 1,3 c	85,0 ± 5,2 b

Medias con una letra común dentro de una columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Otros autores estudiaron el efecto de diferentes pre- tratamientos (almacenamiento en cámara, congelamiento a -18 °C y deshidratación) aplicados a los tubérculos de topinambur sobre el rendimiento de extracción de la inulina y determinaron que los rendimientos de inulina obtenidos a partir de tubérculos de topinambur en polvo seco fueron significativamente mayores (Huaxi *et al.*, 2010). Dicho método fue el aplicado en este estudio, que si bien tiene la desventaja de su alto costo a nivel industrial es efectivo para preservar la materia prima que se considera una especie altamente susceptible.

La disminución registrada en los valores de ψ no fue significativa entre los tubérculos sin almacenar y los almacenados durante 4 meses. Mientras que a los 8 meses de almacenamiento la disminución del contenido de inulina fue significativa respecto a los tubérculos no almacenados. La disminución de ψ puede ser una consecuencia de la hidrólisis enzimática de la inulina dando como resultado su depolimerización. Para la inulina comercial GR, el valor de ψ fue de 94,5 ± 0,3% (p/p), de acuerdo con la pureza declarada por el fabricante ($\geq 90\%$). Este nivel de pureza fue alcanzado solamente por la muestra de CRIP procedente de tubérculos no almacenados (CRIP- 0). Sin embargo, las

otras muestras de CRIp presentaron valores de pureza $\geq 85\%$, dentro del rango declarado por las inulinas comerciales disponibles en el mercado. Además, estos resultados están de acuerdo con otros estudios sobre inulina extraída de tubérculos de topinambur (Panchev *et al.*, 2011; Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005).

3.6.1. Contenido de inulina de los tubérculos y grado de polimerización de la inulina

Los niveles de carbohidratos en los diferentes períodos de almacenamiento de los tubérculos derivaron de los datos de HPLC (inulina, sacarosa, glucosa y fructosa, expresados como g de carbohidrato por g de tubérculo liofilizado, g/g_{m.s.}) se muestran en la **Figura 2.5**.

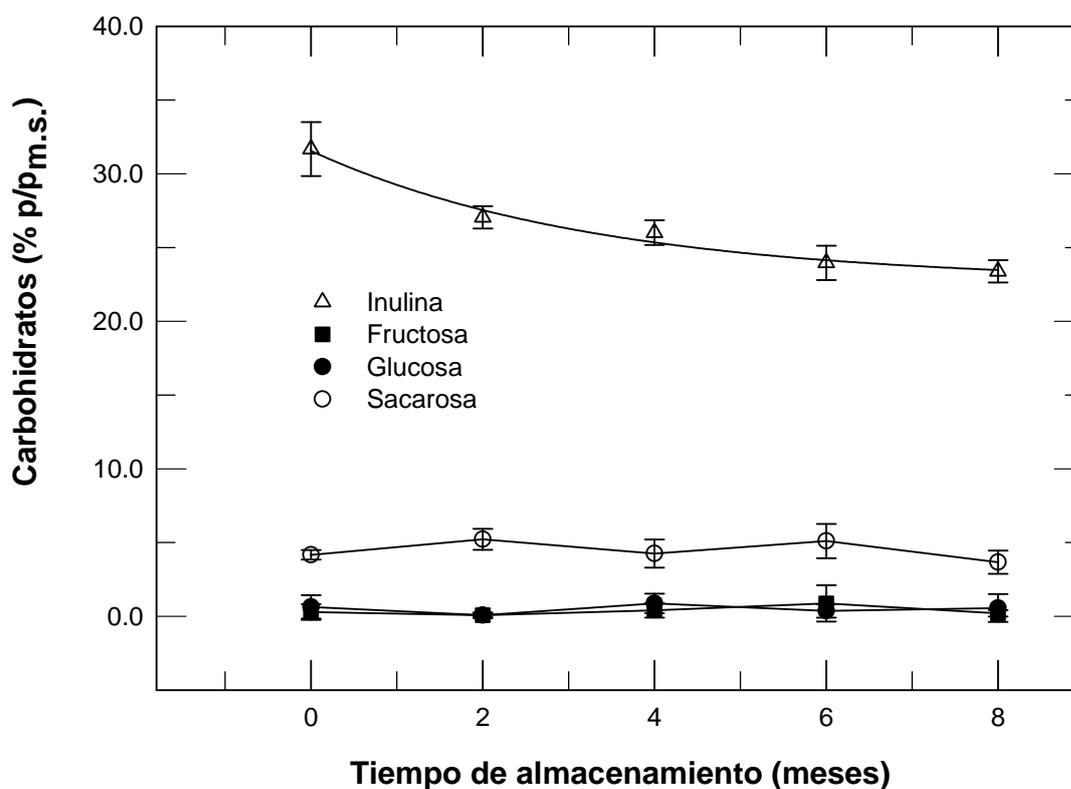


Figura 2.5. Composición de carbohidratos en tubérculos de topinambur (base seca) durante el almacenamiento a 4 °C. Los valores fueron expresados como los promedios \pm SD (n=8).

El contenido de inulina decreció exponencialmente con el tiempo de almacenamiento debido a la hidrólisis enzimática parcial que degrada la inulina a fructanos de GPn inferiores, sacarosa, glucosa y fructosa.

Este mismo comportamiento también fue observado por Saengthongpinit y Sajjaanantakul (2005) y Kang *et al.* (1993) en tubérculos de topinambur almacenados a baja temperatura (4 °C). Dichos investigadores encontraron que la degradación de la inulina a fructooligosacáridos y sacarosa aumentó con el almacenamiento en frío a partir de las 3- 7 semanas. En las etapas iniciales, los tubérculos tienen un contenido mayor de fracciones polimerizadas y a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento la actividad enzimática ocasiona la hidrólisis de las moléculas de inulina a FOS, sacarosa y fructosa (Van Den Ende *et al.*, 1996a).

Por otro lado, Schorr-Galindo y Guiraud (1997) observaron que en los tubérculos de topinambur conservados bajo tierra disminuye progresivamente el contenido de polímeros de mayor tamaño y aumentan levemente las fracciones menos polimerizadas, con el tiempo de almacenamiento.

Los datos experimentales del contenido de inulina se ajustaron a una ecuación de pseudo primer orden ($R^2 = 0,983$):

$$I = (I_0 - I_\infty) * \exp(-k * t) + I_\infty \quad (2.10)$$

Los parámetros de ajuste de la **ecuación 2.10** fueron el contenido inicial de inulina ($I_0 = 32,8\%$ p/p, base seca), el contenido de inulina extrapolada a tiempo infinito ($I_\infty = 23,5\%$ p/p, base seca) y la constante cinética ($k = 0,324 \text{ s}^{-1}$). El contenido de inulina se redujo en aproximadamente un 27% durante el período de almacenamiento de 8 meses. El efecto del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de inulina fue significativo ($p < 0,01$). El contenido de sacarosa, fructosa, y glucosa se mantuvo prácticamente constante durante el almacenamiento, con valores promedio de 4,70, 0,20 y 0,09% (p/p, b. s.), respectivamente. Dichos resultados están de acuerdo con los reportados por diferentes autores para tubérculos de topinambur (Bach *et al.*, 2012; Kocsis *et al.*, 2007). También Avigad y Dey (1997) y Kosaric *et al.* (1984) observaron una reducción en los niveles de fructanos en los tubérculos almacenados, quienes atribuyeron esta reducción a un proceso de depolimerización por acción enzimática con liberación secuencial de moléculas de fructosa y desdoblamiento de sacarosa.

Cabezas *et al.* (2002) también estudiaron la evolución del contenido de fructanos y azúcares durante el almacenamiento en frío de los tubérculos de topinambur a 4 °C e informaron que el contenido de inulina disminuyó a cero después de 20 días de

almacenamiento, y que el contenido de glucosa mostró un aumento continuo, mientras que los contenidos de sacarosa y fructosa mostraron niveles máximos después de los 15 días de almacenamiento. Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio pueden deberse a la utilización de tubérculos con diferentes tiempos de post-cosecha antes de iniciar el período de almacenamiento en frío. En este sentido Chitarra y Chitarra (1990) mencionaron que al momento de cosecha de los tubérculos (separación de la planta madre) algunos de los procesos metabólicos son alterados, incluyendo la aceleración en la tasa de respiración y la activación de algunas enzimas responsables de la hidrólisis de las cadenas de carbohidratos de reserva. En tanto, Van Laere y Van den ende (2002) afirmaron que la actividad de las enzimas responsables de la depolimerización aumenta en el inicio del almacenamiento dado que la respiración y la transpiración demandan gran cantidad de energía. En tanto, Modler *et al.* (1993) encontraron que las altas temperaturas de almacenamiento permiten la ruptura de la inulina y la utilización de los monosacáridos generados, presumiblemente debido a la alta tasa de respiración y a otras actividades metabólicas que se producen en el tubérculo.

Por otro lado, Danilčenko *et al.* (2008) observaron que los procesos fisiológicos continuaron durante el almacenamiento en frío y la frecuencia respiratoria disminuyó por lo que la degradación de los azúcares totales y la sacarosa fue irregular. En concordancia con nuestros resultados, Van den ende *et al.*, (1996a) concluyeron que durante la hidrólisis de los fructanos en los tubérculos, en el período de latencia, prácticamente no se encuentra fructosa libre y que el contenido total de hexosas se mantiene prácticamente constante. Este hecho se explica por la síntesis de la sacarosa a partir de los productos de hidrólisis de fructanos y la posterior síntesis de fructanos de GP bajos desde la sacarosa. En este sentido, Saengthongpinit y Sajjaanantakul (2005) observaron una disminución gradual de las fracciones de inulina de GP > 10 y un aumento progresivo de las fracciones de inulina de GP 3-10, producto de la actividad de la inulinasa en los tubérculos más viejos.

Se observó que los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa se mantuvieron aproximadamente constantes durante el tiempo de almacenamiento de los tubérculos, comprobándose que el mismo no tuvo efecto significativo sobre los niveles de mono y disacáridos (**Figura 2.5**). Este hecho podría atribuirse a que las tasas promedio de acumulación de azúcares provenientes de la ruptura de la inulina son similares a las tasas de consumo de azúcares utilizados como sustrato en la respiración y otras

actividades metabólicas de los tubérculos, durante el almacenamiento (Martinez Noël, G. y Pontis, H. G., 2000; De Roover *et al.*, 2000). Además, el contenido de fructosa libre presente en las vacuolas, como producto de la depolimerización de fructanos, induce a la biosíntesis de FOS de cadena corta (Fujishima *et al.*, 2009). Dicha biosíntesis evita la acumulación de la fructosa, que podría ser perjudicial para las actividades metabólicas en las vacuolas por el aumento de la presión osmótica (Cabezas *et al.*, 2002). La síntesis de nuevos sacáridos podría desempeñar la función de reacción tampón debido a la baja tasa de utilización de la fructosa en el metabolismo (Van den Ende *et al.*, 1996b). Sin embargo, esta reacción aún no está clara y se plantean varios interrogantes sobre la comprensión del complejo metabolismo de fructanos en las plantas (Rutherford y Weston, 1968). A pesar de los grandes avances que se han realizado en el esclarecimiento del metabolismo de los fructanos, su función fisiológica exacta es aún tema de debate (Franck y De Leenheer, 2005).

Un comportamiento similar al registrado en este estudio para el contenido de carbohidratos y para el GP de la inulina durante el almacenamiento fue presentado por otros autores para distintos órganos de reserva de fructanos, como es la achicoria, que presentó una disminución del contenido total de fructanos y del GP de inulina en las primeras semanas de almacenamiento después de la cosecha (Chekroun *et al.*, 1994, Ernst, Chatterton y Harrison, 1995). Los resultados experimentales obtenidos concuerdan también con los informados por Fujishima *et al.* (2009) durante el almacenamiento poscosecha de bulbos de cebollas (*Allium cepa* L.) donde los contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa se mantienen prácticamente constantes a pesar de que el contenido de fructanos disminuye, lo cual también fue explicado por la síntesis de compuestos nuevos.

En el presente estudio se observó que los valores de GPn disminuyeron durante el período de almacenamiento (**Tabla 2.7**), lo que indicaría la degradación de inulina en cadenas más cortas, como ya se ha señalado y en acuerdo con los datos presentados por Cabezas *et al.* (2002), quienes encontraron un decrecimiento en las fracciones de fructano de $PM > 1200$, y un aumento en las fracciones de fructano de $PM < 1200$.

Los valores calculados de GPn están en concordancia con los valores reportados en trabajos previos (Kocsis *et al.*, 2007; Praznik *et al.*, 2002).

Tabla 2.7. Efecto del tiempo de almacenamiento a 4 °C de los tubérculos de topinambur sobre el grado promedio de polimerización (GPn) de la inulina.

Tiempo de almacenamiento (meses)	GPn
0	12,1 ± 0,9 a
2	9,8 ± 1,0 b
4	9,2 ± 0,3 b
8	8,3 ± 0,2 b

Medias con una letra común dentro de una columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El GPn de los CRI obtenidos a partir de los tubérculos recién cosechados (CRI-0), resultó cercano a 12 (**Tabla 2.7**) y significativamente ($p < 0,05$) mayor que el de los subsiguientes estadios analizados (CRI-2, CRI-4, CRI-8). El GPn de los CRI-2, CRI-4 y CRI-8 no presentaron diferencias significativas entre sí. Este comportamiento es coherente con lo expresado por Kays y Nottingham (2007), quienes mencionaron que durante el almacenamiento a temperaturas de entre 0 y 5 °C se depolimerizan los fructanos debido a etapas fisiológicas del tubérculo así, cuando las condiciones de temperatura son favorables, brotan a expensas de los azúcares solubles formados y la planta comienza un nuevo ciclo.

Por otra parte, el valor GPn de inulina GR reportado por el fabricante es de ≥ 10 , valor que podría considerarse similar a los calculados para las muestras CRIp -2 y CRIp -4.

4. Conclusiones

Este capítulo aportó información sobre las características de los tubérculos de topinambur cultivar *Bianka* almacenados durante diferentes tiempos a 4-5 °C y 98% HR. Así mismo, brindó datos de los carbohidratos ricos en inulina obtenidos mediante la extracción en medio acuoso a partir de tubérculos de topinambur de diferentes estadios de almacenamiento. Además, se obtuvo información del efecto de diferentes condiciones de hidrólisis ácida aplicada sobre carbohidratos ricos en inulina. La información de este capítulo podría tenerse en cuenta desde el punto de vista económico, para optimizar las condiciones de almacenamiento de los tubérculos de topinambur, así como también para seleccionar la condición de hidrólisis en la producción de fructosa a partir de extractos vegetales, o bien para la preparación de

productos químicos tales como alcoholes, obtenidos de la fermentación de los extractos parcialmente hidrolizados.

Finalmente, dado que el perfil de carbohidratos presentes en los tubérculos de topinambur depende del estadio de almacenamiento considerado, como se mencionó en estudios previos, resulta necesario establecer el tiempo óptimo de almacenamiento en función de la serie de fructanos que se requiera obtener en mayor proporción. Así, tubérculos de topinambur cultivar *Bianka* almacenados a 4 °C por períodos inferiores a 8 meses podrían ser utilizados para la obtención de polifruktanos (inulina con GPn > 8), mientras que tubérculos con tiempos de almacenamiento superiores a dicho período, serían aptos como fuente de fructooligosacáridos (FOS). Los datos obtenidos en las muestras de CRIP indicaron que la hidrólisis enzimática que se desarrolló en los tubérculos durante su almacenamiento influyó significativamente sobre el contenido de inulina y su GPn respecto a los de tubérculos no almacenados. Así, queda de manifiesto que el almacenamiento de los tubérculos de topinambur determina las características fisicoquímicas de los tubérculos y de sus carbohidratos ricos en inulina. Por lo tanto, debería ser considerado estratégicamente el período de almacenamiento en función del uso al que van a ser sometidos dichos tubérculos, sabiendo que el GPn de la inulina condiciona su funcionalidad tecnológica en alimentos, así como también sus efectos sobre la salud.

5. Abreviaturas

CRI: carbohidratos ricos en inulina
CRI_p: carbohidratos ricos en inulina purificados
Fct₀: fructanos en la muestra nativa
Fct_t: fructanos hidrolizados en la muestra a tiempo t de hidrólisis
FFT: fructosil transferasas
FH: fructano exo- hidrolasas
Fr_f: fructosa final
g: gramos
Gl_f: glucosa final
GP: grado de polimerización
GPn: número de GP promedio
HPLC: cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia
HR: humedad relativa
Kv: kilovolt
m.h.: materia húmeda
m.s.: masa seca
M: molar
mL: mililitros
Mm: milímetros
OF: oligofructosacáridos
p/p: peso en peso
p/v: peso en volumen
Pa: pascal
rpm: revoluciones por minuto
Sac_f: sacarosa final
t: tiempo
Y: rendimiento de extracción de carbohidratos
Ψ: contenido de inulina de los CRI_p

6. Referencias

- Arango Bedoya, O., Cuarán, G. P. C. y Fajardo, J. C. (2008). Extraction, crystalization y characterization of inulin from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) for to be used in food and farmaceutic industry. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 6(2): 14-20.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A., y Monsan, P. (2010). Comparación de la composición de hidratos de carbono y estructuras de fructano solubles en agua de las plantas de Agave tequilana de diferentes edades. *Food Chemistry*, 122(1): 123-130.
- Avigad, G. y Dey, P. M. (1997). Storage carbohydrates. *Plant biochemistry*, 143-204.
- Bach, V., Kidmose, U., Kjeldsen Bjørn, G. y Edelenbos, M. (2012). Effects of harvest time and variety on sensory quality and chemical composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers. *Food Chemistry*, 133(1): 82–89.
- Baldini, M., Danuso, F., Turi, M. y Vannozzi, G. P. (2004). Evaluation of new clones of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) for inulin and sugar yield from stalks and tubers. *Industrial Crops and Products*, 19(2): 25-40.
- Cabezas, M. J., Rabert, C., Bravo, S., y Shene, C. (2002). Inulin and sugar contents in *Helianthus tuberosus* and *Cichorium intybus* tubers: effect of postharvest storage temperature. *Journal of Food Science*, 67(8): 2860-2865.
- Carabin, I. y Gary Flamm, W. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30(3): 268-282.
- Chekroun, M. B., Amzile, J. y Mokhtari, A. (1996). Comparison of fructose production by 37 cultivars of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*), *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24(1): 115 -120.
- Chekroun, M. B., Amzile, J., Yachioui, M. E., Haloui, N. E., y Prevost, J. (1994). Qualitative and quantitative development of carbohydrate reserves during the biological cycle of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) tubers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22(1): 31-37.
- Chitarra, M. I. F. y Chitarra, A. B. (1990). Pós-colheita de frutos e hortalias: fisiologia e manuseio. *Lavras, Esal/Faepe*: 293.
- Coussement P. (1999). Inulin and oligofructose as dietary fiber: analytical, nutritional and legal aspects. *Complex Carbohydrates in Foods* 93(1): 203-212.

- Danilčenko, H., Jarienè E., Aleknavičenè P. y Gajewski, M. (2008). Quality of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers in relation to storage conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36(2): 23-27.
- De Roover, J., Vandenbranden, K., Van Laere, A. y Van den Ende, W. (2000). Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta*, 210(5): 808-814.
- Edelman, J. y Jefford, T. G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New phytologist*, 68(3): 517-531.
- Ernst, M., Chatterton, N. J. y Harrison, P. A. (1995). Carbohydrate changes in chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum*) during growth and storage. *Scientia Horticulturae*, 63(3): 251-261.
- Feller, C. y Fink, M. (2007). Refraction as a measure of soluble carbohydrates in storage roots of asparagus. *HortScience*, 42(1): 57-60.
- Fleming, S. E. y Groot Wassink J. W. (1979). Preparation of high fructose syrup from the tubers of Jerusalem artichoke. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12(1): 1-28.
- Franck, A. y De Leenheer, L. (2005). Inulin, *Biopolymers online*, Ed. Steinbuchel, vol. 6, 439-479.
- Frese, L. (1993). Production and utilization of inulin. Part I. Cultivation and breeding of fructan- producing crops. En: Suzuki, M. y Chatterton, N.J., editors. *Science and Technology of Fructans*. *Sci. Technol. Fructans*, 303-317.
- Frese, L. y Dambroth, M. (1987). Research on the genetic resources of inulin containing chicory (*Cichorium intybus*). *Plant Breeding*, 99(4): 308-317.
- Fujishima, M., Furuyama, K., Ishihiro, Y., Onodera, S., Fukushi, E., Benkeblia, N. y Shiomi, N. (2009). Isolation and structural analysis *in vivo* of newly synthesized fructooligosaccharides in onion bulbs tissues (*Allium cepa* L.) during storage. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, vol. 2009.
- Fukay, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. y Hara, Y. (1997). Seasonal fluctuation in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*) *Soil Sci Plant Nutr*, 43(1): 171-177.
- Heyraud, A., Rinaudo, M., y Taravel, F. R. (1984). Isolation and characterization of oligosaccharides containing d-fructose from juices of the Jerusalem artichoke. Kinetic constants for acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 128(2): 311-320.

- Housley T.L., Pollock C.J. (1993). The metabolism of fructan in higher plants. En: Suzuki, M., Chatterton N.J., editors. Science and Technology of Fructans. Boca Raton, FL: CRC Press: 191-225.
- Huaxi, Y., Lanwei, Z., Chengwei, H., Sun, K. y Zhang, L. (2010). Extraction and enzymatic hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke and their effects on textural and sensorial characteristics of yogurt. Food and Bioprocess Technology, 3(2):315-319.
- Edelman, J. y Jefford, T.G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New Phytologist, 67(3): 517-531.
- Kang, S. I., Han, J. I., Kim, K. Y., Oh, S. J. y Kim, S. I. (1993). Changes in soluble neutral carbohydrates composition of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers according to harvest date and storage temperature. Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, 36(1): 304-309.
- Kays, S. J. y Nottingham, S. F. (2007). Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke *Helianthus tuberosus* L. CRC Press. New York. 478 pp.
- Kocsis, L., Liebhard, P. y Praznik, W. (2007). Effect of seasonal changes on content and profile of soluble carbohydrates in tubers of different varieties of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(23): 9401-9408.
- Kosaric, N., Cosentino, G. P. y Wieczorek A. (1984). The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. Biomass, 5(1): 1-36.
- Laurenzo, K. S., Navia, J. L., y Neiditch, D. S. (1999). Preparation of inulin products. USA Patent 5968365 Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- León O., Gutiérrez, J. y Antolín G. (2003). Extracción de inulina a partir de cultivos energéticos. II. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Acta de Congreso, 565-568.
- De Leenheer, L. y Hoebregs, H. (1994). Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. Starch-Staerke, 46(5): 193-196.
- Lingyun, W., Wang, J., Zheng, X., Teng, D., Yang, Y., Cai, C. (2007). Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. Journal of Food Engineering, 79(3): 1087-1093
- López-Molina D., Navarro-Martínez M. D., Rojas Melgarejo F., Hiner A. N. P., Chazarra S. y Rodríguez-López, J. N. (2005). Molecular properties and prebiotic

- effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Phytochemistry* 66(12): 1476-1484.
- Mancilla-Margalli, N. A, y López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20): 7832-7839.
- Martínez Noël, G. y Pontis, H. G. (2000) Involvement of sucrose synthase in sucrose synthesis during mobilization of fructans in dormant Jerusalem artichoke tubers. *Plant Science*, 159(2): 191-195.
- Matías, J., González, J., Royano, L. y Barrena R. A. (2011). Analysis of sugars by liquid chromatography-mass spectrometry in Jerusalem artichoke tubers for bioethanol production optimization. *Biomass and Bioenergy*, 35(5): 2006-2012.
- Modler, H. W., Jones, J. D. y Mazza, G. (1993). Observations on long-term storage and processing of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). *Food Chemistry*, 48(3): 279-284.
- Moerman, F. T., Van Leeuwen, M. B. y Delcour, J. A. (2004). Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12): 3780-3783.
- Panchev, I., Delchev, N., Kovacheva, D. y Slavov, A. (2011). Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*). *European Food Research and Technology*, 233(5): 889-896.
- Praznik, W., Ciešlik, E. y Filipiak-Florkiewicz, A. (2002). Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: Composition and application in bread. *Nahrung-Food*, 46(3): 151-157.
- Rébora, C. (2008a). Topinambur (*Helianthus tuberosus L.*): usos, cultivo y potencialidad en la región de Cuyo, *Horticultura Argentina*, 27(63): 30-37.
- Rébora, C. (2008b). Caracterización de germoplasma de topinambur (*Helianthus tuberosus L.*) por aptitud agronómica e industrial, (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría en Horticultura. Disponible en Biblioteca de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.
- Ritsema, T., y Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6(3): 223-230.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., y Delzenne, N. (1993). The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutrition reviews*, 51(5): 137-146.

- Rutherford, P. P. y Weston, E. W. (1968). Carbohydrate changes during cold storage of some inulin containing roots and tubers. *Phytochemistry*, 7(2): 175-180.
- Saengthongpinit, W. y Sajjaanantakul, T. (2005). Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus L.*) tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1): 93-100.
- Schorr-Galindo, S. y Guiraud, J. P. (1997). Sugar potential of different Jerusalem artichoke cultivars according to harvest. *Bioresource Technology*, 60 (1): 15-20.
- Scollo, D., Ugarte, M., Vicente, F., Giraudo, M., Sánchez Tuero, H., y Mora, V. (2011). El potencial del topinambur en la salud y la nutrición. *Diaeta*, 29(137): 7-13.
- Suzuki, M. y Chatterton, N. J. (1993). *Science and technology of fructans*. CRC Press, 346 pp.
- Teodorescu, L. (2003). Purification of the extract from plants containing inulin. *Food Technology*, 55(1): 9401-9408.
- Van den Ende, W., Mintiens, A., Speleers, A., Onuoha, A. y Van Laere, A. (1996a). The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytologist*, 132(4): 555-563.
- Van den Ende, W., De Roover, J. y Van Laere, A. (1996b). *In Vitro* synthesis of fructofuranosyl-only oligosaccharides from inulin and fructose by purified chicory root fructan: fructan fructosyl transferase. *Physiologia Plantarum*, 97(2): 346- 352.
- Van Laere, A. y Van Den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell & Environment*, 25(6): 803-813.
- Zimeri, J. E., y Kokini, J. L. (2002). The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 48(3): 299-304.
- Zubr, J. y Pedersen, H. S. (1993). Characteristics of growth and development of different Jerusalem artichoke cultivars. *Studies in Plant Science*, 12(3):11-19.

Capítulo 3

Prebióticos y Probióticos

El tema central de este capítulo es determinar la actividad prebiótica de la inulina obtenida de topinambur.

1. Introducción

1.1. Características de los prebióticos y sus beneficios

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que actúan de forma beneficiosa sobre la salud del huésped, estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias benéficas (llamadas probióticos) en el colon (Gibson y Roberfroid, 1995). Este concepto se actualizó, y se definió como ingredientes fermentables selectivamente que permiten generar cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora, confiriendo beneficios sobre la salud del huésped (Özer, Akin y Özer, 2005; Gibson *et al.*, 2004; Steer *et al.*, 2000). El efecto de un prebiótico es esencialmente indirecto porque genera una modificación selectiva de la microflora intestinal del huésped (especialmente los probióticos de la flora colónica) (Teitelbaum y Walker, 2002). Los probióticos son microorganismos benéficos que generan productos de fermentación que incrementan la resistencia a la colonización de patógenos. (Shadid *et al.*, 2007, Rossi *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2005; Biedrzycka y Bielecka, 2004; Kaur y Gupta, 2002; Videla *et al.*, 2001; Roberfroid, 2000).

Una definición más reciente es la de prebiótico dietético que considera los cambios en el ecosistema de la microflora de todo el tracto gastrointestinal (Gibson *et al.*, 2010).

Existen evidencias que la ingesta de prebióticos promueven la función inmune (Adebola, Corcoran y Morgan, 2013; Choque Delgado, Tamashiro y Pastore, 2010; Fujitani *et al.*, 2007; Vos *et al.*, 2007; Ishikawa *et al.*, 2003; Saavedra y Tschernia, 2002; Barcenilla *et al.*, 2000; Hirayama y Rafter, 2000; Cherbut *et al.*, 1997; Scheppach *et al.*, 1995; Gibson y Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1993), evitan la producción de compuestos cancerígenos (Demigne *et al.*, 2008; Abrams *et al.*, 2007; Lindsay *et al.*, 2006; Kaur y Gupta, 2002; Salminen *et al.*, 1998) y aumentan la absorción de nutrientes, además de promover la reducción del colesterol (Macfarlane, Macfarlane y Cummings, 2006; Delzenne y Kok, 2001; Camire, 2001; Barcenilla *et al.*, 2000; Niness,

1999; Jackson *et al.*, 1999; Gibson y Roberfroid, 1995) y ejercer el control de la glucemia (Ritsema y Smeekens, 2003).

La incorporación de prebióticos en la dieta también regulariza las funciones intestinales en las personas estreñidas (Franck, 2006; Gibson *et al.*, 1995) y promueve el restablecimiento de la microflora intestinal en los casos de diarrea (Videla *et al.*, 2001).

En particular, la fermentación de los fructanos tiene efectos sobre la fisiología del intestino dado que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y minerales (Nazzaro *et al.*, 2012; Gibson, 2004; Fooks y Gibson, 2002; Barcenilla *et al.*, 2000; Gibson y Collins, 1999; Wang y Gibson, 1993; Cummings y Macfarlane, 1991; Hidaka *et al.*, 1986). Como producto de dicha fermentación se generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), dióxido de carbono, hidrógeno y metano (Ishikawa *et al.*, 2003; Gibson y Macfarlane, 1995; Scardovi, 1986). Estos AGCC son absorbidos rápidamente en el colon y constituyen la principal fuente de energía para los colonocitos. A su vez, la inulina disminuye el pH colónico, favoreciendo el crecimiento de la microflora benéfica y controlando la microflora patógena (Hidaka *et al.*, 1986). Además, hay evidencias promisorias de la actuación de los fructanos en la regulación de los niveles de colesterol (Camire, 2001), en la biodisponibilidad de calcio y magnesio (Greger, 1999) y en la reducción de riesgo de cancer (Kaur y Gupta, 2002).

El potencial efecto prebiótico de los fructanos es dependiente del grado de polimerización (GP), así, el efecto beneficioso de la inulina es más pronunciado que el de sus hidrolizados (FOS) (Vulevic, Rastall y Gibson, 2004). Los fructanos de cadenas largas son menos biodegradables que los de cadena corta (van de Wiele *et al.*, 2007; Roberfroid, Van Loo y Gibson, 1998). Sin embargo, su período de disponibilidad en el lumen del intestino es mayor, dando como resultado mayor cantidad de carbohidratos residuales.

Determinación del efecto prebiótico in vitro

Se plantearon distintos enfoques cuantitativos para determinar la actividad funcional de los prebióticos en condiciones de fermentación *in vitro* (Sanz *et al.*, 2005; Sanz, Gibson y Rastall, 2005; Vulevic *et al.*, 2004; Palframan, Gibson y Rastall, 2003; Biedrzycka y Bielecka, 2004; Olano-Martin, Gibson y Rastall, 2002). Se han establecido índices para clasificar su capacidad para estimular el crecimiento de la microflora mixta (bifidobacterias, lactobacilos, clostridios y bacterioides), asimilar sustratos y producir AGCC (Sanz, Gibson y Rastall, 2005; Sanz *et al.*, 2005; Palframan, Gibson, Rastall,

2003). Un enfoque más complejo es utilizar cultivos mixtos de flora bacteriana intestinal. Sin embargo dista de las complejas interacciones que se producen en el intestino humano (Wang y Gibson, 1993).

Algunos autores mencionan que para los estudios *in vitro* de oligosacáridos deberían inocularse microorganismos fecales que aseguren la presencia de una serie representativa de especies de bacterias y de los eventos que ocurren en los compartimentos distales (Gibson *et al.*, 1995). Sin embargo, la composición intestinal cambia a lo largo de la vida en función del estado de madurez de la mucosa intestinal, de la diversificación de la dieta y del estado de salud.

Por otro lado, los estudios *in vitro* utilizando materia fecal no reflejan lo que ocurre en el colon, ya que gran parte de los microorganismos colónicos anaerobios estrictos no permanecen viables el tiempo suficiente al ser eliminados en las heces. Por lo tanto, la utilización de un mezcla entérica es más indicativo del comportamiento de las bacterias indeseables del tracto gastrointestinal (Fanaro *et al.*, 2003). También se han desarrollado modelos intestinales *in vitro* de la región proximal del intestino grueso (Hopkins y Macfarlane, 2003). Sin embargo, la evaluación final del efecto prebiótico debiera hacerse en humanos, incluyendo el prebiótico en la dieta y evaluando los cambios microbiológicos en heces. Un avance interesante en este sentido, se produjo al implementar metodologías de base molecular como proteína C reactiva (PCR) en tiempo real o la hibridación fluorescente *in situ* (O' Sullivan, 1999).

A diferencia de los estudios anteriores, el método para determinar la actividad prebiótica utilizada por Huebner, Wehling y Hutkins (2007) evalúa la combinación de un prebiótico con cepas específicas de bacterias probióticas, este método es comparativamente sencillo ya que no son necesarias las muestras fecales.

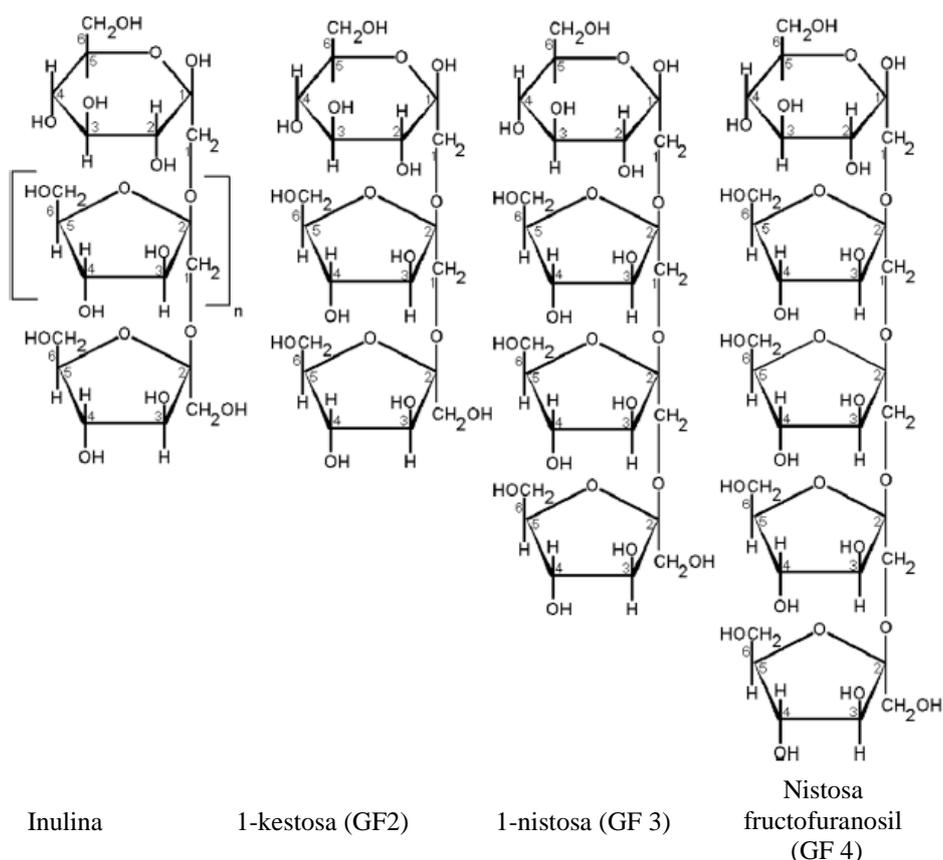
1.2. Fructanos: Estructura y Química

La inulina, la oligofructosa (OF) y los fructooligosacáridos (FOS) son fructanos considerados fibras solubles, están formados por cadenas lineales de fructosa con una unidad de glucosa terminal (Bruggink *et al.*, 2005).

La determinación del grado de polimerización promedio (GP_n) corresponde al número total de unidades de sacáridos (G y F) que conforman la muestra de inulina dividido el número total de moléculas de inulina, sin tener en cuenta los monosacáridos glucosa

(G), fructosa (F) ni los disacáridos de sacarosa que puedan estar presentes en la muestra (Li *et al.*, 2008).

Algunos autores consideran a la oligofruktosa y a los fructooligosacáridos como nombres sinónimos para la mezcla de oligómeros de inulina con un GP_n máximo de 10 (Roberfroid, 2005; Coussement, 1999; Roberfroid y Delzenne, 1998; Quemener, Thibault y Coussement, 1994).



Fuente: Choque Delgado, Tamashiro y Pastore (2010)

Figura 3.1: Estructura química de los fructanos.

Todos los fructanos son resistentes a la hidrólisis enzimática por parte de las enzimas digestivas del ser humano (α - glucosidasa, maltasa, isomaltasa y sacarasa) debido a la configuración β - del carbono anomérico del monómero de fructosa. Sus enlaces β (1→2) resisten la acción de dichas enzimas, por lo cual los fructanos atraviesan la mayor parte del tracto digestivo prácticamente sin cambios. Así, los fructanos llegan al

colon y son fermentados selectivamente por bacterias probióticas (Adebola, Corcoran y Morgan, 2013; Kalyani, Kharb y Thompson, 2010; Madrigal y Sangronis, 2007).

Debido a la complejidad de las fibras respecto a su naturaleza química y GP se requieren de diversos métodos analíticos para su medición (Elleuch *et al.*, 2011). El método enzimático gravimétrico propuesto por la AOAC (Flamm *et al.*, 2001) determina parte de la fibra soluble (polisacáridos de alto GP y pectinas), mientras que los oligosacáridos y la inulina de bajo GP no son cuantificados.

Fructooligosacáridos (FOS)

Los FOS son oligosacáridos de fructosa con uniones β (2 \rightarrow 1) que pueden ser de origen natural o sintético. Los FOS sintéticos tienen cadenas de longitud variable de entre 2 y 8 residuos de monosacáridos que se obtienen por transfructosilación de la sacarosa y pueden o no tener una unidad de glucosa terminal. En función del GP se denomina 1-kestosa (GP 2), 1-nistosa (GP 3), y 1-nistosa fructofuranosil (GP 4) (Sangeetha, Ramesh y Prapulla, 2005; Biedrzycka y Bielecka, 2004) (**Figura 3.1**). Los oligosacáridos que tiene un GP entre 2 y 10 se definen como fructooligosacáridos según la IUB-IUPAC (1982) (Hoebregs, 1997). Los FOS también pueden ser producidos en una escala comercial, a partir de sacarosa, utilizando la enzima fúngica de *Aspergillus Niger*. En tanto, los FOS naturales son producto de la hidrólisis enzimática de la inulina por acción de la enzima fructofuranosidasa, y poseen de 3 a 5 unidades de fructosa con una unidad de glucosa terminal (Niness, 1999).

Oligofructosa (OF)

La OF se produce durante un proceso de degradación química de inulina o hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática por acción de la endoinulinasa da como producto oligofructosas de GP que varía entre 2 a 9 y un GPn de 4- 4,5. Alrededor del 10% de las cadenas tienen un GP de entre 2 y 5 (Gibson *et al.*, 2004; Menne, Guggenbuhl y Roberfroid, 2000; Roberfroid, Van Loo y Gibson, 1998; Gibson y Roberfroid, 1995).

La OF no digerible de alto GP es más resistente a la fermentación sacarolítica, por lo que el metabolismo se lleva a cabo en la parte distal del colon (Hughes y Rowland, 2001). Esta diferencia en la fermentabilidad que los prebióticos tienen en el colon genera cambios en la composición microbiana (le Blay *et al.*, 2003).

La OF es semejante a los FOS obtenidos en el proceso de transfructosilación con un residuo de glucosa terminal en algunas de las cadenas de los fructosilados (Biedrzycka y

Bielecka, 2004). La AOAC definió como oligofruktosa a las cadena de longitud de entre 2 y 10 (Hoebregs, 1997).

Inulina

La inulina tiene un peso molecular de entre 3240 a 9720 Daltons, dependiendo de su GP. Este fructano es un material semi-cristalino, que se encuentra en estado vítreo a 25 °C y con 0,75 de aw (Zimeri y Kokini, 2002). Las muestras de inulina se caracterizan por su GPn, el cual determina su funcionalidad (Lopez-Molina *et al.*, 2005; van Loo y Hermans, 2000; De Gennaro *et al.*, 2000). La inulina del tubérculo de topinambur tiene un GPn de entre 8 y 10 (Vijn y Smeekens, 1999).

1.2.1. Aplicaciones tecnológicas

En los últimos años, los fructanos tuvieron un crecimiento significativo como ingredientes de la industria alimentaria debido a sus propiedades organolépticas y sus beneficios sobre la salud (Mantzouridou, Spanou y Kiosseoglou, 2012; Choque Delgado, Tamashiro y Pastore, 2010; Kaur y Gupta, 2002). Además, su uso como ingrediente ofrece una combinación de propiedades funcionales y tecnológicas, en forma simultánea (Pinheiro de Souza Oliveira *et al.*, 2012; Rastall, 2010; Wang, 2009; Franck y De Leenheer, 2005; De Gennaro *et al.*, 2000). Así, la inulina de cadena larga (con un GPn 25) es moderadamente soluble en agua; tiene la capacidad de otorgar cuerpo, formar geles y estabilizar espumas y emulsiones, puede usarse como sustitutos de grasas dado que posee un sabor neutro suave y un valor calórico bajo. Por su parte, la inulina de cadena corta puede utilizarse en reemplazo de azúcares dado que posee alto poder edulcorante al mismo tiempo que genera saciedad y promueve la pérdida de peso (Parnell y Reimer, 2009; Ritsema y Smeekens, 2003; Roberfroid, 1998; Gibson y Roberfroid, 1995).

1.2.2. Ingestas normales en la dieta

Numerosos alimentos son vehículos de prebióticos o bien podrían ser fortificados con prebióticos. La microflora del colon es el objetivo predominante de la incorporación de prebióticos en la dieta (Shadid *et al.*, 2007; Rastall, 2010; Fanaro *et al.*, 2003). Algunos autores indicaron que su efecto permanece mientras se mantiene el consumo del prebiótico (Watzl, Girrbach y Roller, 2005; Kelly-Quagliana, Nelson y Buddington, 2003; Moshfegh *et al.*, 1999).

Biggs y Hancock (2001) determinaron que la ingestión de 15 g de fructooligosacáridos por día aumenta de 20 a 70% la carga de bífidobacterias del intestino humano. En voluntarios sanos, la ingesta diaria de 10 g de inulina estimuló tanto a las bífidobacterias como a las *Faecalibacterium prausnitzii* (Ramírez-Farías *et al.*, 2009). Dicha especie está en baja proporción en pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias. La ingestión diaria de 12 g de FOS redujo episodios de diarrea inducida por *Clostridium difficile* (Lewis, Burmeister y Brazier, 2005). Por su parte otros autores informaron que 4 g de inulina diarios son suficientes para incrementar el número de bacterias benéficas del colon (Scollo *et al.*, 2011; Rao, 1999).

Se ha mostrado a través de estudios *in vivo* en humanos que la dosis de entre 5 y 20 g/día durante un período de 15 días, ayuda a la absorción de ciertos iones y a la síntesis de vitaminas B y promueve cambios positivos en la composición de la microflora (Gibson *et al.*, 1995; Wang y Gibson, 1993). Se estableció la dosis de 5 g/día de FOS como dosis efectiva en humanos para incrementar en 1 logaritmo la carga de bífidobacteria comparado con la sacarosa (Rao, 2001). Estas diferencias en la dosis sugerida por los distintos investigadores para obtener efectos beneficiosos en el huésped puede deberse a que el aumento en la carga bacteriana no solo depende de la dosis de la dieta, sino también del GP de los fructanos que determina su fermentabilidad (Nguyen *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 2004).

Se debe considerar que el consumo en elevadas cantidades de inulina produce flatulencias y el exceso de gases en el intestino puede causar espasmos intestinales y distensión abdominal. Por otro lado, entre el 30% y 40% de la población mundial sufre del síndrome de mala absorción de la fructosa, por lo que debe limitarse la ingesta a 0,5 g de inulina por comida para estos individuos.

1.2.3. Marco regulatorio

Los prebióticos son utilizados en una amplia gama de aplicaciones alimentarias (Siro *et al.*, 2008). En Argentina se comercializan alimentos con prebióticos bajo distintas marcas comerciales, principalmente en lácteos, panificados, alimentos infantiles y bebidas. Si bien en el Código Alimentario Argentino (CAA) aun no se incorporó la definición de alimento funcional, se acepta el uso de prebióticos como ingredientes alimenticios y lo define como ingrediente alimentario no digerible que posee un efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad

de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud (Artículo 1389 del CAA) (Olagnero *et al.*, 2007).

Por su parte, el comité de expertos de la Administración para Alimentos y Medicamentos (FDA) permite desde 1993 alegaciones de salud de alimentos que contengan prebióticos, siempre que existan evidencias científicas que las respalden y que estén autorizadas por organismos científicos nacionales como son los Institutos Nacionales de Salud o los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades (Ross, 2000). EE.UU. declaró que tanto la inulina y como la oligofruktosa son considerados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) desde 1992 (Kolbye *et al.*, 1992).

En 1991 se estableció en Japón el concepto de alimentos para uso específico en la salud “FOSHU” (Foods for Specified Health Use), dentro de esta categoría están incluidos los prebióticos (Saito, 2007).

La Comisión Europea (CE) regula desde el año 2010 la comercialización y el consumo de los alimentos funcionales, como son los alimentos con prebióticos, mediante el Reglamento de la CE N° 1924/2006, en el cual constan las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos demostradas científicamente y aprobado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Este reglamento regula la introducción de alimentos funcionales en el mercado y la formulación de las alegaciones de salud, como el modo de comunicar al consumidor el beneficio derivado de su consumo.

Por otro lado, el PASSCLAIM (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims and Foods) tiene por objetivo verificar científicamente las alegaciones (Sanz *et al.*, 2008) y autoriza el uso de declaraciones nutricionales o de propiedades saludables si se cumplen las siguientes condiciones respecto al componente funcional: (i) que se haya demostrado científicamente el efecto beneficioso; (ii) que esté en el producto final en cantidad suficiente y en una forma asimilable por el organismo; (iii) que la cantidad que se consuma razonablemente proporcione una cantidad significativa de la sustancia activa y (iv) que el consumidor medio comprenda los efectos beneficiosos que se expresan en la declaración (Sarmiento Rubiano, 2008). No obstante, aún existen dudas con respecto al concepto general de prebióticos y las alegaciones utilizadas.

Los fructanos cumplen con la definición del Codex Alimentarius de fibra dietética y la establecida por la AOAC (Trowell, 1975). Sin embargo, el método analítico estándar de la AOAC no mide inulina u oligofruktosa (Van Loo *et al.*, 1995). Por lo tanto, el

método específico de la AOAC para fructanos debe ser utilizado para determinar fibra dietética soluble.

1.3. Probióticos

Las bacterias probióticas son microorganismos benéficos capaces de utilizar fructanos aumentando su valor energético debido a que poseen las enzimas específicas β -fructosidasa (inulinasas) y β -fructofuranosidasa (Imamura, Hisamitsu y Kobashi, 1994) que hidrolizan los monómeros de fructosa del extremo no reductor de la cadena de inulina, y generan diferentes metabolitos (Ishikawa *et al.*, 2003; Roberfroid *et al.*, 1998; Gibson y Macfarlane, 1995; Macfarlane *et al.*, 1995; Gibson y Roberfroid, 1995). Los probióticos principales son los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Rastall *et al.*, 2005).

Los probióticos son capaces de reprimir el crecimiento de los patógenos (Roberfroid, 2001). Uno de los criterios importantes para que una cepa sea potencialmente probiótica es su capacidad para adherirse a las superficies mucosas del tracto intestinal humano, dado que se relaciona con los efectos positivos que pueda ejercer dicha bacteria (Vulevic, Rastall y Gibson, 2004).

Algunos autores establecieron que los probióticos ejercen beneficios asociados con la protección contra la gastroenteritis, mejora la tolerancia a la lactosa y estimula el sistema inmune al generar un medio inadecuado para las bacterias patógenas dado que disminuyen el pH colónico creando un medio no propicio para dichas bacterias (D'aimmo, Modesto, y Biavati, 2007; Amores *et al.*, 2004; Kaur y Gupta, 2002; Salminen *et al.*, 1998). Además los microorganismos probióticos evitan la producción de compuestos cancerígenos (Vogt, *et al.*, 2015; Ranadheera, Baines y Adams, 2010), reducen la hipercolesterolemia (Ranadheera, Baines y Adams, 2010) y previenen la osteoporosis y disminuye la aparición de alergias alimentarias (Fujitani *et al.*, 2007; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001). Estos beneficios potenciales pueden ser el resultado del crecimiento de los probióticos en el tracto intestinal, aunque algunos de estos efectos aún no se han probado completamente (Ranadheera, Baines y Adams, 2010, Esparza y Fragosó, 2010).

Lactobacillus

Los *Lactobacillus* forman parte de la microflora normal y balanceada del intestino humano, son no invasivos, no carcinógenos, pueden agregarse para formar una red

(Reid, 2008), tienen la capacidad para adherirse a las células y reducir la adherencia patogénica, por la producción de ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas antagonistas al crecimiento de patógenos (Salminen *et al.*, 1998; Verdenelli *et al.*, 2011; Reid, 2008; Huebner, Wehling y Hutkins, 2007).

Bifidobacterium

El cultivo de *Bifidobacterium* presenta tolerancia al pH del estómago, resistencia a las sales biliares, aptitud para sobrevivir al medio gastrointestinal hostil y elevada adherencia a las células intestinales (Gill *et al.*, 2001).

Las bifidobacterias estimulan el sistema inmunológico, pueden producir vitaminas del complejo B y ayudar a restablecer la flora normal del intestino después de los tratamientos con antibióticos (Guarner, 2006; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001; Gibson y Roberfroid, 1995).

El objetivo específico de este capítulo fue determinar la capacidad prebiótica de las inulinas de diferente GPn extraídas de tubérculos de topinambur almacenados durante distintos períodos de tiempo, utilizando el cultivo *Lactobacillus paracasei*. Así mismo, estudiar el metabolismo de los carbohidratos ricos en inulina por parte de los microorganismos implicados, analizando la velocidad de crecimiento, el pH y la cinética de acidificación.

2. Materiales y Métodos

2.1. Reactivos

Inulina de achicoria grado alimenticio Orafti®GR (IGR) de Beneo-Orafti (Bélgica) fue gentilmente donada por la firma Saporiti SA (Argentina). Los reactivos y medios de cultivo utilizados en los ensayos de actividad prebiótica fueron: fosfato dipotásico, acetato de sodio, citrato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de sodio, tween 80, etanol, hidróxido de sodio, agar agar, caldo MRS (Mann-Rogosa-Sharpe), MRS agar, extracto de carne y extracto de levadura, proteasa peptona, L-cisteína, TSA agar (Trypticase-Soja-Agar), caldo LB (Luria-Bertani), caldo M9 (medio mínimo) de Britania (Argentina); glicerol de Biopack (Argentina) y glucosa de Merck (Alemania). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad pro analítica.

Los CRI utilizados fueron obtenidos de cada estadio de almacenamiento de los tubérculos de topinambur (descrito en el **Capítulo 2, Sección 2.8**).

2.2. Ensayo de actividad prebiótica

Se desarrolló un método *in vitro*, utilizando sistemas de fermentación en lote inoculados con cultivos puros de bacterias probióticas *L. paracasei* BGP1 (CLERICI-SACCO, Cadorago, Italia) y con una mezcla entérica de tres *E. coli* productoras de shiga toxinas (STEC) proporcionada por el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología (SAMP-Fac. Cs. Veterinarias- UNCPBA, Tandil, Argentina). Las cepas fueron *E. coli* O157: H7: vt2+, eae+, ehxA+, *E. coli* O91: H21: vt2+, ehxA+, saa+, la *E. coli* O171: H2: vt2+, en una relación 1: 1: 1.

El Anexo I describe la composición de cada uno de los medios de cultivo utilizados en los ensayos de actividad prebiótica.

2.2.1. Preparación de los medios de cultivos

Para probióticos

Los medios de cultivo utilizados fueron: MRS-Basal sin carbohidrato fermentable, MRS-Basal+1% de glucosa; MRS-Basal+1% de inulina GR; MRS-Basal+1% de inulina de topinambur (en cada uno de sus estadios). A todos los medios se agregó 0,05% de L-cisteína para mejorar las condiciones de anaerobiosis y estimular el crecimiento de la cepa probiótica. Para preparar placas se agregó 1,5% de agar. El medio se ajustó a pH $6,5 \pm 0,2$ y finalmente se esterilizó a 121 °C, 1 atmósfera durante 20 minutos.

El MRS basal-Inulina se preparó añadiendo 1% (P/P) de inulina al agar MRS basal (Li *et al.*, 2008; Huebner, Wehling y Hutkins, 2007). El medio MRS basal (medio sin carbohidratos) se autoclavó. Los extractos de inulina liofilizada fueron irradiados dentro del frasco con luz UV de 254 nm durante 30 min, para su esterilización, antes de suplementarlos en el medio y por último se adicionó al agar atemperado.

Para la mezcla entérica

El caldo mínimo M9 como medio basal de crecimiento de bacterias entéricas se esterilizó a 121 °C, 1 atmósfera durante 20 minutos.

El medio de cultivo TSA (agar tripsina de soja) que fue utilizado para la mezcla entérica, se autoclavó y en las placas correspondientes se adicionó un 1% (P/P) del carbohidrato (IGR, glucosa o CRI) previamente irradiado dentro del frasco con luz UV de 254 nm durante 15 minutos, para su esterilización superficial y se incubó durante 24 horas (Atlas, 1993).

2.2.2. Acondicionamiento y almacenamiento de las cepas bacterianas.

Reactivación de cepas probióticas liofilizadas

El crecimiento de la cepa *Lactobacillus paracasei* fue inicialmente en medio MRS. En 10 mL de caldo MRS se colocó una anzada de la cepa *Lactobacillus paracasei* liofilizada y se agitó vigorosamente. Se incubó a 37 °C, en anaerobiosis (5% CO₂) por 12 horas. La presencia de turbidez indicó crecimiento microbiano.

Obtención de colonias probióticas aisladas

Para obtener colonias aisladas se sembró una anzada en agar MRS del cultivo *Lactobacillus paracasei* desarrollado en el caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 a 48 horas en condiciones de anaerobiosis (85% N₂, 10% de CO₂, H₂ y 5%).

Preparación del cultivo probiótico madre

Se tomaron las colonias aisladas desde las placas de cultivo MRS y se descargaron en 10 mL de caldo MRS, el cual se incubó 12 horas a 37 °C, en anaerobiosis.

La presencia de turbidez indicó crecimiento microbiano, interpretándose como positivo (+) cuando las cepas fermentan el sustrato con producción de ácido y negativo (-) cuando las colonias no producen ácido.

El cultivo obtenido se mantuvo como cultivo madre hasta su uso, conservándose a -80 °C en caldo MRS con glicerol al 20%.

Preparación de la mezcla entérica

Dado que la propiedad característica de un sustrato prebiótico es que no sea fermentable por los microorganismos intestinales indeseables, también se determinó en cada prebiótico potencial, el crecimiento de una mezcla de tres bacterias entéricas elegidas para representar la porción entérica de la flora intestinal.

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas por separado en caldo LB durante 12 horas a 37 °C. Luego, una mezcla conteniendo las tres cepas entéricas en una proporción 1:1:1, se incubó en caldo LB durante 18 horas a 37 °C. A partir del cultivo resultante (O.N. entérico) se inocularon al 1% (V/V) en tubos separados que contenían caldo mínimo M9, sin fuente de carbono (medio basal, como control negativo), 1% (P/V) de glucosa, 1% (P/P) de inulina GR y 1% (P/P) de cada muestra de CRI, respectivamente. Se

incubaron a 37 °C durante 24 horas en agitación, en condiciones de anaerobiosis (85%N₂, 10% de CO₂, H₂ y 5%) (Atlas, 1993).

2.2.3. Determinación del crecimiento bacteriano en el caldo de cultivo

A partir del cultivo madre congelado, se subcultivó en vial con 10 mL del correspondiente medio de cultivo MRS fresco, con y sin los carbohidratos a ensayar y se incubó por 12 horas a 37 °C en anaerobiosis (cultivo de toda la noche, O.N.).

Para cada ensayo, a un volumen de 45 mL de caldo MRS fresco que contenía las diferentes fuentes de carbono a ensayar se le inoculó 100 µL del correspondiente subcultivo (O.N.) y se incubaron durante la noche, bajo las mismas condiciones anteriores.

Los ensayos incluyeron un control negativo sin hidratos de carbono (MRS-Basal) (López-Molina *et al.*, 2005; Vulevic, Rastall y Gibson, 2004; Bielecka, Biedrzycka y Majkowska, 2002). También como control positivo se suplementó el medio de cultivo con glucosa, como fuente de carbohidratos para fines comparativos (de referencia). Dado que los carbohidratos en estudio deben ser metabolizados por una cepa probiótica tanto como la glucosa (Nazzaro *et al.*, 2012; Huebner, Wehling y Hutkins, 2007). En otros estudios *in vitro* que estudiaron la capacidad de los fructanos para promover el crecimiento de diferentes especies de *Bifidobacterium*, se utilizó como control positivo a la lactosa (Bielecka, Biedrzycka y Majkowska, 2002).

Para los ensayos se suplementó un 1% (P/P) de carbohidratos, tanto del prebiótico de referencia: la inulina comercial GR (IGR), como de las muestras de inulina de tubérculos de topinambur (CRI). Esta concentración se recomienda en la literatura como la dosis mínima para garantizar el efecto estimulante de un carbohidrato sobre el crecimiento de las bacterias benéficas respecto a un medio MRS basal (Li *et al.*, 2008). Las muestras CRI e IGR fueron esterilizadas por exposición a la luz UV (254 nm, 40 W) durante 15 min antes de añadirse al medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 horas bajo condiciones anaeróbicas.

Se extrajeron muestras en varios momentos para medir: densidad óptica, pH, acidez total (% de ácido láctico), y el recuento de células viables a las 48 horas (UFC/mL), determinados por el método de la placa estándar bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada ensayo.

Determinación de la Densidad óptica (DO)

Las densidades celulares se pueden determinar en base a la densidad óptica (DO) a 600 nm en lugar del procedimiento de recuento en placa, o bien como complemento. La determinación de DO es una técnica simple y rápida para determinar la actividad prebiótica (Huebner *et al.*, 2008). En este sentido, algunos autores han puesto de manifiesto que el método de DO dió resultados consistentes que fueron similares a los obtenidos por el método de recuento en el método de placa (Huebner *et al.*, 2008).

La lectura de la densidad óptica fue monitoreada en un espectrofotómetro Serie SPECTRO-16/18 (Shangai, China) a DO600nm en los distintos tiempos de incubación de los caldos de cultivo MRS basal, MRS más la fuente de carbono estudiada (glucosa, IGR, CRI, respectivamente). Para ello se tomaron muestras de 1 mL y se utilizó solución fisiológica como blanco. Las mediciones se realizaron en el rango de 0,3 a 0,7, para que sean confiables. Para ello, cada cultivo se diluyó con solución fisiológica, cuando fue necesario.

Medición del pH y acidez total (% de ácido láctico)

Como indicativo de la fermentación, se estudió la acidez total como % de ácido láctico. Se registró el pH de cada uno de los caldos de cultivo con pHmetro (pH-metro HI 2211, Hanna, EE.UU.), previamente calibrado. Se interpretó como positivo cuando el pH del medio bajó por debajo de 5 y negativo cuando el pH del medio fue superior a 5. Para determinar el contenido de ácido se tomaron 10 mL del caldo de cultivo MRS basal, con glucosa o con la inulina correspondiente y se diluyó con 10 mL de agua destilada y tratada con NaOH 0,11M hasta alcanzar un pH final de 8,6. Siendo que 2 moles de NaOH son equivalentes a 1 mol de ácido láctico. Se calculó la acidez titulable como un equivalente del porcentaje de ácido láctico (%AL) de acuerdo a la equivalencia (**Ecuación 3.1**).

Finalmente se calculó el porcentaje de ácido láctico (%AL) según la siguiente ecuación:

$$\%AL = \frac{\left\{ \text{volumen NaOH (mL)} \times 0,11M \times 90 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \times 100 \right\}}{2 \times 1000} \quad (3.1)$$

donde: 90 g/mol es el peso molecular del ácido láctico

*Siembra y recuento de células viables**Recuento de células viables de L. paracasei a las 48 horas (UFC/mL)*

La siembra del cultivo de *L. paracasei* en caldo MRS (O.N.) se realizó en las placas MRS basal, en MRS basal + 1% (P/P) de carbohidrato (IGR, CRI o glucosa, según corresponda). Se diluyeron con solución fisiológica al 0,9% (1:10) para obtener entre 25 y 50 colonias.

Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis (85% de N₂, 10% de CO₂ y 5% de H₂). Cada ensayo se realizó por triplicado.

La cepa *L. paracasei* fue inoculada en caldo MRS basal con glucosa (1%) como fuente de carbohidratos para confirmar que el crecimiento en MRS inulina fuese dependiente de la utilización de la inulina.

Recuento de células viables de la mezcla entérica

Los cultivos de la mezcla entérica se sembraron a tiempos de 0 y 24 horas de incubación en caldo M9 y en placas con TSA y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Cada ensayo se realizó por triplicado.

2.2.4. *Tasa de crecimiento relativo (TCR) de L. paracasei*

Como una forma de evaluar la capacidad prebiótica *in vitro* de muestras de CRI, se calculó la tasa de crecimiento relativa a la glucosa del probiótico *L. paracasei* utilizando la expresión:

$$TCR = \left(\frac{P_t - P_0}{G_t - G_0} \right)_p \quad (3.2)$$

donde p subíndice indica bacterias probióticas, P y G representan la tasa de crecimiento de *L. paracasei* (log mL⁻¹) cuando el prebiótico o glucosa se utiliza como fuente de carbono en el medio, respectivamente, en el instante inicial (0) y a cualquier tiempo (t), según lo indicado por el subíndice correspondiente. Un valor de TCR mayor que la unidad indica que el carbohidrato probado (en este caso la inulina) ejerce un efecto estimulante del crecimiento del *L. paracasei*, en comparación con la glucosa como fuente de carbono.

Considerando que las tasas de crecimiento del cultivo prebiótico *L. paracasei* y de la mezcla entérica fueron capaces de utilizar tanto la glucosa, la IGR y las muestras de CRI como fuente de carbono, se calculó el score de actividad prebiótica de acuerdo con la expresión citada por Huebner, Wehling y Hutkins (2007) (**Ecuación 3.3**), como se describe en la sección siguiente.

2.2.5. Score de actividad prebiótica

Para determinar el score de actividad prebiótica se expone el material en estudio, potencialmente prebiótico, frente a cultivos de microorganismos puros seleccionados. Este sustrato se añade a un medio de crecimiento basal y el crecimiento bacteriano se determina durante el transcurso del tiempo de incubación (Gibson y Wang, 1994).

La actividad prebiótica refleja la capacidad de un sustrato dado para promover el crecimiento de una cepa probiótica, tal como *L. paracasei*, en comparación con el de otros organismos (mezcla entérica en este estudio) y en relación con el crecimiento en un sustrato no prebiótico, como la glucosa. Es decir, que los sustratos con alta actividad prebiótica promueven el crecimiento de las bacterias probióticas y presentan densidades celulares (UFC/mL) comparables a las obtenidas en glucosa, mientras que las densidades celulares de las cepas entéricas en el prebiótico debe ser, en teoría, muy bajo comparado con el crecimiento en glucosa (Huebner *et al.*, 2008; Huebner, Wehling y Hutkins, 2007). Esta es una manera relativamente rápida de evaluar la capacidad de un prebiótico para ser utilizado por cepas de bacterias específicas, a su vez existen diferencias en la capacidad metabólica entre las especies bacterianas probióticas y más aún entre las cepas, estas diferencias influyen directamente en el score de la actividad prebiótica (Huebner, Wehling y Hutkins, 2007).

Como medida de la actividad prebiótica, se calculó el score de actividad prebiótica de acuerdo a la siguiente ecuación modificada de Huebner, Wehling y Hutkins (2007):

$$SAP = \left(\frac{P_{24} - P_0}{G_{24} - G_0} \right)_p - \left(\frac{P_{24} - P_0}{G_{24} - G_0} \right)_e \quad (3.3)$$

donde el primer término es la TCR definida en la **Ecuación 3.2** evaluada a un tiempo $t = 24$ h para bacterias probióticas (p), y el segundo término corresponde a bacterias entéricas (e).

2.3. Análisis estadístico

Para cada ensayo, las diferencias estadísticas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de comparaciones entre las medias con test de Tukey, a un nivel de significación del 5%, utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

3. Resultados y discusión

3.1. Densidad óptica (DO₆₀₀)

La aptitud prebiótica de la inulina de topinambur fue determinada de manera indirecta por la medición de la densidad óptica (DO), el pH y la acidez del medio de cultivo en términos del porcentaje de ácido láctico (%AL) y de manera directa por recuento en placa (UFCmL⁻¹).

En la **Tabla 3.1** se presenta el crecimiento del *Lactobacillus paracasei* (indicando positivo (+) o negativo (-), presencia o ausencia de crecimiento bacteriano (UFC/mL), respectivamente) y los valores de Δ DO, donde Δ es el cambio de esta variable entre las 0 y 24 horas de incubación de los medios de cultivo MRS (suplementados y sin suplementar carbohidratos) inoculados con *L. paracasei*.

Tabla 3.1: Valores de Δ DO y el crecimiento para los distintos carbohidratos utilizados por *Lactobacillus paracasei*.

Carbohidratos	Crecimiento ^a	Δ DO ^b
Sin carbohidratos	+	0,511 f
IGR	++	5,523 a
Glucosa	++	5,271 b
CRI-0	++	4,336 de
CRI-2	++	4,466 d
CRI-4	++	5,031 c
CRI-8	++	4,266 e

a. (+) indica desarrollo bacteriano (UFC mL⁻¹) y (-) indica que no hubo desarrollo bacteriano (UFC mL⁻¹).

b. Densidad óptica (DO) a 600 nm en caldo MRS modificados.

Se observó que el medio MRS basal presentó un incremento en la DO de 0,511 lo cual indica que el desarrollo de las colonias de *L. paracasei* en este medio fue escaso, dado que no contenía en su composición carbohidratos como sustratos de crecimiento

bacteriano. Estos valores fueron significativamente menores a los obtenidos en medios MRS suplementados con carbohidratos.

Los medios suplementados con la inulina comercial, IGR (GPn $\geq 10,0$) fueron los que presentaron incrementos en DO (5,52) significativamente mayores ($p < 0,05$), seguidos por los valores de los medios suplementados con el carbohidrato de referencia, glucosa (5,27), lo cual indica crecimiento bacteriano.

En tanto, de los cultivos enriquecidos con los CRI, los medios con CRI-4 presentaron valores de DO significativamente mayores ($p < 0,05$) a los obtenidos para CRI-2 y CRI-0 (**Tabla 3.1**), los cuales no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre sí. Este último tampoco presentó diferencia significativa con los medios suplementados con el CRI-8. No obstante, los valores de DO obtenidos en los medios suplementados con carbohidratos indicaron que las bacterias de *L. paracasei* fueron capaces de utilizar dichos sustratos para su desarrollo. Este hecho fue confirmado mediante el recuento bacteriano, donde se observó que todos los medios de cultivo MRS presentaron desarrollo de la cepa probiótica (**Tabla 3.1**). Si bien el MRS basal presentó recuentos bacterianos, fue en dos órdenes de magnitud menor que los medios enriquecidos con carbohidratos, lo cual es correspondiente con los valores de DO bajos obtenidos (de un orden de magnitud menor que los de MRS suplementados).

También Huebner, Wehling y Hutkins (2007) encontraron que las inulinas obtenidas de otras fuentes vegetales (achicoria y dalia) fueron utilizadas por los probióticos. Dichos autores observaron que al utilizar inulina de achicoria comercial (-S, y P95, HP) la densidad celular de la cepa *L. paracasei* presentó un aumento significativamente mayor en comparación con el medio suplementado con glucosa. En contraste, Rossi *et al.* (2005) observaron que el crecimiento de las bacterias probióticas es limitado cuando el medio de cultivo es suplementado con inulina, dado que sólo un porcentaje de las cepas estudiadas fueron capaces de crecer en inulina, mientras que sí mostraron crecimientos significativamente mayores en medios suplementados con glucosa y FOS, respectivamente. Esta diferencia en el comportamiento se debe a que la utilización del sustrato prebiótico por parte de las bacterias probióticas, requiere de sistemas de hidrólisis y de transporte específicos para cada prebiótico en particular (Barrangou *et al.*, 2003; Kaplan y Hutkins, 2003; Gopal, Sullivan y Smart, 2001; Perrin, *et al.*, 2001; Rabiú *et al.*, 2001).

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron informados por Palacio, Etcheverría y Manrique (2014), quienes concluyeron que la inulina comercial de achicoria (IGR) puede ser utilizada como sustrato por parte de *L. paracasei*. También Huebner, Wehling y Hutkins (2007), observaron que se producía un aumento significativamente mayor de la densidad celular de la cepa *L. paracasei* cuando se utilizaron inulinas de achicoria comerciales (-S, y Raftilose P95, Raftiline HP) comparado con el medio suplementado con glucosa.

3.2. Acidez total (% de ácido láctico) y pH

En la **Figura 3.2** se muestra la acidez titulable, expresada como g/100mL de ácido láctico (AL), de los distintos medios a las 24 h de cultivo de *L. paracasei*.

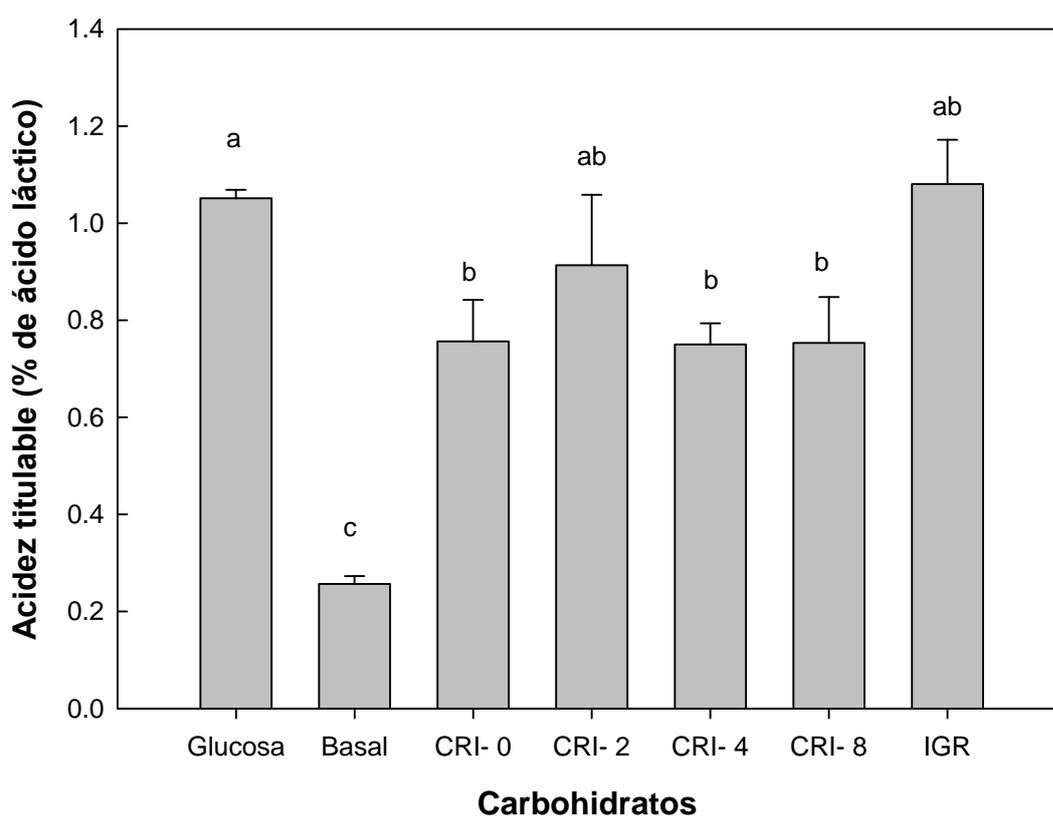


Figura 3.2. Actividad acidificante del *Lactobacillus paracasei* a las 24 horas de incubación en anaerobiosis a 37 °C en medio MRS basal, enriquecido con glucosa, IGR y CRI, respectivamente al 1%. Los valores fueron expresados como los promedios \pm el desvío estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

Se observó que la producción de ácido en el medio sin suplementar fue significativamente menor que en los medios suplementados. En cambio, en los medios de cultivo MRS con CRI inoculados con *L. paracasei* los contenidos de ácido láctico a las 24 horas de incubación fueron entre 0,7 y 0,9% y no se encontraron diferencias significativas entre los medios suplementados con los distintos CRI y con IGR. Tanto en el caldo MRS suplementado con IGR como en el MRS enriquecido con glucosa, el porcentaje de ácido láctico producido fue superior al 1% y no presentó diferencias significativas con el MRS con CRI-2. Mientras que los porcentajes de ácido láctico obtenidos en MRS suplementado con CRI-0, CRI-4 y CRI-8 no presentaron diferencias significativas respecto a los valores obtenidos en el medio IGR, y fueron significativamente menores respecto a los valores obtenidos en el medio con glucosa.

En la **Figura 3.3** se muestra la disminución del pH de los distintos medios de cultivo en función del tiempo de incubación del microorganismo *L. paracasei*.

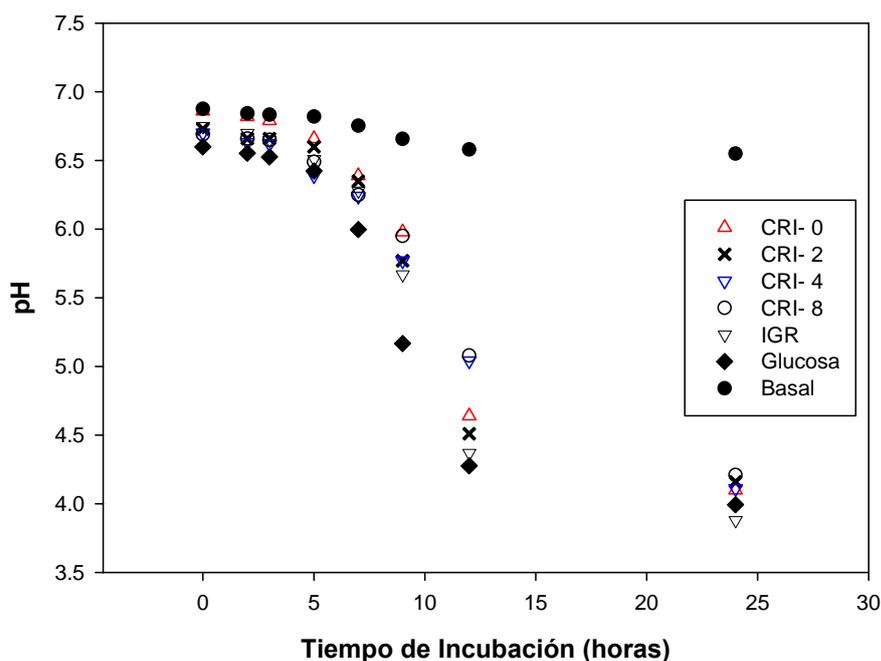


Figura 3.3. Variación promedio de pH del medio MRS basal con: CRI- 0 (Δ), CRI- 2 (x), CRI- 4 (▽), CRI- 8 (○), IGR (▽), MRS glucosa (◆) al 1%; y MRS basal (●) en función del tiempo de incubación en anaerobiosis a 37 °C de *Lactobacillus paracasei*. (n=3) Para mayor claridad, no se muestran las barras de error.

Se observó que el pH del medio MRS basal prácticamente no varió a lo largo de todo el período de incubación estudiado (24 h). En todos los medios enriquecidos el pH se mantuvo prácticamente constante durante las primeras 4 horas de incubación. A partir de allí se observó una disminución gradual del pH hasta las 12 horas, alcanzando valores de pH cercanos a 4 a las 24 h de incubación. En concordancia con nuestros resultados, Pompei *et al.* (2008) mencionaron que los valores de pH de los medios enriquecidos con fructanos fueron significativamente menores que los obtenidos en los cultivos control de 12 horas de incubación. Estos autores observaron el mismo comportamiento de disminución progresiva de pH hasta valores cercanos a 3,7 en cultivos enriquecidos con FOS e inulina de alta solubilidad, inoculados con probióticos. El pH del medio disminuye como consecuencia de la producción de ácido proveniente de la fermentación de los carbohidratos por parte del *Lactobacillus paracasei*. En apoyo a estas evidencias, Sullivan y Nord (2002) concluyeron que un descenso progresivo del pH del medio de cultivo, indica que el carbohidrato pudo ser fermentado por las bacterias probióticas, dando como resultado la producción de ácido.

En los cultivos suplementados con carbohidratos se observó que la tasa de disminución de los valores de pH a las 24 horas fue menor con respecto a los obtenidos con 12 horas de incubación. Este hecho es consecuencia de los procesos bioquímicos que se producen en las etapas de crecimiento avanzado y/o de muerte de los microorganismos. A su vez, la magnitud de disminución del pH de los medios MRS con CRI, fue similar en todos los casos durante todo el período de incubación. La variación de pH en estos medios con inulina de topinambur, fue comparable a la registrada en el cultivo MRS suplementado con IGR.

Los cultivos enriquecidos con glucosa tuvieron un descenso de pH significativamente mayor entre las 5 y 9 horas de incubación, comparado con los suplementados con inulina (tanto comercial de achicoria como de topinambur). Esto estaría indicando que los medios con glucosa fueron más rápidamente fermentables que los enriquecidos con inulina. Esta diferencia en la velocidad de fermentación fue también puesta en evidencia por López Molina *et al.* (2005). En tanto, Roberfroid (1993) estableció que el patrón de descenso del pH del medio con inulina es análogo al que contenía glucosa. En nuestros ensayos, esta similitud del comportamiento se evidenció a partir de las 12 horas de incubación.

En la **Tabla 3.2** se presentan los valores de $\Delta\%AL$ y ΔpH , donde Δ es el cambio de cada variable producido entre el inicio y la finalización del período de incubación del

L. paracasei, en los distintos medios de cultivo MRS (suplementados y sin suplementar carbohidratos) inoculados con *L. paracasei*.

Se observó que la variación en el %AL fue prácticamente nula en el cultivo MRS basal (0,088%) debido a que dicho medio no contenía en su composición carbohidratos fermentables, por lo cual no hubo producción de ácido por parte de las bacterias. Se observó que en los medios de cultivo MRS con carbohidratos inoculados con *L. paracasei* el incremento en el %AL fue significativamente mayor al obtenido en los MRS basal, siendo dicho aumento de hasta un orden de magnitud mayor.

Entre los medios suplementados con CRI no se encontraron diferencias significativas. Fue significativamente mayor el incremento en la producción de AL en los medios suplementados con glucosa, IGR y CRI- 2. Por su parte el caldo MRS enriquecido con glucosa no tuvo diferencias significativas con el MRS suplementado con IGR, CRI- 0, CRI- 2, como así tampoco se encontraron diferencias entre el cultivo con CRI-2 e IGR.

Tabla 3.2: Valores de $\Delta\%AL$ y ΔpH para los distintos carbohidratos utilizados por *Lactobacillus paracasei*.

Carbohidratos	$\Delta\%AL^c$	ΔpH^d
sin carbohidratos	0,088 d	-0,348 a
IGR	0,888 a	-2,885 c
Glucosa	0,811 ab	-2,603 b
CRI-0	0,540 bc	-2,803 c
CRI-2	0,697 abc	-2,585 b
CRI-4	0,509 c	-2,505 b
CRI-8	0,513 c	-2,453 b

^c Porcentaje de ácido láctico (% AL) en caldo MRS modificados.

^d pH en los caldos MRS modificados.

El incremento en el %AL se debe a la utilización de los prebióticos como sustrato de crecimiento por parte de las bacterias probióticas, dando como producto de fermentación ácido láctico. Este hecho también fue observado por otros autores que mencionan la producción de AGCC (acetato, propionato y butirato) y gases (H₂, CO₂, y CH₄) (Barrangou *et al.*, 2003; Kaplan y Hutkins, 2003; Perrin *et al.*, 2001; Rabiú *et al.*,

2001; Gopal, Sullivan y Smart, 2001; Roberfroid, 1993). En apoyo a nuestros resultados, Rossi *et al.* (2005), informaron que los cultivos que contenían fructanos del tipo inulina, presentaron una acumulación de lactato y acetato significativa ($p < 0,05$), en comparación con los cultivos control después de las primeras 24 horas, como producto de la fermentación de la inulina. Otros autores también encontraron que los probióticos que utilizaron fructooligosacáridos e inulina de cadena corta como sustrato aumentaron la proporción de butirato (Poulsen, Molck y Jacobsen, 2002; Kleessen, Hartmann y Blaut, 2001). Dichos aumentos en la producción de AGCC fue concomitante con el aumento del recuento de bacterias benéficas. La producción de dichos ácidos reduce el pH intestinal y restringe el crecimiento de patógenos potenciales y de las bacterias de putrefacción (López-Molina *et al.*, 2005).

En concordancia con los valores de $\Delta\%AL$ obtenidos, se observó que la variación en los valores de pH entre las 0 y 24 horas de incubación de los medios de cultivo MRS sin suplementar carbohidratos inoculados con *L. paracasei* fueron significativamente menores en valor absoluto (0,35) a los obtenidos en los cultivos MRS enriquecidos con carbohidratos. Se observó que entre los medios de cultivo MRS suplementados con IGR y con CRI- 0 no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la variación de pH y fueron los que tuvieron mayores valores absolutos de ΔpH . Los MRS enriquecidos con glucosa y los suplementados con CRI restantes no presentaron diferencias significativas en los valores de ΔpH . Los mayores valores absolutos de ΔpH indicarían el desarrollo de *L. paracasei* y la fermentabilidad del carbohidrato por parte de dicho probiótico.

En apoyo a los resultados presentados, Rossi *et al.* (2005) concluyeron que cuanto menor sea el pH final, mayor es la densidad óptica (DO_{600}), aunque esto no se presente como una correlación lineal (Sullivan y Nord, 2002). También López-Molina *et al.* (2005) estudiaron la fermentación *in vitro* por parte de las bacterias del colon utilizando como sustrato inulina de alcaucil, y determinaron que el metabolismo bacteriano de dicho sustrato produce una marcada disminución en el pH del medio de cultivo.

Otros autores también mencionaron que el metabolismo de fructanos está acompañado de un descenso progresivo del pH del medio de cultivo (Rastall y Maitin, 2002). En apoyo a los resultados presentados en este capítulo, otros autores mencionan que las fibras dietéticas, como es la inulina, son fermentables por bacterias colónicas específicas, tales como las bifidobacterias y algunas especies de lactobacilos (Nelson y Relman, 2005). También Roberfroid, Van Loo y Gibson (1998) concluyeron que el

metabolismo de los fructooligosacaridos de achicoria en extractos fecales de humanos está acompañado por una caída progresiva en el pH del medio de cultivo, que podría indicar la fermentación por parte de las bifidobacterias.

3.3. Crecimiento *in vitro*

Lactobacillus paracasei en medio suplementado con las diferentes fuentes de carbohidratos.

La **Figura 3.4** muestra la tasa de crecimiento relativo de *L. paracasei* (TCR) a la glucosa a distintos tiempos de cultivo, durante 24 horas en agar MRS-Basal con los distintos CRI extraídos de los tubérculos de topinambur, e IGR, como fuente de carbono.

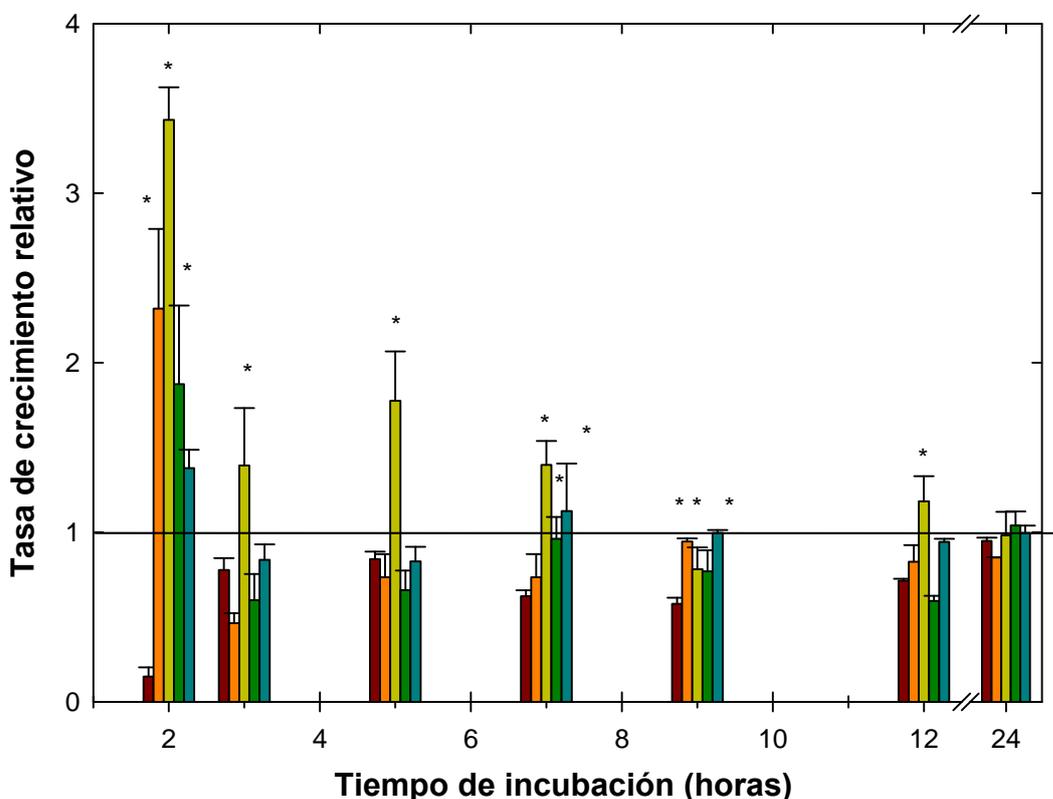


Figura 3.4. Tasa de crecimiento de *Lactobacillus paracasei* relativa a la glucosa en función del tiempo de incubación en anaerobiosis a 37 °C durante 24 h en MRS+ CRI-0 (■), CRI-2 (■), CRI-4 (■), CRI-8 (■), IGR (■). Los valores fueron expresados como los promedios ± el desvío estándar (n=3).

Los asteriscos indican que la muestra es significativamente mayor a las demás, dentro de ese mismo tiempo de incubación

El análisis de la **Figura 3.4** permite establecer que la mayoría de las inulinas ensayadas, incluyendo la inulina de achicoria (GP_n 10) fueron utilizadas por el probiótico *L. paracasei* con una eficiencia similar o superior a la glucosa, a las 2 horas de crecimiento. En contraste, López-Molina *et al.* (2005) observaron que el desarrollo del probiótico en medios suplementados con inulina de achicoria o de alcaucil fue más lento pero más duradero en comparación con el medio control con glucosa. Los resultados obtenidos a las 24 horas de incubación en los medios MRS-Inulina sugieren que la inulina promovió el crecimiento del probiótico en el mismo orden que en glucosa. En contraste, otros autores concluyeron que el crecimiento de la mayoría de las cepas de lactobacilos y bifidobacterias estudiadas en medios suplementados con prebióticos fue menor que con glucosa, tanto con GOS como con inulina (Huebner, Wehling y Hutkins, 2007).

Pompei *et al.* (2008) estudiaron la cinética de crecimiento para bifidobacterias y lactobacilos en medios enriquecidos con FOS e inulina y encontraron que el mayor crecimiento de bifidobacterias se produjo después de las 6 horas de incubación, en medios con FOS y de las 12 horas en inulina. En cambio, para los lactobacilos fue después de 8 horas en el medio con FOS y de 24 horas en el de inulina. La concentración final de ambos probióticos fue mayor en el medio con inulina que en el medio enriquecido con FOS. También otros autores detectaron que los aumentos en las concentraciones de lactobacilos y bifidobacterias se produjeron antes en los medios suplementados con OF que en los de inulina (Poulsen, Molk y Jacobsen, 2002; Kleessen, Hartmann y Blaut, 2001).

En este estudio en particular, las muestras de CRI-0 promovieron un crecimiento de *L. paracasei* más bajo en comparación con la glucosa, durante todo el período de incubación. Este hecho podría atribuirse a una menor fermentabilidad de este carbohidrato por parte del *L. paracasei*, dado su mayor grado de polimerización ($GP_n \sim 12$) en comparación con las otras muestras de CRI. Este resultado puede interpretarse considerando que la susceptibilidad de los fructanos a la fermentación, está determinada por su estructura química y su GP (Biedrzycka y Bielecka, 2004). En este sentido, Bielecka, Biedrzycka y Majkowska, (2002) concluyeron que la estimulación del crecimiento de *Bifidobacterium in vitro*, es dependiente de la longitud de cadena.

Por su parte Makras, Van Acker y De Vuyst (2005) mencionaron que el crecimiento y la viabilidad de los cultivos probióticos en presencia de la inulina varían no sólo con su grado de polimerización sino también con la cepa probiótica. Roberfroid *et al.* (1998)

señalaron que la fermentación *in vitro* de inulina de longitud de cadena promedio >10 es más lenta que la fermentación de inulina de cadena corta <10 . Otros estudios (Kaplan y Hutkins, 2000; McKellar y Modler, 1989) mostraron que inulinas altamente polimerizadas ($GP_n > 10$) son fermentadas más lentamente por las cepas de *Bifidobacterium*, que los fructanos de cadenas más cortas ($6 < GP_n < 10$). A su vez, los fructanos de cadenas largas, por ser menos biodegradables que los de cadena corta (van de Wiele *et al.*, 2007; Roberfroid *et al.*, 1998), son menos fermentables por la microflora intestinal. El mayor GP de la inulina, en comparación con OF, podría proporcionar un efecto de larga duración en todo el colon. López -Molina *et al.* (2005) mostraron que el crecimiento de *B. bifidum* en medios con inulinas de diferentes fuentes vegetales (achicoria, alcaucil y sus hidrolizados, respectivamente) fue similar, promoviendo efectos bifidogénicos de larga duración en el intestino humano.

Gibson *et al.* (2004) expresaron que el período de disponibilidad de los fructanos del tipo inulina en el lumen del intestino es mayor que el de los OF, dando como resultado mayor cantidad de carbohidratos residuales. En este sentido, señalaron que sería apropiada una combinación de ambos fructanos, de cadena larga y corta, dado que es fisiológicamente más activa que las fracciones individuales. Rastall y Maitin (2002) observaron que las bifidobacterias son capaces de utilizar los FOS y las inulinas de cadena corta, pero no las inulinas altamente polimerizadas.

En concordancia con nuestros resultados, también Li *et al.* (2008) observaron, mediante estudios *in vitro*, que las mayores tasas de crecimiento de bifidobacterias fueron obtenidas cuando se utilizaban como sustratos FOS o inulina de cadena corta, comparadas con las obtenidas con inulina de cadena larga. Si bien en nuestro estudio se utilizó otra cepa probiótica e inulina de una fuente vegetal distinta, también se evidenció el mismo comportamiento para el medio de cultivo enriquecido con CRI-4 de $GP_n 9$ (cadenas cortas), dando tasas de crecimiento relativas similares o superiores a las obtenidas con glucosa, durante todo el período de incubación. El análisis estadístico de las tasas de crecimiento de *L. paracasei* obtenidas, indica que la inulina de $GP_n 9$ resultó ser una fuente de carbono tan eficiente como la glucosa, para este probiótico, durante todo el período de incubación.

En contraste con lo antedicho, se observó que a pesar de su grado de polimerización similar ($GP_n \sim 9,8$), la muestra de CRI-8 promovió tasas de crecimiento menores que las muestra de CRI-4. Esto puede atribuirse a que el sustrato CRI-8 posee un contenido de inulina menor (en función de los datos presentados en el **Capítulo 2 Tabla 2.6**, se

asume que se mantienen las tendencias de los resultados de CRIp, en los CRI). En este sentido, otros autores también mencionaron que la utilización de la inulina por parte de las bacterias probióticas depende no sólo del grado de polimerización de las cadenas sino también del grado de pureza (Panchev *et al.*, 2011; Saengthongpinit y Sajjaanantakul, 2005). En este sentido, también otros autores mencionaron que los extractos prebióticos purificados son selectivamente fermentables por las bacterias probióticas (Van Laere, Hartemink y Rombouts, 1997).

Algunos autores mencionaron que los probióticos no crecieron en medios de cultivo sin fuente de carbohidratos (Cardelle-Cobas *et al.*, 2011). En contraste con estos resultados, en este estudio se observó desarrollo de colonias de *L. paracasei* en el medio MRS basal (**Figura 3.5**), a pesar de a la ausencia de fuente de carbono. Sin embargo, el crecimiento del probiótico en dicho medio MRS basal fue significativamente menor ($p < 0,05$) al presentado en los medios MRS suplementados con carbohidratos.

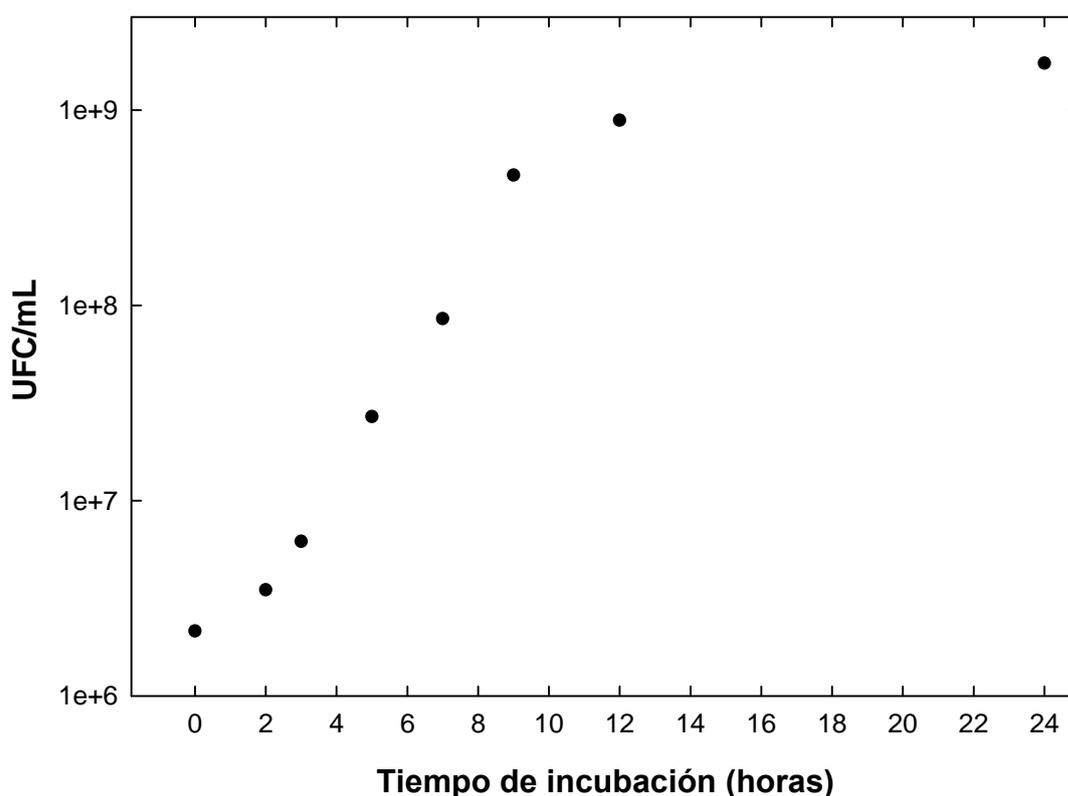


Figura 3.5. Crecimiento de *Lactobacillus paracasei* en función del tiempo de incubación en anaerobiosis a 37 °C durante 24 h en MRS basal. Los valores fueron expresados como los promedios + el desvío estándar (n=3).

Los cultivos enriquecidos con inulina de topinambur, no tuvieron diferencias significativas entre sí, a las 24 horas de incubación.

3.4. Score de actividad prebiótica

La **Figura 3.6** muestra los valores de score de la actividad prebiótica (SAP) obtenidos para las diferentes muestras de CRI e inulina comercial GR y la correspondiente a un ensayo de control sin fuente de carbono (medio basal), por medio de la **Ecuación 3.3**.

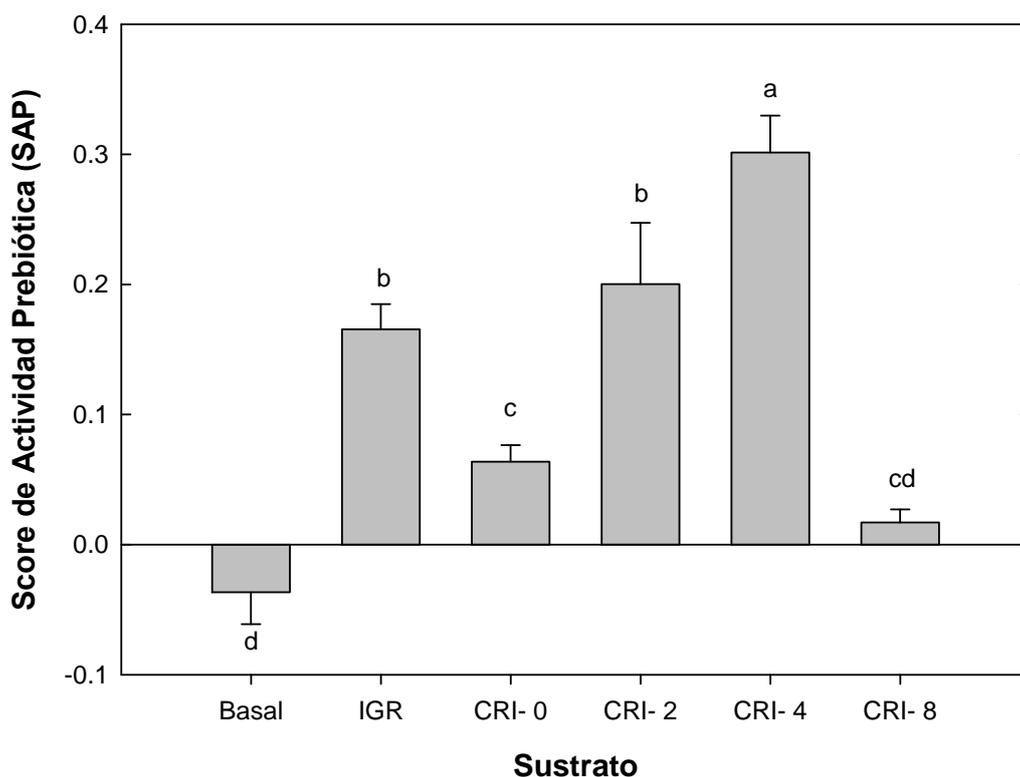


Figura 3.6. Score de la actividad prebiótica (SAP) calculada con la **Ecuación 3.3** para los diferentes sustratos. La letra en común indica que no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El valor SAP surge de la diferencia entre el crecimiento relativo del probiótico en prebiótico y glucosa y el crecimiento relativo del patógeno, utilizando prebiótico y glucosa respectivamente, a las 0 y a las 24 horas. Cuanto más alto es el valor del score mayor crecimiento relativo de las bacterias probióticas y/o menor crecimiento relativo del patógeno. Esto indica un mayor y más selectivo uso de los prebióticos en relación a la glucosa, por parte del microorganismo probiótico y/o un uso limitado de prebiótico

en relación a la glucosa, por el microorganismo patógeno. Para el medio basal se obtuvo un valor SAP negativo. Esto se debe a que el crecimiento del probiótico fue menos favorecido en medio sin fuente de carbono comparado con el obtenido en glucosa. Conjuntamente, el crecimiento de las bacterias entéricas fue menos limitado por la disponibilidad de carbono en el medio, en comparación con la cepa probiótica.

Los valores positivos de SAP obtenidos para las muestras de CRI, indicaron un uso selectivo de las mismas por parte de *L. paracasei* con respecto a las cepas patógenas. La muestra CRI-4 presentó el valor más alto de SAP, seguido de las muestras CRI-2 (que a su vez, no tenían diferencias significativas con la inulina GR), CRI-0 y el CRI-8.

Considerando que no hubo diferencias significativas entre los valores de TCR a las 24 horas, obtenidos con las muestras de CRI como fuente de carbono (**Figura 3.4**), las diferencias en los valores de SAP, podrían atribuirse a las diferencias en las tasas de crecimiento de las bacterias entéricas, en la respectiva muestra de CRI. Este resultado indica que los medios enriquecidos con CRI favorecieron el crecimiento de *L. paracasei*, que siguieron el siguiente orden: CRI-4 > CRI-2, IGR > CRI-0 > CRI-8.

Los valores de score de actividad prebiótica son dependientes de la cepa bacteriana probiótica probada y del tipo de carbohidrato prebiótico utilizado. En ese sentido, la eficacia prebiótica de los fructanos del tipo inulina no sólo depende de la dosis de la dieta, sino también del GP (Gibson *et al.*, 2004).

Por otro lado, Roberfroid *et al.*, (1998) mencionaron que si bien las oligofruktosas (natural de achicoria y sintéticas) fueron utilizadas por las cepas *Bacteroides spp.*, Clostridios, Enterococos, *Klebsiella*, Lactobacilos, *Proteus* y *Staphylococcus*, fue de manera significativamente menor que la glucosa ($p < 0,05$). También Huebner *et al.*, (2008) informaron que el crecimiento de la mezcla entérica en medios con prebióticos fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en comparación con el crecimiento en glucosa.

En estudios previos, el *L. paracasei* presentó valores de score de actividad prebiótica altos, (en el rango de 0,99 a 1,17) en medios de cultivo enriquecidos con inulina comercial de achicoria (-S, HP y P95) (Huebner, Wehling y Hutkins, 2007).

Si bien los valores obtenidos en el presente estudio fueron inferiores, se demostró con los ensayos *in vitro* que los CRI obtenidos de topinambur son una fuente potencial de prebióticos. Dado que los CRI promovieron el aumento de las poblaciones de *L. paracasei* y no el de cultivos patógenos. En apoyo a estos resultados Gibson y Wang, (1994); Wang y Gibson, (1993) y Li *et al.*, (2008) han demostrado que tanto la inulina

de achicoria y sus hidrolizados, estimulan selectivamente el crecimiento de las bífidobacterias, lo que indica una buena actividad prebiótica.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que, independientemente del GP_n, todas las inulinas fueron fermentadas por el *Lactobacillus paracasei*, siendo la inulina con GPn 9 (extraída de tubérculos almacenados durante 4 meses, CRI-4) la que presentó mayores valores de score de actividad prebiótica, comparables a las obtenidas con glucosa e inulina comercial de achicoria (GPn ≥ 10). Este resultado indicaría que hay un GPn óptimo de inulina que promueve en mayor medida el crecimiento del microorganismo probiótico.

Los resultados del presente estudio contribuyen a considerar al topinambur como una fuente potencial de un ingrediente bioactivo para la elaboración de alimentos funcionales, equivalente a la inulina actualmente disponible en el mercado. También aporta información sobre la influencia del grado de polimerización de la inulina, afectada por el tiempo de almacenamiento de tubérculos de topinambur, sobre las propiedades prebióticas de la inulina extraída.

5. Anexo I

Composición de los medios de cultivo

Tabla 3.3: Caldo MRS

Caldo MRS	
(pH=6,4± 0,2)	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Proteasa peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,6206
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,4094
Sulfato de manganeso	0,0559
Tween 80	1,0
L-cisteína	0,5

Se suspendieron 51 g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó en reposo 5 minutos y mezcló calentando a ebullición durante 2 minutos. Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 minutos

Tabla 3.4: Agar MRS

Agar MRS	
(pH=6,4± 0,2)	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Proteasa peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,6206
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,4094
Sulfato de manganeso	0,0559
Tween 80	1,0
L-cisteína	0,5
Agar	13,0

Se suspendieron 64 g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó en reposo 5 minutos y mezcló calentando a ebullición durante 2 minutos. Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 minutos

Tabla 3.5: Caldo MRS basal

Caldo MRS Basal (pH=6,4± 0,2)	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Proteasa peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Fosfato dipotásico	2,6206
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,4094
Sulfato de manganeso	0,0559
Tween 80	1
L-cisteína	0,5
Carbohidratos fermentables ¹	20

Se suspendieron 51 g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó en reposo 5 minutos y mezcló calentando a ebullición durante 2 minutos. Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

¹ cuando fue necesario preparar MRS- glucosa, MRS- inulina GR, MRS inulina topinambur. La inulina de topinambur incorporada se obtuvo según se describió en el punto 5.2 de este capítulo.

Tabla 3.6: Agar MRS basal

Agar MRS Basal (pH=6,4± 0,2)	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Proteasa peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Fosfato dipotásico	2,6206
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,4094
Sulfato de manganeso	0,0559
Tween 80	1
L-cisteína	0,5
Agar ¹	15
carbohidratos fermentables ²	20

Se suspendieron 51 g del medio en un litro de agua destilada. Se dejó en reposo 5 minutos y mezcló calentando a ebullición durante 2 minutos. Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

¹ para siembra en superficie.

² cuando fue necesario preparar MRS- glucosa, MRS- inulina GR, MRS inulina topinambur. La inulina de topinambur incorporada se obtuvo según se describió en el punto 5.2 de este capítulo.

Tabla 3.7: Tripteína soja agar (TSA)

TSA	
(pH=7,3± 0,2)	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Tripteína	15,0
Peptona de soja	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar ¹	15,0

Se desolvieron 40 g de polvo deshidratado por litro de agua destilada. Se mezcló y se dejó reposar 5 minutos. Se calentó suavemente en agitación y se hirvió durante 2 minutos hasta su disolución. Se esterilizó a 121 °C, 15 minutos.

¹ para siembra en superficie.

Tabla 3.8: Caldo medio mínimo M9

M9	
(pH=6,8± 0,2)	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Fosfato de disódio	6,0
Fosfato de potasio	3,0
Cloruro de sódio	0,5
Cloruro de amonio	1,0
Sulfato de magnesio heptahidratado 1M	1,0 mL
Cloruro de calcio anhidratado 0,01-M	10,0 mL

Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

Tabla 3.9. Caldo LB.

LB	
(pH=7,5± 0,2)*	
Compuesto de Fórmula (g/1000mL)	g/L
Tripteína	10,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro de sódio	5,0

*Se ajustó con NaOH 1N y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

6. Abreviaturas

AGCC: ácidos grasos de cadena corta
AL: ácido láctico
aw: actividad de agua
CRI: carbohidratos ricos en inulina
DO: densidad óptica
eae: proteína de membrana, llamada intimina
ehxA: enterohemolisina
F: fructosa
FOS: fructooligosacáridos
G: glucosa
GP: grado de polimerización
GPn: grado de polimerización promedio
IGR: inulina de achicoria GR
IP: índice prebiótico
O.N. over nighth
OF: oligofructosa
S: sacarosa
saa: proteína de membrana
SAP: score de actividad prebiótica
vt2: verocitotoxina 2

7. Referencias

- Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M. y Ellis, K. J. (2007). Effect of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *Journal of Pediatrics*, 151(3): 293-298.
- Adebola, O., Corcoran, O. y Morgan, W. A. (2013). Protective effects of prebiotics inulin and lactulose from cytotoxicity and genotoxicity in human colon adenocarcinoma cells. *Food Research International*, 52(1): 269-274.
- Amores R., Calvo A., Maestre J. R. y Martínez-Hernández, D. (2004). Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(2): 131-139.
- Atlas, R. M. (1993). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, CA, USA: CRC Press.
- Barcenilla, A., Pryde, S. E., Martin, J. C., Duncan, S. H., Stewart, C. S., Henderson, C. y Flint, H. J. (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4): 1654-1661.
- Barrangou, R., Altermann, E., Hutkins, R., Cano, R. y Klaenhammer, T. R. (2003). Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15): 8957-8962.
- Biedrzycka, E. y Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3): 170-175.
- Bielecka, M.; Biedrzycka, E. y Majkowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for symbiotic and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, 35(2): 125-131.
- Biggs, D. R., y Hancock, K. R. (2001). Fructan 2000. *Trends in Plant Science*, 6(1): 8-9.
- Bruggink, C., Maurer, R., Herrmann, H., Cavalli, S. y Hoefler, F. (2005). Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085(1): 104-109.
- Camire M., Cho S., Craig S., Devrie J., Gordon D., Jones J. (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46(3): 112-126.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Peláez, C., Requena, T. y Ávila M. (2011). Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of

- structure on Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium growth. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1): 81-87.
- Cherbut, C., Aube, A. C., Blottiere, H. M. y Galmiche, J. P. (1997). Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 222(1): 58-61.
- Choque Delgado, G. T., Tamashiro, W. y Pastore, G. M. (2010). Review: Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International*, 43(5): 1231-1236.
- Coussement, P. (1999). Inulin and oligofructose as dietary fiber: analytical, nutritional and legal aspects. *Complex Carbohydrates in Foods*, 93(1): 203-212.
- Cummings, J. H. y Macfarlane, G.T. (1991). The control, consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6): 443-459.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., & Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1): 35-42.
- De Gennaro, S., Birch, G. G., Parke, S. A. y Stancher, B. (2000). Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. *Food Chemistry*, 68(2): 179-183.
- Delzenne, N. M. y Kok, N. (2001). Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 456-458.
- Demigné, C., Jacobs, H., Moundras, C., Davicco, M. J., Horcajada, M. N., Bernalier, A. y Coxam, V. (2008). Comparison of native or reformulated chicory fructans, or non-purified chicory, on rat cecal fermentation and mineral metabolism. *European Journal of Nutrition*, 47(7): 366-374.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2): 411-421.
- Esparza, J. A. R. y Fragoso, L. R. (2010). ¿Qué sabe Ud. acerca de... los probióticos?. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(1): 60-63.

- Fanaro, S., Chierici R., Guerrini, P. y Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica*, 92(441): 48-55.
- FAO/OMS. Report on Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in foods (2002). Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- FAO/WHO (2001) Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Informe de una consulta conjunta de expertos FAO / OMS, Córdoba.
- Fooks, L. J. y Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(1): 39-49.
- Flamm G., Glinsmann W., Kritchevsky D., Prosky L. y Roberfroid M. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit. Rev Food Sci Nutr* 2001; 41: 353-362.
- Franck, A. (2006). Inulin. En: *Food Polysaccharides and Their Applications*. Stephen A. (Editor). Segunda Edición. Nueva York, USA: Marcel Dekker; 733 pp.
- Franck, A. y De Leenheer, L. (2005). Inulin. In A. Steinbuechel (Ed.), *Biopolymers online*, Vol. 6. (439-479). Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
- Fujitani, S., Ueno, K., Kamiya, T., Tsukahara, T., Ishihara, K., Kitabayashi, T. y Itabashi, K. (2007). Increased number of CCR4-positive cells in the duodenum of ovalbumin-induced food allergy model Nc/jic mice and antiallergic activity of fructooligosaccharides. *Allergology International*, 56(2): 131-138.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Rastall, R.A., Van Loo, J. A. E. y Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2): 259-275.
- Gibson, G. R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 80(4): 209-212.
- Gibson, G. R. (2004). From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *Journal of Food Science*, 69(5): 141-143.
- Gibson, G. R. y Collins, M. D. (1999). Concept of balanced colonic microbiota, prebiotics and synbiotics. En: Hanson, L. A. y Yolken, R. H., editores. *Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora*, Vol. 42: 139-152.
- Gibson, G. R. y MacFarlane, G. T. (1995). *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA

- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(1): 1401-1412.
- Gibson, G. R. y Wang, X. (1994). Bifidogenic properties of different types of fructooligosaccharides. *Food Microbiology*, 11(6): 491-498.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., y Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108(4): 975-982.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E. F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C. y Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7(1): 1-19.
- Gill H., Rutherford K. J., Cross M. L. y Gopal P. K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis*. *American Journal Clinical Nutrition*, 74(6):833-3
- Gopal, P. K., Sullivan, P. A., y Smart, J. B. (2001). Utilisation of galactooligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosis* DR20. *International Dairy Journal*, 11(1): 19-25.
- Greger J. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *J Nutr* 1999; 129: 1434-1435.
- Guarner, F. (2006). Enteric flora in health and disease. *Digestion*, 73(1): 5-12.
- Guarner, F. (2007). Studies with inulin-type fructans on intestinal infections, permeability and inflammation. *The Journal of Nutrition*, 137(11): 2568-2571.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., y Tashiro, Y. (1986). Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria and Microflora*, 5(1): 37-50.
- Hirayama, K. y Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and infection*, 2(6): 681-686.
- Hoebregs, H. (1997). Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative study. *Journal Association Official Analytical Chemistry International*, 80(5): 1029-1037.

- Hopkins, M. J., Cummings, J. H., MacFarlane, G. T. (1998). Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2): 381-386. (citado por Biedrzycka y Bielecka, 2004).
- Hopkins, M. J., y Macfarlane, G. T. (2003). Nondigestible oligosaccharides enhance bacterial colonization resistance against *Clostridium difficile in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 1920-1927.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, R.W. y Hutkins, R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18(3): 287-293.
- Huebner, J., Wehling, R. L., y Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7): 770-775.
- Hughes, R. y Rowland, I. R. (2001) Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis*, 22(1): 43-47.
- Imamura, L., Hisamitsu, K. y Kobashi, K. (1994). Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biological & Pharmaceutical*, 17(5): 596-602.
- Incoll, L. D. y Bonnett, G. D. (1996). Fructans in the compositae –a short review. *Compositae: Biology & Utilization. Proceedings of the International Compositae Conference (Vol. 2: 401-413)*.
- Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A. y Otani, T. (2003). Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1): 56-63.
- IUB-IUPAC Joint Commission of Biochemical Nomenclature. (1982). Abbreviated terminology of oligosaccharide chains. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 3347-3351.
- Jackson, K. G., Taylor, G. R., Clohessy, A. M. y Williams, C. M. (1999). The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. *British Journal of Nutrition*, 82(1): 23-30.
- Kalyani Nair, K., Kharb, S. y Thompkinson, D. K. (2010). Inulin dietary fiber with functional and health attributes-A review. *Food Reviews International*, 26(2): 189-203.

- Kaplan, H. y Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6): 2682-2684.
- Kaplan, H., y Hutkins, R. W. (2003). Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 2217-2222.
- Kaur, N. y Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27(7): 703-714.
- Kelly-Quagliana, K. A., Nelson, P. D. y Buddington, R. K. (2003). Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutrition Research*, 23(2): 257-267.
- Kleessen B., Hartmann L. y Blaut M. (2001). Oligofructose and long-chain inulin influence the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *British Journal of Nutrition*, 86(2): 291-300.
- Kolbye, A. C., Blumenthal, H., Bowman, B., Byrne, J., Carr, C. J., Kirschman, J. C., Roberfroid, y Weinberger, M. A. (1992). Evaluation of the food safety aspects of inulin and oligofructosa-GRAS determination. Orafti Intl. Report. Tienen, Belgium: Orafti.
- le Blay, G. M., Michel, C. D., Blottiere, H. M. y Cherbut, C. J. (2003). Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2): 312-320.
- Lewis S., Burmeister S. y Brazier J. (2005). Effect of the prebiotic oligofructose on relapse of *Clostridium difficile* associated diarrhea: a randomized, controlled study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(5): 442-448.
- Li, D., Kim, J. M., Jin, Z., y Zhou, J. (2008). Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. *Food Science and Technology*, 14(1): 29-34.
- Lindsay, J. O., Whelan, K., Stagg, A. J., Gobin, P., Al-Hassi, H. O., Rayment, N., Kamm, M. A., Knight, S. C. y Forbes, A. (2006). Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*, 55(3): 348-355.
- López-Molina D., Navarro-Martínez M. D., Rojas Melgarejo F., Hiner A. N. P., Chazarra S. y Rodríguez-López, J. N. (2005). Molecular properties and prebiotic

- effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *Phytochemistry* 66(12): 1476-1484.
- Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. C. (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*, 34(9): 791-796.
- Luque-Garcia, J. L., y Luque de Castro, M. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(1): 41-47.
- Macfarlane, G. T., Gibson, G. R., Drasar, B. S. y Cummings, J. H. (1995). Metabolic significance of the gut microflora. *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*, 249-274.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. y Cummings, J. H. (2006). Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24(5): 701-714.
- Madrigal, L. y Sangronis, E. (2007). Inulin and derivates as key ingredients in functional foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4): 387-396.
- Makras, L., Van Acker, G. y De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700: 2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 6531-6537.
- Mantzouridou, F., Spanou, A., y Kiosseoglou, V. (2012). An inulin-based dressing emulsion as a potential probiotic food carrier. *Food Research International*, 46(1): 260-269.
- McKellar, R. C. y Modler, H. W. (1989). Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium spp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(6): 537-541.
- Menne, E., Guggenbuhl, N. y Roberfroid M. (2000). Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1197-1199.
- Moshfegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., y Ahuja, J. K. C. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *The Journal of nutrition*, 129(7): 1407-1411.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A. y Orlando, P. (2012). The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*, 18(3): 280-285.
- Nelson, K. E. y Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728): 1635-1638.

- Nguyen, Q. D., Rezessy-Szabó, J. M., Czukor, B., y Hoschke, Á. (2011). Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. *Process Biochemistry*, 46(1): 298-303.
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: What are they?. *Journal of Nutrition*, 129(7): 1402- 1406.
- O' Sullivan, D. J. (1999). Methods for analysis of the intestinal microflora. *Current issues in intestinal microbiology*, 1(2), 39-50.
- Olagnero G., Genevois C., Irei V., Marcenado J., Bendersky S. (2007). Alimentos funcionales: Conceptos, Definiciones y Marco Legal Global. Trabajo de actualización, *DIETA*, 25(119): 31-39.
- Olano Martin, E., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosacchrides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3): 505-511.
- Özer, D., Akin, S. y Özer, B. (2005). Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in *Acidophilus-Bifidus* Yoghurt. *Food Science and Technology International*, 11(1): 19-24.
- Palacio, M. I., Etcheverría, A. I. y Manrique, G. D. (2014). Fermentation by *Lactobacillus paracasei* of galactooligosaccharides and low molecular weight carbohydrates extracted from squash (*Curcubita maxima*) and lupin (*Lupinus albus*) seed. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(4): 329-332.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe*, 8(5): 287-292.
- Palframan, R., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4): 281-284.
- Panchev, I., Delchev, N., Kovacheva, D. y Slavov, A. (2011). Physicochemical characteristics of inulins obtained from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *European Food Research and Technology*, 233(5): 889-896.
- Parnell, J. A. y Reimer, R. A. (2009). Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(6): 1751-1759.

- Perrin, S., Warchol, M., Grill, J. P. y Schneider, F. (2001). Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6): 859-865.
- Pinheiro de Souza Oliveira, R., Perego, P., Nogueira de Oliveira M. y Converti A., (2012). Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The inulin effect, *Food Research International*, 48(1): 21-27.
- Pompei A., Cordisco L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U. M., Matteuzzi, D. y Rossi, M. (2008). *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe*, 14(5): 280-286.
- Poulsen, M., Molck, A. M. y Jacobsen, B. L. (2002). Different effects of short- and long-chained fructans on large intestinal physiology and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Nutrition and Cancer*, 42(2): 194-205.
- Quemener, B., Thibault, J. F. y Coussement, P. (1994). Determination of inulin and oligofructose in food products and integration in the AOAC method for the measurement of total dietary fibre. *LWT-Food Science and Technology*, 27(2): 125-132.
- Rabiu, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2001). Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β -galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2526-2530.
- Ramírez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., y Louis, P. (2009). Efecto de la inulina en la microbiota intestinal humana: la estimulación de *Bifidobacterium adolescentis* y *prausnitzii Faecalibacterium*. *British Journal of Nutrition*, 101(04): 541-550.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K. y Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1): 1-7.
- Rao V. A. (1999). Dose response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *Journal of nutrition*, 129(7): 1442-1445.
- Rao, V. A. (2001). The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research*, 21(6): 843-848.
- Rastall, R. A. (2010). Functional oligosaccharides: Application and manufacture. *Annual Reviews in Food Science Technology*, 1(1): 305-339.

- Rastall, R. A., Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R. y Pot, B., Reid, G., Rowland, I. R., Sanders, M. E. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2): 145-152.
- Rastall, R. A., y Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: Towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5): 490-496.
- Reid, G. (2008). Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. *International Dairy Journal* 18(10): 969-975.
- Ritsema, T. y Smeeckens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current opinion in plant biology*, 6(3): 223-230.
- Roberfroid, M. B. (1993). Dietary fibre, inulin, and oligofructose: A review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(2): 103-148.
- Roberfroid, M. B. (1999). Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129(7): 1398-1401.
- Roberfroid, M. B. (2000). Functional fiber. Non digestible oligosaccharides. *Critical Journal of Food and Science of Nutrition*, 40(1): 461-480.
- Roberfroid, M. B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs?. *American Journal Clinical of Nutrition*, 73(2): 406-409.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* 93(1): 13-25.
- Roberfroid, M. B., Champ, M. y Gibson, G. R. (2002). Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(2): 139-143.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. y Gibson G. R. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition*, 128(1): 11-19.
- Roberfroid, M. B. y Delzenne, N. M. (1998). Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition*, 18(1): 117-143.
- Robertfroid, M. B. (2007). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *Journal of Nutrition*, 137(11): 2493-2502.
- Ross, S. (2000). Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. *American Journal Clinical of Nutrition*, 71(6): 1735-1738.
- Rossi, M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini, M., Pompei, A., Zaroni, S. y Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a

- comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and environmental microbiology*, 71(10): 6150-6158.
- Saarela, M., Lähteenmäki, L., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1): 99-117.
- Saavedra, J. M. y Tschernia, A. (2002). Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition*, 87(2): 241-246.
- Saengthongpinit, W. y Sajjaanantakul, T. (2005). Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1): 93-100.
- Saito, M. (2007). Role of FOSHU (food for specified health uses) for healthier life. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 127(3): 407-416.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson G. R. y Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(1): 147-171.
- Sanders, M. (1998). Development of consumer probiotics for the US market. *British Journal of Nutrition*, 80(4): 213-218.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. y Prapulla, S. G. (2005). Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. *Journal of Food engineering*, 68(1): 57-64.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13): 5192-5199.
- Sanz, M. L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. (2005). *In vitro* investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8): 2914-2921.
- Sanz, Y., y Dalmau, J. (2008). Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediátrica Española*, 66(1): 27-31.
- Sarmiento Rubiano, L. A. (2008). Investigación de propiedades prebióticas de alimentos o componentes alimenticios. *Orinoquia*, 12(2): 182-193.
- Scardovi, V. (1986). The genus *Bifidobacterium*. *Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2., 1418-34.

- Scheppach, W., Bartram, H. P. y Richter, F. (1995). Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 31(7): 1077-1080.
- Scollo, D., Ugarte, M., Vicente, F., Giraudo, M., Sánchez Tuero, H. y Mora, V. (2011). El potencial del topinambur en la salud y la nutrición. *Diaeta*, 29(137): 7-13.
- Shadid, R., Haarman, M., Knol, J., Theis, W., Beermann, C., Rjosk-Dendorfer, D., Schendel, D. J., Koletzko, B. V. y Krauss-Etschmann, S. (2007). Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity—a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86(5): 1426-1437.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna B. y Lugasi A., (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer. *Appetite*, 51(3): 456-467.
- Steer, T., Carpenter, H., Tuohy, K., Gibson, G. R., Steer, T. E. (2000) Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 13(2): 229-254.
- Sullivan, A. y Nord, C. E. (2002). The place of probiotics in human intestinal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(5): 313-319.
- Teitelbaum, J. E., y Walker, W. A. (2002). Nutritional impact of pre-and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition*, 22(1): 107-138.
- Trowell, H. C. (1975). Dietary-fiber hypothesis of the etiology of diabetes mellitus. *Diabetes*, 24(8): 762-765.
- Tuohy, K. M., Finlay, R. K., Wynne, A. G. y Gibson, G. R. (2001). A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-inulin: faecal bacteria enumerated using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Anaerobe*, 7(3): 113-118.
- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., y Gibson, G. R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15): 692-700.
- van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. y Verstraete, W. (2007). Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced *in vitro* prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2): 452-460.
- Van Laere, K. M, Hartemink, R. J. y Rombouts, F. M. (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3): 367-374.

- Van Loo, J. y Hermans, J. (2000). Inulin Products with improved nutritional properties. European Patent Application, 1125507.
- Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H. y Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Critical Reviews in Food Science & Nutrición* , 35(6): 525-552.
- Veereman, G. (2007). Pediatric applications of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 137(11), 2585-2589.
- Verdenelli, M. C., Silvi, S., Cecchini, C., Orpianesi, C. y Cresci, A. (2011). Influence of a combination of two potential probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus IMC 501*® and *Lactobacillus paracasei IMC 502*® on bowel habits of healthy adults. *Letters in applied microbiology*, 52(6): 596-602.
- Videla, S., Vilaseca, J., Antolin, M., Garcia-Lafuente, A., Guarner, F., Crespo, E., Casalots, J., Salas, A. y Malagelada, J. R. (2001). Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *American Journal of Gastroenterology*, 96(5): 1486-1493.
- Vijn, I. y Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology*, 120(2): 351-359.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., Uttara Ramasamy, H. A. Schols y De Vos, P. (2015). Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3): 414-436.
- Vos, A. P., Haarman, M., van Ginkel, J. W., Knol, J., Garssen, J., Stahl, B., Boehm, G. y M'Rabet, L. (2007). Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. *Pediatric allergy and immunology*, 18(4): 304-312.
- Vos, A. P., M'Rabet, L., Stahl, B., Boehm, G. y Garssen, J. (2007). Immunomodulatory effects and potential working mechanisms of orally applied nondigestible carbohydrates. *Critical Reviews in Immunology*, 27(2): 97-140.
- Vulevic, J., Robert, A., Rastall, Gibson, G. R. (2004) Developing a quantitative approach for determining the *in vitro* prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1): 153-159.
- Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M.W. y Flint, H. J. (2005). pH and peptide supply can radically alter bacterial populations, short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1): 3692-3700.

- Wang, X. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International Review*, 42(1): 8-12.
- Wang, X. y Gibson, G. R. (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology* 75(4): 373-380.
- Watzl, B., Girrback, S., y Roller, M. (2005). Inulin, oligofructose and immunomodulation. *British Journal of Nutrition*, 93(1): 49-55.
- Zimeri, J. E., y Kokini, J. L. (2002). The effect of moisture content on the crystallinity and glass transition temperature of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 48(3): 299-304.

Capítulo 4

Diseño de un alimento funcional: Incorporación de inulina en panes

Este capítulo describe el efecto de la utilización de carbohidratos ricos en inulina obtenidos de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) en la elaboración de panes. Se evaluaron las propiedades reológicas de las masas, las características estructurales y de textura de los panes, así como también parámetros fisicoquímicos y sensoriales.

1. Introducción

1.1. Alimentos funcionales

La sensibilización de los consumidores sobre la importancia de los alimentos funcionales está en plena evolución (Krystallis *et al.*, 2008). La demanda de estos productos alimenticios ha crecido en los países asiáticos desde finales del siglo XX, y su uso se extendió rápidamente a países de Europa, África y América (Siro *et al.*, 2008).

Se consideran alimentos funcionales a los alimentos que además de nutrir promueven un efecto beneficioso sobre la salud, dado que contienen sustancias que desempeñan una acción específica en las funciones fisiológicas del organismo, mejorando el estado de la salud y bienestar, y/o reduciendo el riesgo de contraer enfermedades (Scott, Duncan y Flint, 2008; Arai, 2002; Diplock *et al.*, 1999).

Los alimentos funcionales pueden elaborarse por adición de un ingrediente funcional o compuesto deseable (antioxidantes, probióticos, fibras / prebióticos y fitoesteroles), por eliminación de un compuesto indeseado o por modificación de la cantidad y/o biodisponibilidad de uno o más componentes. El amplio uso de prebióticos promovió un marcado avance en el conocimiento de dichos ingredientes, que permitió un desarrollo direccionado a cubrir necesidades específicas desde el punto de vista de la salud y de las propiedades funcionales. En este sentido, varios autores investigaron la influencia de la suplementación de inulina, fructooligosacáridos sobre la calidad de los alimentos que contienen cereales (Almeida *et al.*, 2013; Aravind *et al.*, 2012; Ziobro, *et al.*, 2013; Borneo y Aguirre, 2008; Brennan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2002).

1.2. Panificados

El pan es un alimento de primera necesidad para la mayoría de la población mundial. En Argentina, los valores de consumo de pan son cercanos a los 72 kg/hab/año (Lutz y León, 2009).

Los panificados son una fuente importante de hidratos de carbono, proteínas, fibra dietética, vitaminas, micronutrientes y antioxidantes. Según la American Dietetic Association (1997), la recomendación de ingesta de fibra dietaria es de 25 a 35 g diarios o de 10 a 13 g / 1000 kcal. En el pan blanco la ingesta de fibra es menor a la recomendada (Mandala *et al.*, 2009), dado que su contenido de fibra es de 1,9 g / 100 g (Stauffer, (1990).

En nuestro país el porcentaje de la harina de trigo que se destina a la elaboración de panificados es de más del 70% (Pantanelli, 2003) y está constituida por una amplia variedad de trigos. Además de harina y agua, los productos de panificación pueden contener entre sus ingredientes levaduras o leudantes químicos, otros tipos de harina de cereales, grasas, leche, huevo y diferentes aditivos como oxidantes, hidrocoloides, emulsionantes y enzimas. Los panes han ido evolucionando en cuanto a sus formas y características distintivas. Cada país fue desarrollando su método de panificación tradicional de acuerdo a la calidad de la materia prima y a las características exigidas por los consumidores.

1.2.1. Características de la masa

La masa de pan se obtiene de la mezcla de harina de trigo con agua que forma la red viscoelástica de gluten, como producto del amasado. El agua tiene un papel crucial a lo largo del proceso de panificación, participando en la gelatinización del almidón, la desnaturalización de las proteínas, así como en el desarrollo de sabor y color (Rosell *et al.*, 2006). Las características de elasticidad y extensibilidad de la masa determinan la capacidad de retener los gases producidos por las levaduras durante la fermentación y formar los alvéolos que dan como resultado una miga de pan esponjosa (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003; Mirsaedghazi, Emam-Djomeh, y Mousavi, 2008; Shewry *et al.*, 2001). Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas contenidas en la harina condicionan la capacidad para formar la red viscoelástica durante el amasado, que determina su calidad industrial y su valor comercial (Miranda, 2001; Shewry *et al.*, 2001; Gan, Ellis y Schofield, 1995). Durante el amasado se producen interacciones entre los componentes de la harina como así también con los aditivos y/o ingredientes

(Lee *et al.*, 2001). Entre las proteínas se forman uniones disulfuro y la continuidad de la red proteica depende de los entrecruzamientos covalentes tales como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Meredith, 1964).

Para obtener información sobre la estructura de la masa y sus propiedades viscoelásticas pueden realizarse mediciones dinámico-oscilatorias de pequeña amplitud. Los módulos resultantes de dichas mediciones son el módulo elástico o de almacenamiento (G') que mide la energía almacenada por ciclo y relaciona los eventos moleculares de naturaleza elástica, y el módulo viscoso o de pérdida (G'') que mide la energía disipada como calor por ciclo y relaciona los eventos moleculares de naturaleza viscosa. La razón de G'' sobre G' se ha definido como la tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$) también conocida como tangente de pérdida, y describe los efectos de los componentes viscosos y elásticos en el comportamiento viscoelástico. Estas mediciones no predicen el comportamiento que tendrá la masa durante el procesamiento dado que las condiciones de deformación son muy diferentes (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003). Sin embargo, las propiedades reológicas de la masa son útiles en términos de calidad del producto y eficiencia de proceso (Mondal y Datta, 2008). Algunos autores mencionaron que en el gluten las propiedades mecánicas, particularmente la resortividad y la cohesividad se asocian con la textura, la expansión y la forma desarrollada por los alvéolos en el producto terminado (Abang Zaidel *et al.*, 2008; Dobraszczyk y Salmanowicz, 2008).

1.2.2. Características del pan

La miga de pan tiene una estructura de espuma, que consta de una dispersión discreta de celdas de gas en una matriz continua constituida por proteínas y almidón. Los núcleos de gas se incorporan por la oclusión de aire durante el mezclado y se expanden a medida que se produce la fermentación.

Por otra parte, la gelatinización del almidón marca el punto de máxima expansión de las piezas y es fundamental a la hora de formar la textura final de la miga. El proceso de gelatinización del almidón durante el horneado depende de la cantidad de agua disponible y de las temperaturas alcanzadas. Así en las masas con poca disponibilidad de agua los fenómenos de gelatinización son limitados. En la miga de pan se producen estos fenómenos dado que las temperaturas de gelatinización se alcanzan lentamente y la disponibilidad de agua es elevada (Ribotta *et al.*, 2009). Durante la etapa de cocción se produce la ruptura de la matriz de almidón-proteína, dando como resultado la interconexión de las celdas de gas adyacentes y la generación de una estructura

esponjosa abierta de la miga. La estructura interna que aparece cuando se corta el pan y que consta de numerosos poros interconectados de diversos tamaños en una matriz continua, se llama también grano de la miga (Hayman *et al.*, 1998).

El conocimiento de la estructura del pan puede utilizarse para la predicción de algunos atributos sensoriales y de calidad, tales como textura y volumen del pan, y proporcionar información sobre el efecto de los ingredientes en la constitución de la estructura alveolar (Scanlon y Zghal, 2001; Brescia *et al.*, 2007; González-Barron y Butler, 2008; Ishida *et al.*, 2001; Kamman, 1970; Salmeenkalio-Marttila *et al.*, 2004). La estructura de la miga puede caracterizarse y cuantificarse mediante un sistema de análisis de imágenes (Scanlon y Zghal, 2001). Mientras que la microestructura de la miga puede observarse y caracterizarse por medio de microscopía electrónica de barrido (Lassoued *et al.*, 2007).

Algunas de las características del pan que contribuyen en la definición de preferencia por parte del consumidor son color, olor y textura. A su vez, el color depende de las características físico-químicas de la masa (contenido de agua, pH, azúcares reductores y aminoácido contenido) y de las condiciones aplicadas durante la cocción (temperatura, humedad relativa, los modos de transferencia de calor) (Esteller y Lannes, 2008). Uno de los atributos texturales más importante en el pan es la firmeza que está fuertemente correlacionada con la percepción de pan fresco por parte de los consumidores (Ahlborn *et al.*, 2005).

1.3. Panes funcionales: enriquecidos con fibras

El tipo de pan que se consume mayoritariamente en la dieta occidental es el pan blanco. Su aporte en fibras es escaso ya que representa sólo un 3% de la materia seca (Pointot *et al.*, 2010). Por esta razón se han desarrollado numerosos trabajos con el objetivo de mejorar la calidad nutricional de los panificados (Hager *et al.*, 2011; Morris y Morris, 2012; Peressini y Sensidoni, 2009; Pointot *et al.*, 2010). En particular, algunos autores encontraron que la adición de fibras genera cambios en las características de la masa (Sivam *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002; Laurikainen *et al.*, 1998) que afectan significativamente su comportamiento reológico (Bonnand-Ducasse *et al.*, 2010; Collar *et al.*, 2007; Hager *et al.*, 2011; Mirsaeedghazi *et al.*, 2008; Morris y Morris, 2012; Peressini y Sensidoni, 2009; Wang *et al.*, 2002; Sosulski y Wu, 1988). También, otros autores concluyeron que la sustitución de harina por fibra restringe la “maquinabilidad” de la masa y la expansión de las celdas de gas (Gan *et al.*, 1992).

Por otra parte, la adición de fibras en la formulación de pan puede causar un aumento en la absorción de agua debido a la interacción de los grupos hidroxilos de la fibra con el agua, mediante enlaces puente de hidrógeno. No obstante, el incremento en la absorción de agua en la mezcla es dependiente de la estructura particular de cada fibra (Wang, Rosell, y Benedito de Barber, 2002; Pomeranz *et al.*, 1997). En este sentido, se han desarrollado diferentes estudios para examinar el efecto de distintas fibras dietéticas sobre las propiedades reológicas de la masa y la calidad final de los panes resultantes (Ktenioudaki y Gallagher, 2012; Collar, Santos, y Rosell, 2007; Hager *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; Morris y Morris, 2012; O'Brien *et al.*, 2003; Peressini y Sensidoni, 2009; Poinot *et al.*, 2010; Praznik *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Krupa-Kozak *et al.*, 2012). Algunas fibras puede afectar negativamente las características del pan provocando una reducción del volumen, un aumento de la firmeza de la miga, además de desviaciones en el sabor (Wang *et al.*, 2002; Sangnark y Noomhorm 2004; Sudha *et al.*, 2007).

En particular, la inulina puede ser aplicada como sustituto de harina de cereales en productos de panadería (Praznik *et al.*, 2002), dado que es altamente palatable, no contienen compuestos de sabor amargo y posee propiedades texturizantes (Spiegel *et al.*, 1994; Franck, 2002). Se ha reportado la aplicación industrial de la inulina en panificados para sustituir la grasa vegetal en su formulación (Wang *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2003). Algunos investigadores observaron que la adición de inulina permite obtener una buena performance de la masa y aceptable calidad de los panificados de harina de trigo de calidad comercial (Hempel *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2002).

En su mayoría, los estudios realizados sobre panes enriquecidos con inulina, como fibras solubles, utilizaron inulina comercial de achicoria (Morris y Morris, 2012; Peressini y Sensidoni, 2009; Tudorica *et al.*, 2002). Praznik *et al.*, (2002) estudiaron algunas propiedades físicas y organolépticas de los panes enriquecidos con topinambur en polvo. Sin embargo, las propiedades reológicas de la masa y las propiedades físicas más importantes del pan (como son las propiedades mecánicas, color y grano de miga) no fueron estudiadas.

El objetivo específico de este trabajo fue analizar el efecto de la adición de inulina de topinambur sobre las propiedades reológicas de las masas y las características de calidad

de los panificados, en comparación con los elaborados sin inulina o con inulina comercial de achicoria.

El objetivo específico de este capítulo fue estudiar la adición de la inulina de topinambur en polvo (obtenida y caracterizada en este trabajo) a la harina de trigo para la elaboración de pan (en comparación con inulina comercial) y determinar el efecto sobre las propiedades reológicas de la masa y la calidad del pan, evaluado en términos de las propiedades físicas y sensoriales.

2. Materiales y Métodos

2.1. Caracterización de materia prima

2.1.1. Ingrediente funcional

Se utilizaron carbohidratos ricos en inulina (CRI) extraídos de tubérculos de topinambur (*H. tuberosus* L.) almacenados en frío durante 4 meses (descrito en el **Capítulo 2**) y que presentaron los mayores valores de score de actividad prebiótica (descrito en el **Capítulo 3**). El CRI en polvo con mayor valor de score de actividad prebiótica se llamó en esta Sección CRI-T y fue el seleccionado y utilizado en el desarrollo del presente Capítulo para la elaboración de pan de harina de trigo enriquecido en fibra soluble. También se utilizó inulina de achicoria GR fabricada por Beneo-Orafti (Bélgica), en adelante denominado CRI-A.

Los grados de polimerización medios (GPn) del CRI-T y el CRI-A fueron de 9,2 y 10, respectivamente. El contenido de inulina (pureza) de CRI-T fue de 90,8 g/100 g, mientras que la pureza de CRI-A fue de 94,2 g/100g. El score de actividad prebiótica de CRI-T y CRI-A fueron 0,30 y 0,17, respectivamente (resultados presentados en el **Capítulo 2**).

2.1.2. Harina

Se utilizó una harina de trigo comercial 000, sin aditivos provista gentilmente por Molinos Olavarría S.A. (Olavarría, Argentina). En la **Tabla 4.1** se presentan las características de la harina.

Determinación de Proteínas

El contenido de nitrógeno de las muestras se determinó por medio del macro método de Kjeldahl modificado para ácido bórico (método descrito en el **Capítulo 1**). El

porcentaje de proteína total se calculó como $N \times 5,7$ (Método 46-13, AACC Internacional 2000).

Humedad

El contenido de humedad se determinó por diferencia de pesada en 2 g de harina exactamente medidos antes y después de calentar en estufa a 130 °C a presión atmosférica normal, durante 2 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje de agua perdida (Método 44-19, AACC Internacional, 2000).

Cenizas

El contenido de cenizas se determinó por diferencia de pesada en 2 g de harina exactamente medidos, antes y después de calentar en mufla a 600 °C hasta masa constante (Método 08-03, AACC Internacional 2000).

Tabla 4.1. Características de la harina de trigo comercial utilizada en todos los ensayos.

Parámetros	
Proteínas (%)	9,26
Humedad (%)	14,57
Cenizas (%)	0,64
Ab (%)	60
TD (min)	5,0
E (min)	7,3
AFLO	85
FQN	85
P (mm)	146
P/L (mm)	4,35
W (Jx104)	211

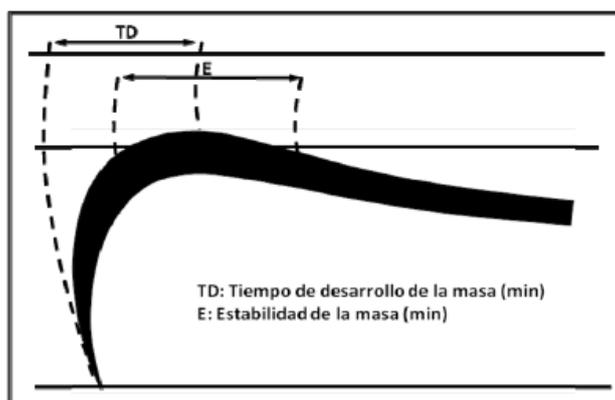
Farinograma: Ab= absorción farinográfica, TD= tiempo de desarrollo de la masa (minutos), E= estabilidad de la masa (minutos), AFLO= aflojamiento 12 minutos después del máximo, FQN= número de calidad. Alveograma: W= energía de deformación, P= tenacidad, P/L= relación tenacidad/extensibilidad.

Características reológicas de la harina

Se preparó una masa de harina y solución de cloruro de sodio (2,5%) con la que se obtuvieron cinco piezas en forma de disco. Transcurrido un período de reposo (20 min)

en cámara de fermentación a 25 °C, se insufló aire a cada una de las piezas desde el alveógrafo (Chopin, Francia). Se formó una burbuja de aire que extendió la masa hasta su ruptura. Se midió la presión dentro de la burbuja que se registró como la tenacidad o resistencia (P) en función de la extensibilidad (L), estos parámetros son indicadores de la capacidad de la masa para retener gas. Se determinaron los parámetros: P, L, P/L y la resistencia de la masa a la deformación a través del trabajo (W) (Método 54-30, AACC Internacional 2000).

Para evaluar el comportamiento de la masa durante el amasado se empleó un Farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Alemania). En una amasadora se incorporó una determinada cantidad de agua y harina y se amasó a velocidad constante registrando la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo, en función del tiempo. En primer lugar se determinó la capacidad de absorción de agua como la cantidad de agua necesaria para que la masa alcance una consistencia determinada (500 unidades Brabender).



Fuente: León *et al.*, (2007).

Figura 4.1. Diagrama de un farinograma característico.

Luego a partir del diagrama (**Figura 4.1**) se obtuvieron los siguientes parámetros relacionados con la aptitud industrial de la harina: el tiempo de desarrollo (TD) es el tiempo comprendido entre el inicio del amasado y el punto de la curva de máxima consistencia. La estabilidad (E) es el tiempo transcurrido entre el punto en el que la parte superior de la curva alcanza la línea de las 500 unidades Brabender (valor estandarizado de consistencia máxima) y el punto en el que la misma parte superior de la curva cruza nuevamente la línea de 500 unidades (Método 54-21, AACC Internacional, 2000).

2.2. Elaboración del pan

La formulación del pan contuvo harina (100 g), levadura seca (2 g), cloruro de sodio (2 g), sacarosa (0,8 g), aceite de girasol (2 mL), CRI-T o CRI-A (0, 2,5, o 5,0 g), y agua desmineralizada (58,8 mL) (cantidad óptima), determinada en base a la absorción farinográfica de agua. El mismo contenido de agua se utilizó para todas las muestras. Este criterio se aplicó en varios trabajos de panes enriquecidos en fibras (Poinot *et al.*, 2010; Praznik *et al.*, 2002; Sangnark y Noomhorm, 2004). La muestra sin CRI fue llamada control. Las muestras con 2,5 y 5,0 g de CRI-T/100 g de harina se llamaron T-2,5 y T-5,0, respectivamente. De la misma manera, las muestras con 2,5 y 5,0 g de CRI-A/100 g de harina fueron llamadas A-2,5 y A-5,0, respectivamente. La elección de estos niveles de CRI (2,5 y 5,0 g/100 g de harina) fue en base a los valores que se utilizaron en la mayoría de los estudios de panes enriquecidos con inulina (Collar *et al.*, 2007; Hager *et al.*, 2011; Mandala *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2003; Peressini y Sensidoni, 2009; Poinot *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002). La muestra control también se preparó sin levadura para las mediciones reológicas comparativas de la masa. La harina se tamizó tres veces (tamiz N° 70, 212 mm). Los ingredientes secos se añadieron a la mezcladora (HP4030, ATMA, Argentina), a excepción de la inulina que se suspendió previamente en agua destilada y se incorporó en el mezclador junto con el aceite. El programa consistió en una etapa de amasado durante 20 min, luego una de descanso durante 5 minutos, antes del redondeo y la etapa de fermentación por 30 min a 25 °C, seguido de la desgasificación y fermentación por otros 40 min a 25 °C. A continuación, la masa se retiró del mezclador y se dividió en tres piezas de 150 g que fueron degasificadas y arrolladas, para luego ser colocadas en moldes de acero, que a su vez se colocaron en una cámara de fermentación (MCH, Argentina) para la fermentación final durante 70 min a 38 °C y 90% HR. Una alícuota de la masa fue retirada para las mediciones reológicas. Los rollos fermentados se cocinaron durante 35 min a 200 ± 5 °C en un horno controlado termostáticamente (ORL-SD 755 PID/T, ORL Hornos Eléctricos SA, Argentina) y se colocó una bandeja de agua en el interior del horno para mantener la humedad del aire. Después del horneado, el pan se enfrió a temperatura ambiente durante 1 hora antes de realizar las mediciones correspondientes.

2.2.1. Reología de la masa

Las propiedades viscoelásticas de las muestras de masa se determinaron mediante mediciones dinámico-oscilatorias de pequeña deformación realizadas en un reómetro

Paar Physica modelo MCR301 (Anton Paar GmbH, Austria), utilizando una geometría de placas paralelas (50 mm de diámetro, 2 mm gap), con un controlador de temperatura Peltier. Inmediatamente después de amasar, una alícuota de la masa fue colocada en la placa inferior del reómetro, previamente acondicionado a 25 °C. La placa superior descendió sobre la muestra, se eliminó el exceso de muestra y la superficie expuesta fue cubierta con aceite de silicona para evitar la deshidratación de la muestra durante la medición. La muestra se dejó descansar 5 min para alcanzar el equilibrio térmico y la relajación de la masa. Seguidamente se realizó la prueba de barrido de frecuencia (ω) de 100 a 0,1 rad/s a 0,05% de deformación.

Los datos obtenidos fueron: el módulo elástico (G'), el módulo viscoso (G'') y la tangente de pérdida ($\tan \delta = G''/G'$). Inmediatamente después de la primera medición, se llevó a cabo el barrido de deformación (γ) a una amplitud de 0,01 a 100%, a 10 rad/s para verificar que la medición estuviera dentro de la región viscoelástica lineal (RVL). Cada muestra de masa se midió al menos por triplicado, utilizando una muestra fresca en cada medición. Se realizaron mediciones adicionales (bajo las mismas condiciones) en las masas control sin levadura con el fin de determinar si la levadura (y una eventual levación de la masa durante la medición) tuvo un efecto significativo sobre los resultados reológicos.

2.3. Caracterización de los panificados

2.3.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad de la miga de pan se determinó mediante una estufa de secado durante 12 horas a 80 °C, bajo vacío. Para cada medición, se tomaron 5 g de miga de las rebanadas centrales de la barra de pan. Los datos se presentaron como la media de tres mediciones, realizadas sobre un pan recién hecho y frío.

2.3.2. Contenido de cenizas

Descrito en el **Capítulo 1**

2.3.3. Medición del volumen específico de pan (VE)

Para determinar el volumen específico, cada barra de pan se pesó y se determinó su volumen por el método de desplazamiento de las semillas de colza (AACC, 2000). Los datos fueron reportados como las medias de tres mediciones, cada una realizada sobre una barra de pan fresco.

2.3.4. Color

Se midió el color de la corteza y de la miga de pan en un Colorímetro HunterLab UltraScan XE triestímulo (Hunter Associates Laboratory, Inc., Reston, VA). Se determinó el color reflejado (componente especular excluido) a un ángulo de observación de 10, con un iluminante D65. Se utilizaron tres muestras de barras de pan, sobre las que se realizaron cinco mediciones de color de la corteza y ocho de la miga. Los resultados se expresaron en la escala CIE $L^*a^*b^*$ siendo los parámetros, L^* [claridad: 0 = negro, 100 = blanco], a^* [verdor (-), enrojecimiento (+)] y b^* [azulado (-), amarillez (+)]

2.3.5. Estudio de textura

Las propiedades mecánicas de las migas de pan se obtuvieron con un analizador de textura TA-Plus (Lloyds Instruments, UK) (**Figura 4.2**). Para dicho análisis se cortaron dos rebanadas de 20 mm de espesor de cada barra de pan. Luego, se realizaron seis mediciones para la miga de pan de cada muestra (3 panes x 2 rebanadas). La prueba de TPA consta de dos ciclos de compresión, para cada medición se comprimió dos veces en el centro de una rebanada de pan con una sonda cilíndrica (25 mm de diámetro), con una extensión de 10 mm (50% de tensión), utilizando una velocidad de descenso de 1 mm/s. Este ensayo, no fue un ensayo de compresión en sentido estricto, ya que la rebanada de pan fue de mayor tamaño que el cilindro de la sonda, sino que fue un ensayo de hundimiento o hendidura (Liu y Scanlon, 2004).

De cada curva de fuerza-tiempo de la prueba de TPA pueden extraerse una serie de parámetros texturales que se correlacionan fuertemente con la evaluación sensorial de los mismos parámetros (Bourne, 2002). La dureza se obtiene como el pico máximo de fuerza durante el primer ciclo de compresión ($H = f_{\max}$) (Bourne, 1978) y se definió como la fuerza necesaria para alcanzar una deformación dada (llamada también firmeza). En el análisis sensorial es la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares en la primera masticación. La fracturabilidad se obtuvo como la fuerza en la primera ruptura significativa del primer ciclo de compresión ($F = f_{\text{fractura}}$). Se definió como una medida de la facilidad con la que un material se fractura (llamado también fragilidad).

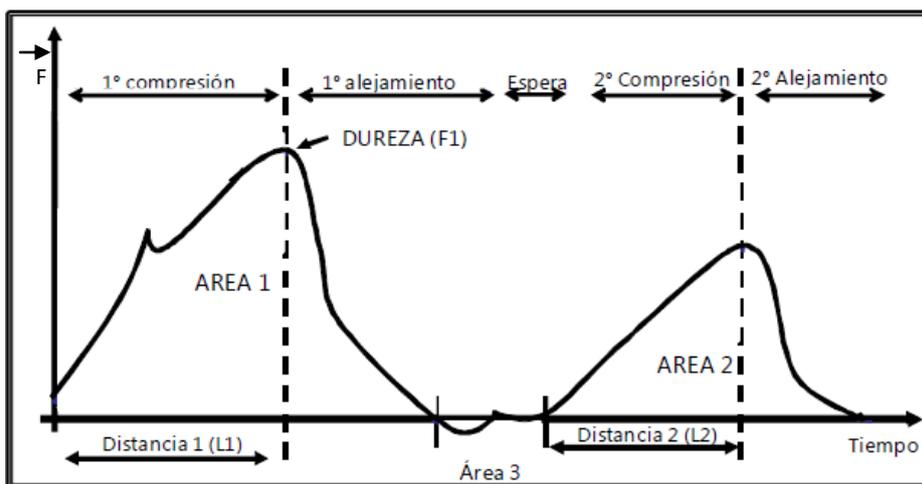


Figura 4.2. Curva característica de Análisis de Perfil de Textura (TPA). F1 (Pico máximo de la primera compresión)= Dureza; Área 2/Área 1 (A_2/A_1)= Cohesividad; Distancia 2/Distancia 1 (L_2/L_1)= Resortividad; $F1 \times A_2/A_1 \times L_2/L_1$ (Dureza x cohesividad x resortividad)= Masticabilidad.

La cohesión se calculó como la relación entre el área positiva de la curva de fuerza durante el segundo ciclo de compresión y el área del primer ciclo de compresión ($C = A_2/A_1$). Representa la fuerza de los enlaces internos que componen la estructura del producto y es inversamente proporcional a la velocidad a la que se fractura el material bajo la acción mecánica. En otras palabras, cuanto menor es la cohesión de un material, más fragilidad presenta. La resortividad se calculó como la relación de la distancia recorrida durante el segundo ciclo de compresión y el primero ($R = L_2/L_1$). Este parámetro se relaciona con la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre el final de la primera mordida y el inicio de la segunda mordida (Bourne, 1978), y representa la velocidad a la que un material deformado retorna a su condición previo a ser deformado, después de retirar la fuerza que lo deforma (originalmente se llamaba elasticidad). La masticabilidad se calculó como el producto de la dureza x cohesión x resortividad ($M = C \times D \times R$), y representa la energía requerida para masticar un alimento sólido hasta alcanzar el estado de deglución (Civille y Szczesniak, 1973).

2.3.6. Análisis digital de imágenes de la estructura de la miga

La estructura de la miga se evalúa a través de la medida del tamaño de los alvéolos, mediante el análisis de imágenes de la miga de pan. La imagen original se transformó a

escala de grises (**Figura 4.3**) que se fragmentó por medio de la selección de un umbral de gris y generó una imagen binaria óptima. Así, todos los píxeles con un nivel de gris por encima del valor umbral fueron convertidos al blanco (miga de pan) y por debajo de este valor, se convirtió en negro (alvéolos), conservando los rasgos fundamentales de la contraparte monocromática (Sapirstein *et al.*, 1994, Tan *et al.*, 1997).

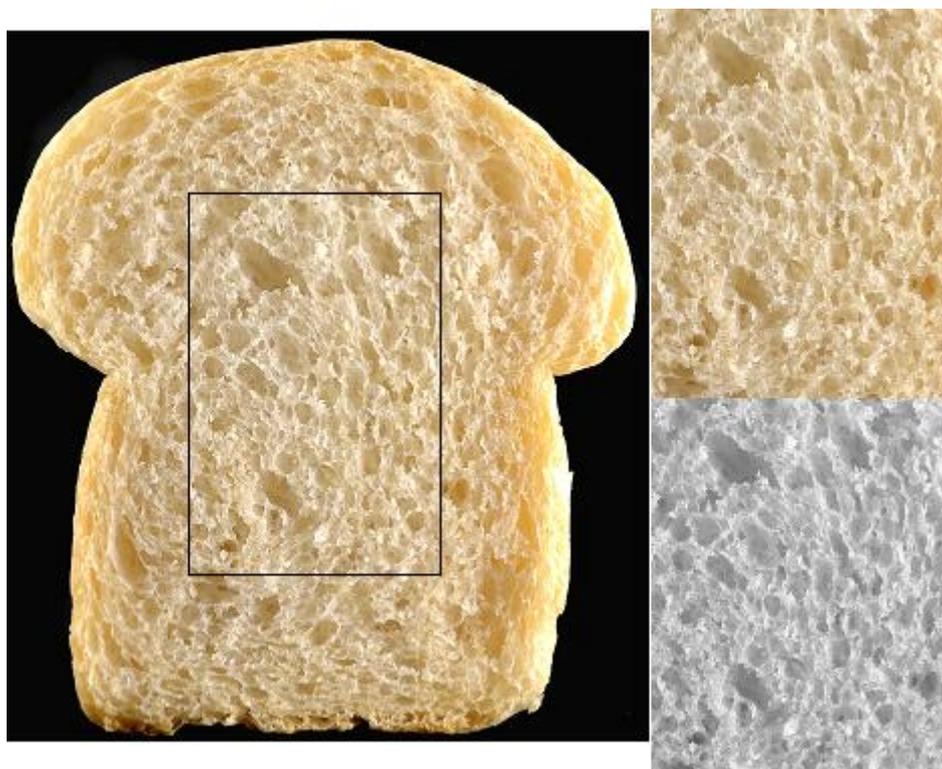


Figura 4.3. Fotografía de una rodaja de pan, con el área seleccionada para el análisis digital de la microestructura. A su lado el área seleccionada transformada a escala de grises.

Para analizar la estructura de la miga se cortaron dos rebanadas verticales y centrales (12 mm de espesor) de cada barra de pan y se colocaron en una caja iluminada. Las imágenes en color se capturaron con una cámara digital Nikon D3100 (35 mm, 1/8, f/5, ISO 100), con una resolución de 300 píxeles por pulgada. Las imágenes digitales de las migas se analizaron con el software ImageJ 1,47 v (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.). De cada imagen (rebanada) se recortó del sector central el área de un cuadrado de 40 mm x 40 mm y se convirtió a 8 bits con niveles de gris que van de 0 a 255. Las imágenes fueron binarizadas, usando un método de medida de

umbralización difusa automatizada para diferenciar lo que es celda de gas de lo que no lo es, como se describió previamente. Este método de selección del valor umbral representó mejor los rasgos fundamentales de las imágenes que la selección de un valor de umbral único e igual para todas las imágenes, debido a que existen pequeñas diferencias en los fondos de cada imagen.

A partir de dichas imágenes binarizadas se extrajeron distintas características de la miga y se seleccionaron para el análisis las siguientes: densidad de celdas (celdas/cm²), área media de la celda (mm²), polidispersión de las áreas de las celdas y relación de área de celda/área total o fracción de poros (%), que es el porcentaje del área total que corresponde al área ocupada por alveolos.

La polidispersión del área de las celdas se calculó como la relación entre la desviación estándar y el valor medio de la distribución de áreas de las celdas de cada muestra ($P_A = \sigma_A/A$) y se consideró que es inversamente proporcional a la uniformidad del grano de la miga, es decir cuanto menor fue el valor de la P_A más uniforme fue el tamaño de celda. Cabe señalar que cuando se realizó la medición del área de la celda en la rebanada de pan, debió considerarse que en la rebanada sólo una pequeña proporción de celdas son atravesadas por la sección de diámetro mayor y que las celdas más grandes son más probables de ser cortadas que las más pequeñas (Crowley, Grau, y Arendt, 2000).

2.3.7. Análisis de imágenes por Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Los panes elaborados (pan control, T-2,5, A-2,5) fueron cortados en rodajas (de 12 mm de espesor, sin dañar la estructura) y liofilizados. Dichas muestras se montaron sobre una cinta de carbono de doble cara colocada sobre el soporte (*stap*). Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (EVOMA10, Carl Zeiss SMT Ltd., UK) que operó a 20Kv a presión variable de entre 60 y 80 Pa, para visualizar la microestructura de la miga de los panes liofilizados mediante imágenes, en un rango de magnificaciones entre 19 y 274 X y se seleccionaron las imágenes más representativas.

2.3.8. Propiedades organolépticas

En base a los resultados experimentales y a la calidad general de los panes obtenidos, la evaluación sensorial se realizó sólo en los panes enriquecidos con 2,5 g de CRI de ambas fibras (muestras T-2,5 y A-2,5), y sin inulina (muestra control). Un total de 138 panelistas no entrenados (hombres y mujeres) participaron en el estudio. Se sirvieron a cada panelista tres rebanadas de pan (una de cada muestra) codificadas y

presentadas en orden aleatorio, se ofreció a los panelistas agua potable para limpiar el paladar entre la degustación de cada muestra. Se solicitó a los panelistas que evalúen cada muestra en cuanto a los siguientes atributos sensoriales: olor, gusto, esponjosidad (definida como porosidad), color de la miga y textura de la miga. Se les pidió que anotara cada atributo en una escala hedónica de 9 puntos (1 = disgusto, 5 = ni agrado o desagrado, 9 = gusta mucho). Además, a cada consumidor se le hizo una encuesta de tres preguntas. En el Anexo al final de este Capítulo puede verse la planilla entregada a cada consumidor. El diseño estadístico para analizar los resultados sensoriales fue en bloques completos aleatorizados, donde cada panelista se consideró un bloque.

2.4. Datos obtenidos y Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron en un diseño completamente aleatorizado. Para cada ensayo, las diferencias estadísticas se determinaron por análisis de la varianza (ANOVA) seguido de las comparaciones entre las medias con la prueba de Tukey, al nivel de significación del 5%, utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

3. Resultados y Discusión

3.1. Estudios Reológicos en la masa de pan: Ensayos dinámico- oscilatorios de baja deformación

Se estudió el efecto de la adición de los CRI a la harina de trigo mediante el análisis de las propiedades viscoelásticas de las masas. Los resultados de todos los análisis indicaron que el módulo elástico (G') representó mejor el comportamiento reológico de la masa durante la fermentación y la cocción, en comparación con el módulo viscoso (G'') y el ángulo de fase ($\tan \delta$), dado que el G' mostró una mayor correlación con las propiedades del pan, como se describe en las siguientes secciones. En todos los casos, G' (**Figura 4.4**) aumentó con la frecuencia angular (ω), y G' fue mayor que G'' (excepto a muy bajas frecuencias), lo que indica un comportamiento predominantemente sólido de las masas. Esto podría deberse a una mayor participación de las interacciones hidrofóbicas y estaría indicando la formación de una red elástica donde también los puentes hidrógeno contribuyen a la elasticidad de la matriz (Shewry *et.al.*, 2000).

Las mediciones en las masas de la muestra control sin levadura mostraron (**Figura 4.4**) un aumento de G' con la frecuencia angular (aumento lineal en un gráfico log-log) en

toda la gama de frecuencias, mientras que todas las otras muestras de masas con levadura mostraron desviaciones negativas de este comportamiento para $\omega < 4$ rad/s, que fueron atribuidas al levado de la masa durante las mediciones. Cabe destacar que se realizaron barridos de frecuencia de 100 a 0,1 rad/s, por lo que las desviaciones se produjeron en las últimas etapas de medición. Estas desviaciones negativas se han atribuido a la disminución de la densidad de masa debido al volumen de gas producto de la evolución de la fermentación, causando una disminución de los módulos y de la viscosidad (Dobraszczyk y Morgenstern, 2003). No obstante, los valores de G' de la muestra control con y sin levadura exhibieron valores similares a frecuencias mayores a 3-4 rad/s. En consecuencia, los resultados obtenidos para masas con levadura (**Figura 4.4**) se consideran válidos para $\omega > 4$ rad/s, donde el $\log G'$ aumentó linealmente con $\log \omega$. En esta región (4-100 rad/s), se ajustaron los datos experimentales de las cinco muestras con levadura con el modelo de ley de potencia (líneas continuas). Dichos ajustes se extrapolaron a la región no lineal (0,1 -4 rad/s, líneas de puntos) para mostrar las desviaciones debidas a la fermentación de la masa.

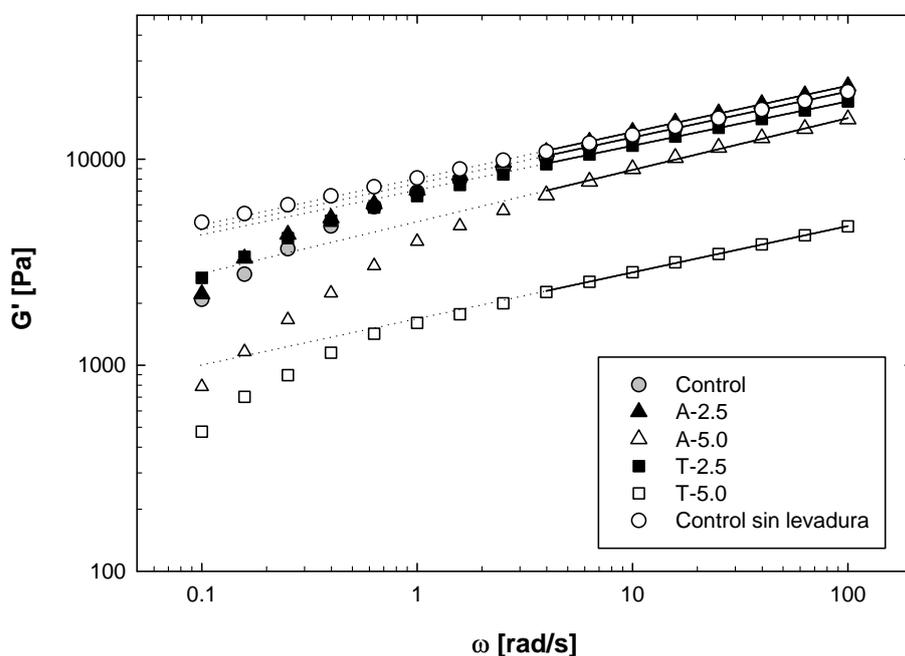


Figura 4.4. Módulo de almacenamiento frente a la frecuencia angular de masas de harina de trigo enriquecidas con diferentes tipos y concentraciones de inulina. Los datos experimentales a $\omega \geq 4$ rad/s fueron ajustados mediante la ley de potencia (líneas sólidas), que fue extrapolada a frecuencias más bajas (líneas punteadas).

Los valores de G' a $\omega = 10$ rad/s (dentro de la región lineal) fueron tenidos en cuenta con el fin de comparar las muestras. Generalmente, los valores más altos de G' indican un mayor carácter sólido del material; lo que puede estar relacionado con masas más consistentes. Se puede observar que el G' disminuyó en el siguiente orden: A-2,5, Control, T- 2,5 > A-5,0 > T-5,0 (**Figura 4.4**). Esto significa que: (a) la adición de 2,5 g de CRI (A o T) a 100 g de harina no tuvo efecto significativo en la reología de la masa; (b) la adición de 5,0 g de cualquiera de los CRI tuvo un efecto de debilitamiento sobre la masa de trigo, y este efecto fue más fuerte en el caso de CRI-T.

Así, las masas con los mayores contenidos de inulina exhibieron un comportamiento con menor carácter sólido o más débil de la masa, que puede deberse a la interrupción de la red de gluten por parte de las fibras solubles, interfiriendo así en la interacción proteína- proteína. También el efecto del debilitamiento de la fuerza de la masa puede deberse al reemplazo del almidón por inulina en la matriz de gluten. Algunos autores concluyeron que el efecto causado sobre la red de gluten por parte de la fibra soluble se manifiesta en un resultado negativo sobre el comportamiento viscoelástico de la masa, su maquinabilidad y capacidad de gasificación (Collar *et al.*, 2007; Morris y Morris, 2012). En este sentido, otros autores mencionaron que la maquinabilidad de la masa con fibra y la calidad del producto final obtenido fueron ligeramente inferiores a las muestras control (Brasil *et al.*, 2011; Karolini-Skaradzinska *et al.*, 2007). En tanto, Wang *et al.* (2002) informaron una disminución en la elasticidad de la masa con adición de 3% de inulina de achicoria, determinada por ensayos farinográficos. Mientras que otros autores concluyeron que la adición de inulina de achicoria Fibrulina (1-5%) no tuvo un efecto sobre la extensibilidad, pegajosidad, y adhesividad de la masa, determinado por ensayos TPA (Collar *et al.*, 2007).

Otros estudios sobre el efecto de la inulina en las propiedades reológicas de las masas de trigo mostraron diferentes tendencias, y sus resultados no fueron concluyentes. Polaki *et al.*, (2010) indicaron que la matriz de gluten presentó buen desarrollo en masa enriquecidas con fibra soluble. En contraste con los resultados obtenidos, Peressini y Sensidoni (2009) encontraron que el G' aumentó con el aumento de los niveles de inulina, y que este efecto se acentuó con el aumento del grado de polimerización de la inulina.

Todas las muestras presentaron un aumento gradual de G'' con la frecuencia de deformación angular (ω) (**Figura 4.5**). Los valores G'' de la muestra control con y sin levadura exhibieron valores similares durante todo el barrido de frecuencia de 100 a

0,1 rad/s. Se puede observar que el G'' disminuyó en el siguiente orden: A-2,5, Control y T- 2,5, que presentaron valores similares, seguidos de A-5,0 y T-5,0. Esto vuelve a poner en evidencia que la adición de 2,5 g de CRI (-A o -T) a 100 g de harina no tuvo efecto significativo en las propiedades viscoelásticas de la masa. En tanto, la adición de 5,0 g/100 g de CRI-T tuvo efecto significativo sobre el módulo viscoso de la masa de trigo, y este efecto fue menos intenso en la muestra con 5,0 g/100 g de CRI-A. Estas diferencias entre los G'' de las masas con ambos CRI podrían deberse a la diferencia en el GPn de ambas inulinas (CRI-A mayor que CRI-T).

A su vez, el módulo viscoso de las masas disminuyó al aumentar la dosis de cada CRI. En acuerdo con estos resultados, Juszczak *et al.*, (2011) encontraron este mismo comportamiento en formulaciones de panes libres de gluten enriquecidos con fibra. En contraste con los resultados obtenidos, Peressini y Sensidoni (2009) encontraron que el G'' aumentó con el aumento de los niveles de inulina, y que este efecto se acentuó con el aumento del grado de polimerización de la inulina.

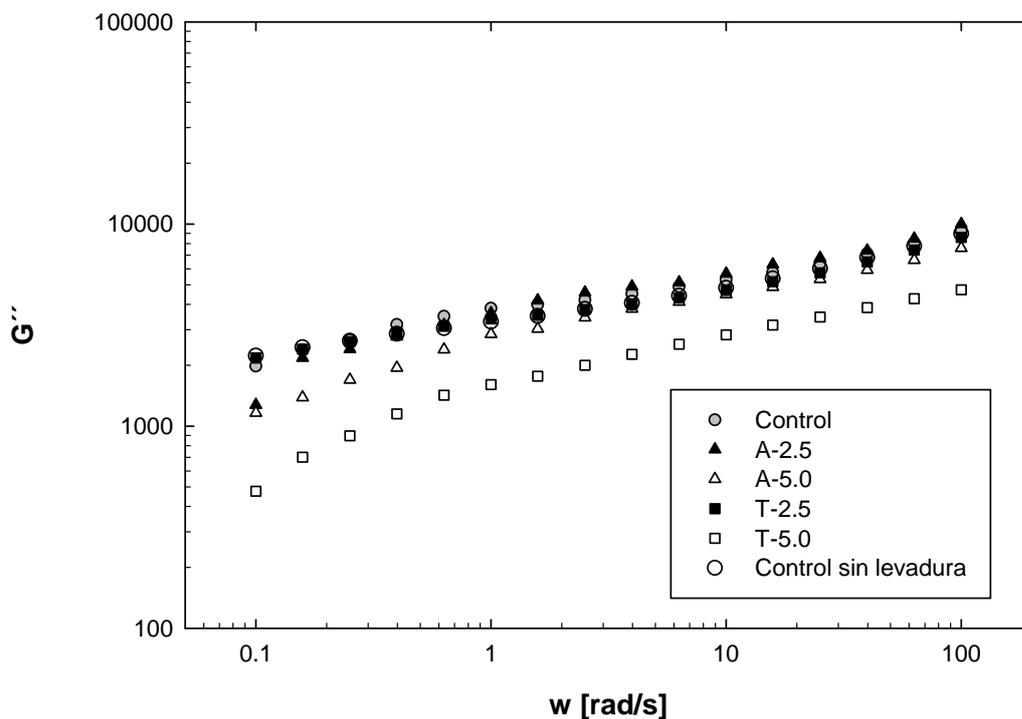


Figura 4.5. Módulo de pérdida frente a la frecuencia angular de masas de harina de trigo enriquecidas con diferentes tipos y concentraciones de inulina.

La **Figura 4.6** muestra el ángulo de desfase ($\tan \delta$) en función de la frecuencia angular. Se observa que la $\tan \delta$ disminuyó con la adición de 2,5 g de CRI, y aumentó con el agregado de 5,0 g de CRI de inulina (respecto al Control), y este efecto se acentuó con el aumento del grado de polimerización de la inulina. Es decir, los valores de $\tan \delta$ de las masas con CRI-A (inulina de alto GP) fueron más altos que en las de CRI-T, independientemente de la dosis utilizada en la formulación. A su vez la $\tan \delta$ disminuyó con la frecuencia angular. Los valores de $\tan \delta$ de las masas analizadas estuvieron en un rango entre 0,8 y 1,5. Juszczak *et al.*, (2011), también encontraron que en las masas libres de gluten y enriquecidas con fibra, a mayor dosis de fibra mayores valores de $\tan \delta$. En contraste con los resultados obtenidos, Peressini y Sensidoni (2009) encontraron una disminución en los valores de la $\tan \delta$ con aumentos de los niveles de inulina, y este efecto se acentuó con el aumento del grado de polimerización de la inulina.

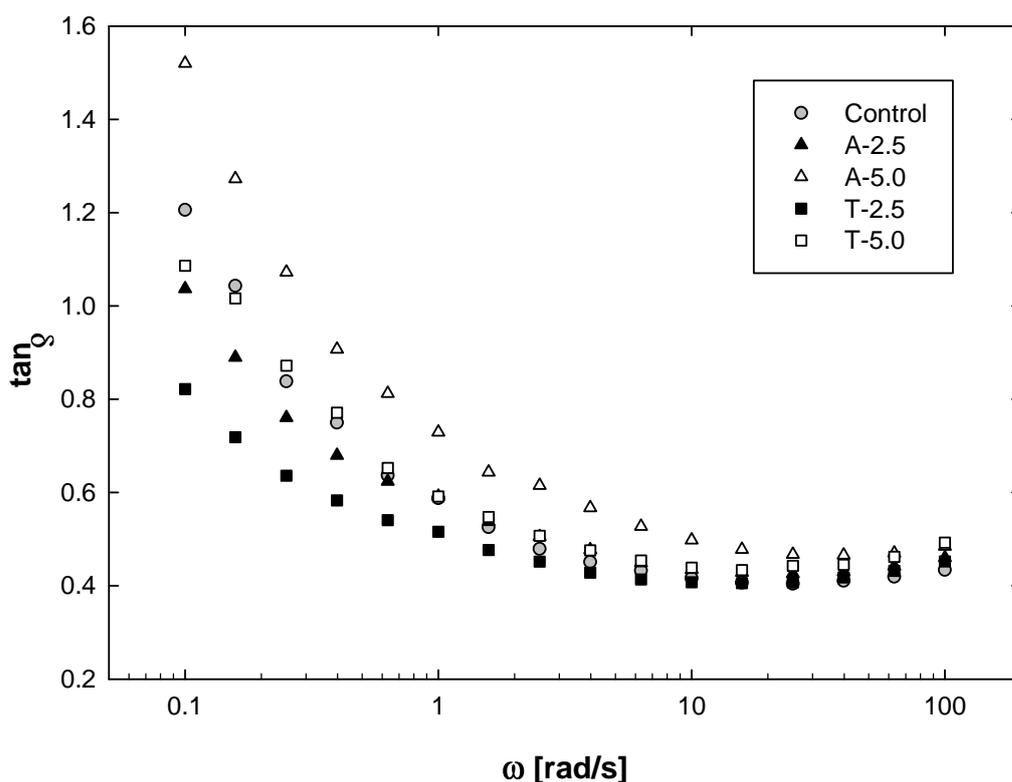


Figura 4.6. Tangente de módulo de pérdida frente a la frecuencia angular de masas de harina de trigo enriquecidas con diferentes tipos y concentraciones de inulina.

En tanto Hager *et al.* (2011) informaron que la adición de 6,8% de inulina no tenía efecto significativo sobre la tangente de pérdida de las masas y que en todos los casos los valores $\tan \delta$ fueron < 1 .

3.2. Caracterización y propiedades del pan

3.2.1. Volumen y humedad

El contenido de humedad final del pan depende de la absorción de agua durante la preparación de la masa y la pérdida de agua durante la cocción. A su vez, se ha sugerido que la morfología de la miga afecta fuertemente la tasa de transporte de agua (Krupa-Kozak, *et al.*, 2012).

La **Tabla 4.2** presenta los contenidos de humedad de la miga de los panes control y enriquecidos con inulina. Se observa que la adición de CRI no tuvo efecto significativo en el contenido de humedad (H) en comparación con la muestra de control. Sin embargo, la muestra T-5,0 por simple observación presentó un aspecto de pan más húmedo. Dicha muestra presentó también la menor relación celda/superficie total (fracción de poros) (**Tabla 4.4**). Lo cual probablemente desaceleró la migración y la pérdida de humedad durante el horneado. Por otro lado, la inulina es altamente higroscópica (Gennaro, Abedul, Parke, y Stancher, 2000) y posee zonas de unión que encierran grandes contenidos de agua. Esto reduce la liberación del agua de la matriz y la accesibilidad del agua por parte de otros constituyentes de masa (Hager *et al.*, 2011).

Tabla 4.2. Efecto de la adición de inulina en polvo (0, 2,5 y 5,0 g/100 g de harina de trigo) sobre las propiedades físicas del pan.

Muestra	Humedad (%)	Volumen Específico (cm ³ /g)
Control	39,55 ± 1,43 ab	5,20 ± 0,10 b
T-2.5	38,13 ± 2,41 a	4,75 ± 0,26 b
A-2.5	40,91 ± 2,14 ab	4,79 ± 0,30 b
T-5.0	43,34 ± 0,12 b	3,19 ± 0,15 a
A-5.0	40,22 ± 2,45 ab	4,66 ± 0,25 b

Medias con letra común dentro de una columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

El volumen final del pan depende de la expansión de la masa durante la fermentación y la cocción, como también de la capacidad de la matriz para estabilizar el gas retenido.

La **Tabla 4.2** muestra el volumen específico (VE) para las muestras con CRI y control. Se observa que la adición de CRI produjo una disminución del VE de los panes en el siguiente orden: Control, A-2,5, T-2,5, A-5,0 > T-5,0. Esto significa que VE disminuyó a concentraciones crecientes de CRI, y a su vez CRI-T tuvo un efecto más marcado que el CRI-A. De acuerdo al test de Tukey, la única muestra significativamente diferente fue la de pan T-5,0, que fue extraordinariamente plana (**Figura 4.8f**), lo cual puede visualizarse en **Figura 4.7** donde se presenta el índice de volumen específico (IVE) calculado como el porcentaje de VE del pan control para cada muestra.

La disminución en el volumen de pan con la adición de inulina se atribuyó al efecto de dilución por parte de las fibras solubles, mencionado previamente, que afectan la capacidad de retención de gas (debido a la interacción con la red de gluten), al mismo tiempo que no aumenta la producción de gas, resultando en una estructura alterada (Mandala *et al.*, 2009; Morris y Morris, 2012). Además, estos resultados de VE parecen correlacionarse con los datos reológicos de las masas (**Figura 4.4**, **Figura 4.5** y **Figura 4.6**), dado que la disminución en el módulo elástico de las masas a la concentración más alta de CRI para ambas fibras fue coincidente con la disminución del VE de los panes (no significativa en el caso de A-5,0), mientras que no hubo efecto significativo en ambos parámetros a baja concentración de CRI de ambas fibras.

El efecto de la adición de inulina en polvo a la harina de trigo sobre el volumen del pan y la humedad se han estudiado por varios autores. En general, se encontró que la adición de inulina produjo una disminución de la humedad del pan (Hager *et al.*, 2011; Peressini y Sensidoni, 2009; Wang *et al.*, 2002). Sin embargo en otros estudios informaron que no hubo efecto significativo (Praznik *et al.*, 2002).

De acuerdo con nuestros resultados, la mayoría de las investigaciones (Mandala *et al.*, 2009; Meyer y Peters, 2009; Poinot *et al.*, 2010; Gómez *et al.*, 2003; Sangnark y Noomhorn, 2004; O'Brien *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002) encontraron una disminución en el volumen del pan con la adición de inulina. Por otra parte, Peressini y Sensidoni (2009) informaron que la adición de inulina ST (GPn = 10) dio como resultado ya sea una disminución o un aumento en el volumen específico, dependiendo del tipo de harina.

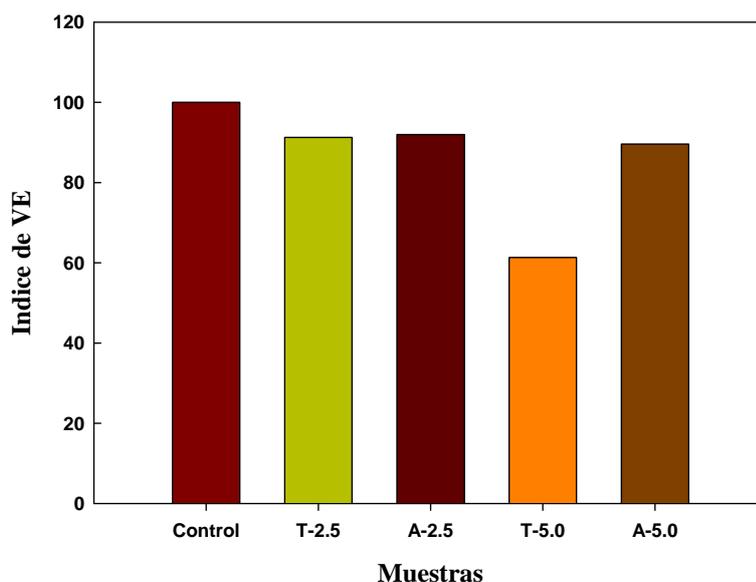


Figura 4.7. Índice del volumen específico en los panes control; T-2,5; A-2,5; T-5,0; A-5,0.

En cuanto al efecto de la longitud de la cadena de inulina en el volumen de pan, nuestros resultados mostraron que CRI-T ($GP_n = 9,2$) tuvo un mayor efecto (negativo) que el CRI-A ($GP_n \geq 10$). Por el contrario, Meyer y Peters (2009) encontraron que el aumento del GP de la inulina tuvo mayor impacto en la reducción del volumen del pan, dado que la fibra de mayor tamaño (GP mayor) interrumpe o daña la red de gluten en mayor medida, lo cual conduciría a una mayor disminución del volumen por la menor capacidad de retención de gas dentro de la estructura (Wang *et al.*, 2002; Laurikainen *et al.*, 1998; Pomeranz *et al.*, 1997). Dado que los resultados son opuestos, es posible que el VE de pan no dependa solamente del GP de la inulina. Así, la discrepancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, podría deberse a que el GP_n no sea la única característica de las inulinas que afecte a las propiedades de los panes (pureza, otros componentes presentes en el polvo, etc).

3.2.2. Color

El color de la miga de pan y la corteza se midió en una escala de color CIE $L^*a^*b^*$ y los valores se indican en la **Tabla 4.3**. Los CRI tuvieron un efecto significativo tanto en el color de la miga como en el de la corteza.

Tabla 4.3. Efecto de la adición de inulina en polvo (0, 2,5 y 5,0 g/100 g de harina de trigo) sobre el color de la miga y la corteza.

Muestra	Miga			Corteza		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Control	71,22 ± 1,59 c	0,37 ± 0,06 a	19,35 ± 1,88 a	78,85 ± 0,60 b	2,56 ± 0,39 c	25,45 ± 1,33 c
CRI-T 2,5%	70,79 ± 1,05 bc	0,44 ± 0,21 b	20,87 ± 0,56 b	80,49 ± 0,53 c	1,64 ± 0,17 b	21,74 ± 0,75 b
CRI-A 2,5%	71,49 ± 1,15 c	0,45 ± 0,19 b	20,83 ± 0,41 b	81,22 ± 0,79 c	1,90 ± 0,53 b	22,45 ± 1,80 b
CRI-T 5,0%	61,51 ± 2,05 a	1,47 ± 0,20 d	21,81 ± 0,85 c	69,53 ± 1,61 a	0,62 ± 0,12 a	16,92 ± 0,70 a
CRI-A 5,0%	69,94 ± 1,09 b	0,88 ± 0,25 c	20,45 ± 0,47 b	79,50 ± 1,05 b	2,89 ± 0,96 c	24,91 ± 1,24 c

Medias con letra común dentro de una columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los parámetros de color no mostraron una tendencia clara, excepto en la miga donde el enrojecimiento aumentó al aumentar la concentración de CRI. Para todos los parámetros, el color de la muestra T-5,0 fue significativamente diferente del resto de las muestras. La miga de pan T-5,0 fue la más oscura, la más roja y más amarilla (en oposición a la muestra control). Gómez *et al.*, (2003) también encontraron tonalidades rojas en la miga de pan enriquecido con fibras solubles y también encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el grado de amarilleo (valor b^*) tanto en la miga como en la corteza de entre las diferentes formulaciones. En el presente estudio, la corteza del pan T-5,0 fue la más oscura, y la de menor intensidad de rojo y de amarillo.

Otros autores también estudiaron el efecto de la adición de inulina sobre el color de la corteza y la miga de pan pero no encontraron diferencias en el color. En contraste con los resultados obtenidos, Park *et al.* (1997) reportaron que el pan con fibra soluble resultó en un color más pálido que el control y atribuyó este hecho al aumento del contenido de humedad del pan con fibras, que produce un retardo en el pardeamiento por dilución de azúcar y aminoácido. Mientras que Hager *et al.* (2011) encontraron que la inulina generó un oscurecimiento de la corteza del pan (L^* inferior) y lo atribuyó a la ruptura parcial de la inulina a mono y polisacáridos, lo que lleva a una reacción de Maillard más intensa. También Poinot *et al.* (2010) reportaron un incremento de la coloración de la corteza del pan (mayores valores de a^* y b^*) en panes enriquecidos con inulina.

Juszczak *et al.* (2012) mencionaron que la coloración del pan depende de la presencia de azúcares de bajo peso molecular, del GP y de la dosis de inulina en la formulación. En este sentido, Morris y Morris (2012) informaron que la utilización de inulina y FOS en panificados generó una corteza más oscura producto de la reacción característica de

Maillard promovida por el mayor número de extremos reductores. Gómez *et al.* (2003) mencionaron que el color de la corteza está asociado también a reacciones de caramelización y que el color original de la fibra no tiene influencia sobre el color de la miga. En tanto, Mandala *et al.* (2009) no observaron efectos significativos de la adición de inulina sobre el color de la corteza del pan.

Por su parte, Peressini y Sensidoni (2009) encontraron que el diferencial del color (ΔE^*) de la corteza aumentó con el aumento de la concentración de fibras y este aumento fue mayor (coloración más oscura) cuanto menor GP tenía la inulina.

3.2.3. Características de la estructura de la miga

El grano de la miga ha sido definido como la estructura expuesta de las celdas de la miga cuando se corta una barra de pan. Las imágenes del grano de la miga de panes enriquecidos en fibra se muestran en la **Figura 4.8** como una ilustración del proceso de digitalización de imágenes. La **Figura 4.8b** muestra una imagen binarizada del área seleccionada de la miga de pan control.

Las características del grano de la miga obtenidas del análisis de imágenes digitalizadas se muestran en la **Tabla 4.4**. Los resultados del ANOVA indicaron que el enriquecimiento del pan con CRI tuvo un efecto significativo sobre las características del grano de las migas estudiadas. La adición de 5,0 g de CRI-A a 100 g de harina dio la miga con menor área alveolar promedio (diferencia significativa) (**Figura 4.8e**) y mayor densidad de celdas (diferencia no significativa). Por el contrario, la adición de 5,0 g de CRI-T dio la miga (**Figura 4.8f**) con la mayor área media de celdas (diferencia no significativa), y la densidad de celdas más baja (diferencia significativa). Es decir, las migas con A-5,0 y T- 5,0 presentaron las estructuras más finas y más gruesas, respectivamente.

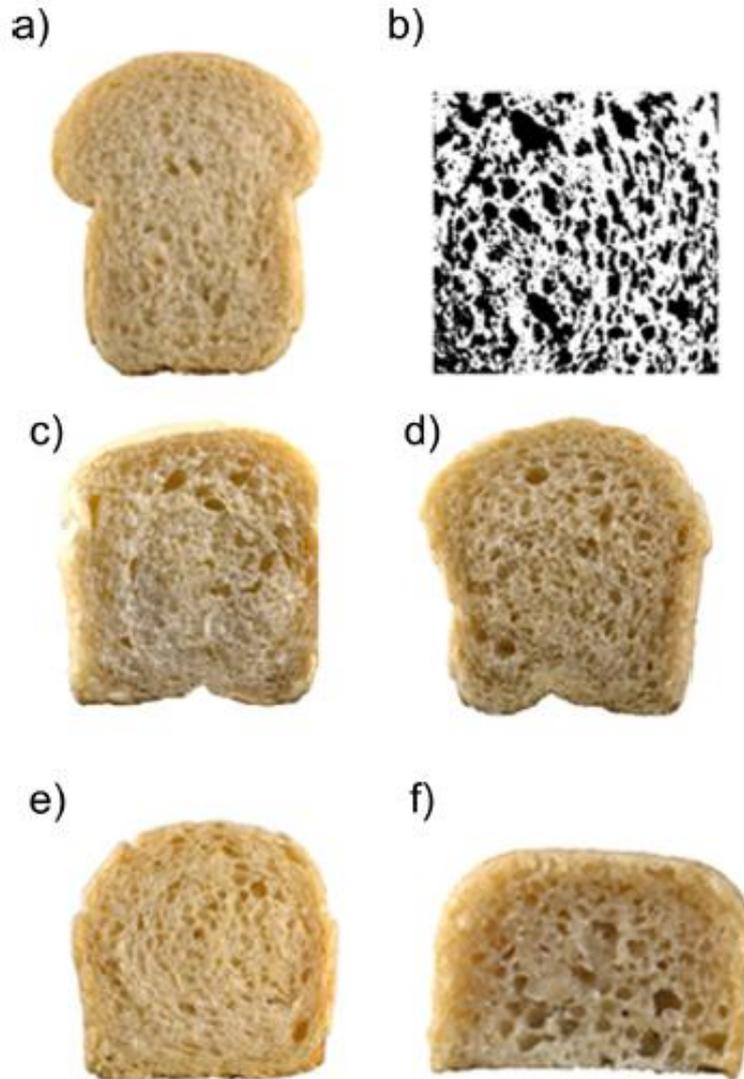


Figura 4.8. Migas de pan enriquecidas con diferentes tipos y concentraciones de inulina: Control (a); y su imagen binarizada (b); A-2,5 (c), T-2,5 (d); A-5,0 (e); T-5,0 (f).

La adición de 2,5 g de cualquiera de los CRI (**Figura 4.8c y d**) no tuvo efecto significativo sobre estas dos propiedades mencionadas, pero dio los mayores valores de polidispersidad (PA) de las áreas de las celdas, lo que significa que los granos de estas migas tuvieron la menor uniformidad. En contraste, la adición de 5,0 g de CRI-A no tuvo un efecto significativo en la PA en comparación con la muestra de control, mientras que la adición de 5,0 g de CRI-T dio la PA más baja, es decir, el pan con la mayor uniformidad de grano de la miga. Por otro lado, la proporción de área de alvéolos/área total aumentó con la adición de 2,5 g de CRI de ambos orígenes, aunque la diferencia con la muestra control fue significativa sólo en el caso de CRI-A.

Tabla 4.4. Efecto de la adición de inulina en polvo (0, 2,5 y 5,0 g/100 g de harina de trigo) sobre las características de los granos de la miga de pan.

Muestra	Área alveolar promedio (mm ²)	Polidispersidad del área alveolar	Fracción alveolar (alvéolos/área total) (%)	Densidad alveolar (alvéolos/cm ²)
Control	1,08 ± 0,33 b	9,6 ± 3,3 ab	54,9 ± 4,4 b	53,6 ± 11,8 b
T-2,5	1,05 ± 0,24 ab	17,4 ± 6,7 c	62,9 ± 7,7 bc	56,4 ± 11,5 b
A-2,5	1,26 ± 0,23 b	15,5 ± 3,8 bc	65,3 ± 5,8 c	52,7 ± 6,0 b
T-5,0	1,39 ± 0,17 b	6,1 ± 1,8 a	41,1 ± 5,3 a	30,1 ± 6,4 a
A-5,0	0,67 ± 0,14 a	9,8 ± 4,3 ab	41,8 ± 4,7 a	64,3 ± 9,1 b

Medias con letra común dentro de una columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Los panes con 5,0 g de fibra soluble presentaron una estructura más compacta, reflejado en los valores de VE y de densidad alveolar bajos y la relación de alvéolos/superficie total (fracción alveolar) fue significativamente menor a la muestra control (**Tabla 4.4**). Este último resultado es coherente con los valores bajos de volumen de pan obtenidos para estas formulaciones (siendo no significativo para A-5 y significativo para T-5). Es decir, la disminución de la proporción de alvéolos/superficie total (fracción alveolar) de la miga en la concentración más alta de ambos tipos de CRI parece estar asociado con la disminución en el volumen específico del pan (**Tabla 4.2**), debido a la interacción de las fibras con la red de gluten y en consecuencia de esto resulta en una menor habilidad para retener el gas (Morris y Morris, 2012). Esto puede deberse al efecto de dilución y debilitamiento de la estructura de la masa discutido en esta sección (Chen *et al.*, 1988; Sangnark y Noomhorm, 2004).

De acuerdo con estos resultados, parece que la adición de 5,0 g de CRI-A si bien facilitó la formación de núcleos de alvéolos durante el mezclado, inhibió el crecimiento de dichas celdas durante la fermentación y/o impidió la retención de gas durante el horneado, mientras que la adición de 5,0 g de CRI-T aparentemente no acompañó la expansión de los alvéolos durante la fermentación y además indujo a la coalescencia de las celdas durante la fermentación y horneado.

Vale la pena mencionar que independientemente del origen de la fibra, la adición de 2,5 g de CRI a 100 g de harina no produjo cambios significativos en el módulo elástico de

la masa (**Figura 4.4**), como así tampoco de los valores de humedad, volumen de pan (**Tabla 4.2**), densidad de celdas de la miga y área promedio de la celda (**Tabla 4.4**). Sin embargo, en este nivel de CRI-A, a diferencia de CRI-T, se produjo un aumento significativo de la dureza y de la masticabilidad del pan (**Tabla 4.5**), y un aumento significativo en la fracción de alvéolos de la miga (**Tabla 4.4**). La disminución de la uniformidad del grano de la miga del pan con 2,5 g de CRI de ambos orígenes puede deberse al crecimiento desproporcionado de las celdas de gas a expensas de celdas adyacentes que colapsaron durante la fermentación y/o la primera etapa del horneado. También, la pérdida de uniformidad puede deberse a la difusión del gas de un alvéolo a otro, poniéndose de manifiesto el proceso de desproporción típico en la desestabilización de las espumas, como consecuencia de las discontinuidades en la red viscoelástica generadas por las fibras. Sin embargo, la adición de 5,0 g de CRI produjo el efecto opuesto (CRI-T) o ningún efecto (CRI-A).

Si bien el motivo de este fenómeno no fue posible de dilucidar, este resultado podría estar relacionado con las fracciones alveolares bajas que presentaron estas muestras, lo que implica un engrosamiento de sus paredes y en consecuencia un retardo en la desproporción de la espuma. En particular, la muestra T-5 presentó además, una densidad alveolar significativamente baja, dando paredes alveolares de espesor aún mayor. Dicho engrosamiento de las paredes podría haber generado un retardo en la difusión del gas a través de las mismas, lo cual habría mantenido la uniformidad del grano de la miga.

3.2.4. Estudios de Microestructura

Se visualizó la integridad estructural de la miga de pan enriquecido con CRI en comparación con la muestra control mediante microscopía electrónica de barrido. En la **Figura 4.9** se muestran imágenes de la microestructura de la miga de los panes con inulina (0, 2,5 y 5,0 g de CRI/100 g de harina de trigo) obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

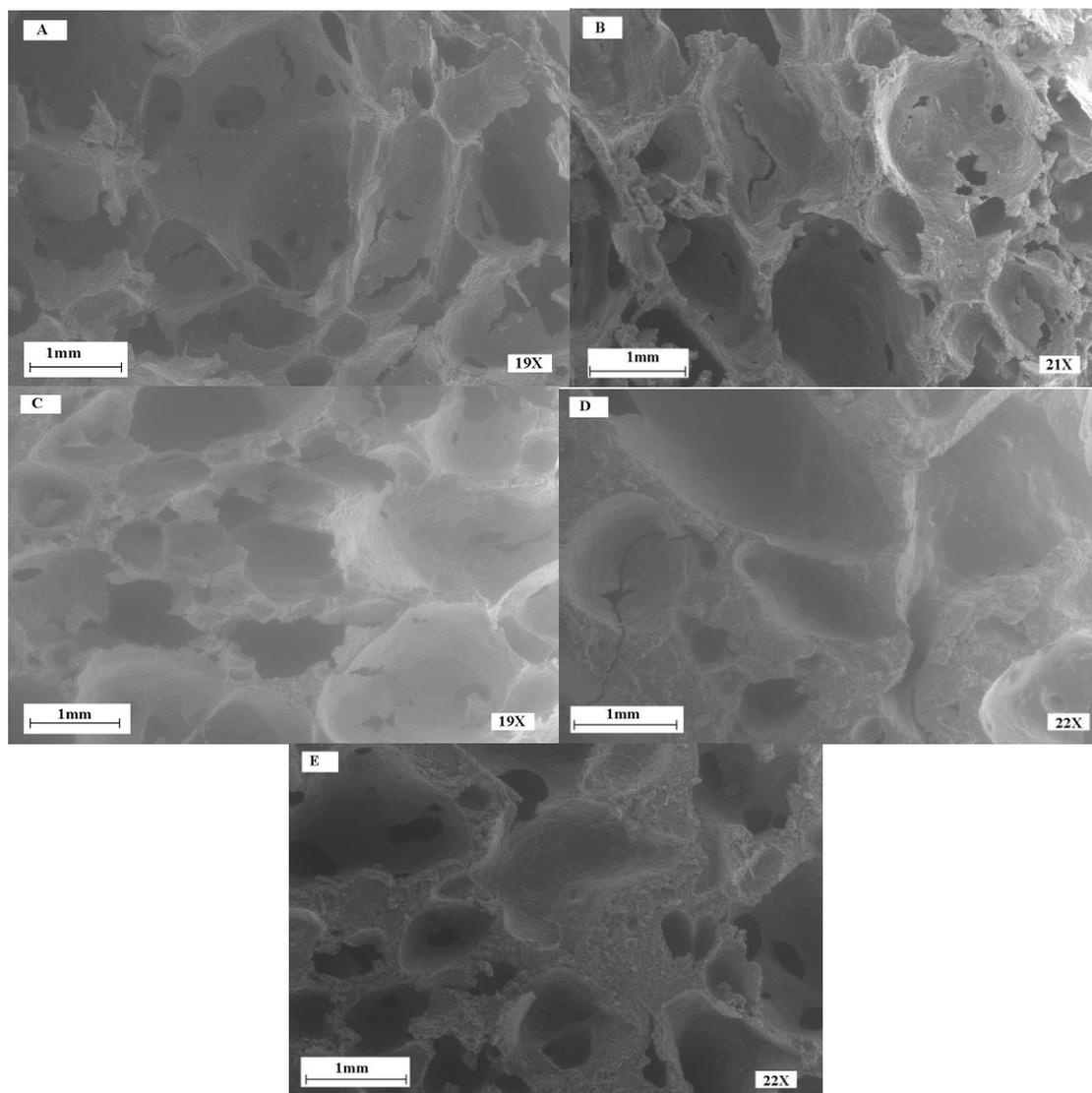


Figura 4.9. Micrografías SEM (magnificación 19-22 X) de la miga de pan fresco liofilizado con diferentes contenidos de inulina: Control (A); T-2,5 (B); A-2,5 (C); A-5,0 (D); T-5,0 (E).

Se observa que la miga control presenta una estructura abierta, de celdas grandes y una matriz continua muy delgadas (**Figura 4.9. A**). Las migas con CRI- 2,5 de ambos orígenes (**Figura 4.9.B y Figura 4.9.C**) presentan una estructura alveolar similar, no obstante, las celdas de la miga CRI-T no parecían estar claramente definidas y sus paredes alveolares parecen más gruesas (**Figura 4.9.B**).

La miga de pan A-5,0 (**Figura 4.9.D**) presentó un leve engrosamiento de la estructura alveolar respecto a la muestra control (como se mencionó en la **Sección 3.2.1**). Sin embargo se observan también fisuras en su estructura que ponen de manifiesto cierta fragilidad estructural. Esto puede deberse a que la fibra soluble como componente de la

matriz genera una disminución de uniones proteína- almidón dentro de la red proteica que explica la fracturabilidad de la estructura en las migas con buen desarrollo alveolar (muestra A-2,5 y A-5,0, **Figura 4.9.C** y **Figura 4.9.D**, respectivamente). Por otra parte, la miga de pan con 5,0 g de CRI-T (**Figura 4.9.E**) fue la que presentó la superficie más densa y compacta sin evidencias de fisuras en todo su arreglo alveolar, esta menor susceptibilidad a la fractura puede deberse al mayor contenido de humedad (**Tabla 4.2**). Estas observaciones sobre la estructura de las migas de los panes son consistentes con los resultados presentados previamente.

Por otra parte, las migas con CRI-A, independientemente de la dosis, presentan una superficie alveolar de aspecto liso y suave (**Figura 4.9.C y 4.9.D**), mientras que la matriz de las muestras con CRI-T es de apariencia rugosa (**Figura 4.9.B y 4.9.E**). La apariencia superficial de los alvéolos varió en función del origen del CRI, esto indica que el tipo de interferencia generada en la matriz es diferente. Dicha observación provee información adicional que podría dilucidar el efecto diferencial que presentaron los CRI de las distintas fuentes, en los parámetros estudiados.

Otros autores también observaron que los efectos de la fibra sobre la estructura del pan están relacionados con las características y la dosis de la fibra soluble incorporada (Polaki *et al.*, 2010; Seetharaman *et al.*, 1997; Pomeranz *et al.*, 1997; Ozboy y Koxsel, 1997; Sudha *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2003; Collar *et al.*, 2007).

En la **Figura 4.10** se muestra la microestructura de la miga de pan obtenida por microscopía electrónica de barrido con una magnificación que permitió visualizar los gránulos de almidón. Los gránulos de almidón más aplanados sugieren una mayor gelatinización del almidón y pérdida de la amilosa/amilopectina. Esto se observó en todas las muestras de miga de pan, pero fue más evidente en las que contenían la mayor dosis de CRI, independientemente del origen. En apoyo a estas observaciones, Polaki *et al.*, (2010) concluyó que los gránulos de almidón aplanados fueron más evidentes en las muestras que contenían fibras solubles.

Los gránulos de almidón en la miga de las muestras con CRI- T fueron totalmente gelatinizados y distinguibles en la matriz (**Figura 4.10.B, E**). Estos gránulos parecían estar más hinchados que los de la muestra de control (**Figura 4.10.A**), en la muestra CRI- A la observación de este fenómeno no fue tan claro (**Figura 4.10.C, D**).

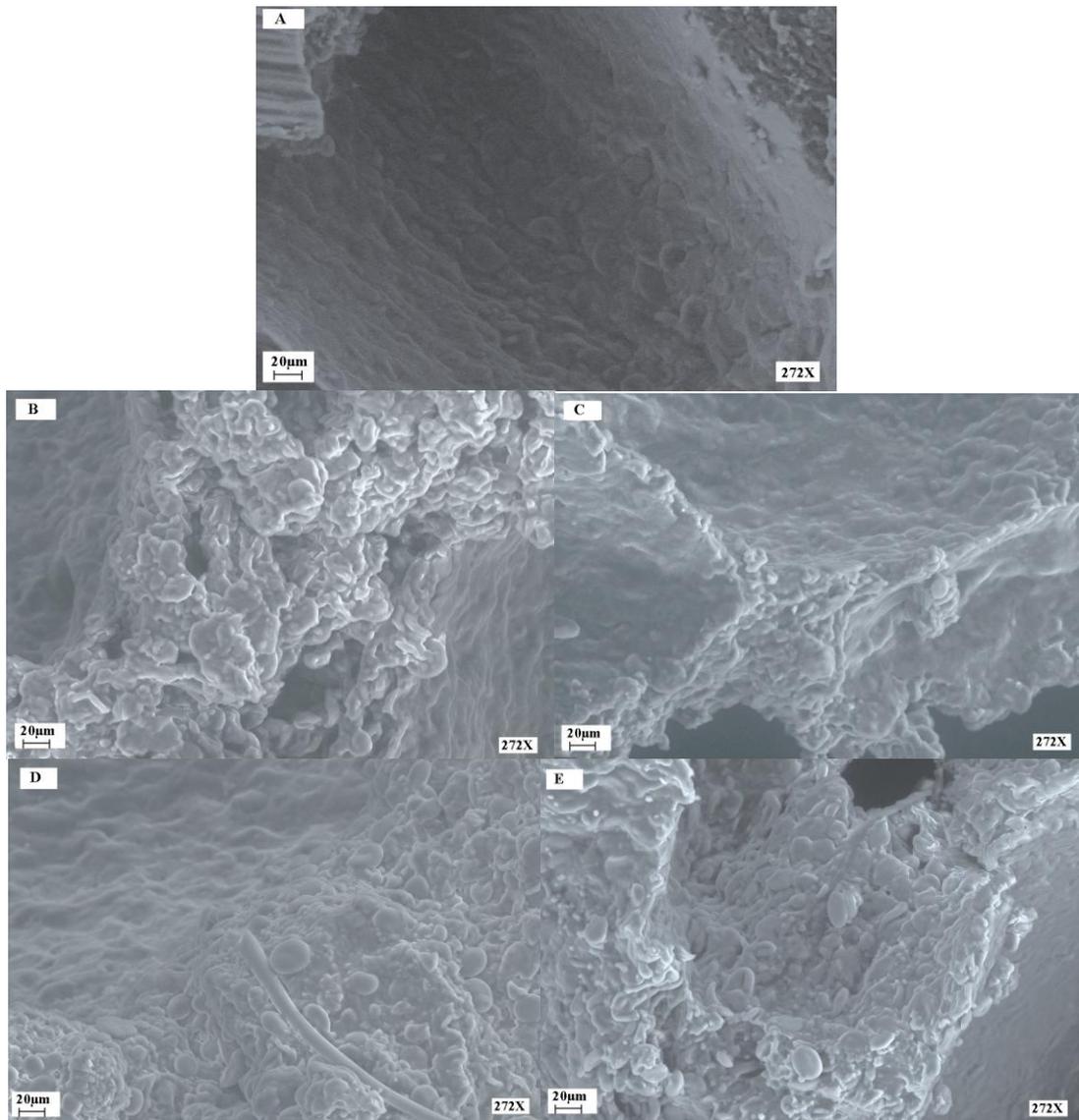


Figura 4.10. Microfotografías SEM (magnificación 274 X) de la miga de pan fresco liofilizado con diferentes contenidos de inulina: Control (A), T-2,5 (B), A-2,5 (C), T-5,0 (D), A-5,0 (E).

En general, el grado de gelatinización puede atribuirse al contenido de humedad de la masa (Salmeen kallio-Marttila *et al.*, 2004). Si bien en el presente estudio el contenido de agua inicial fue igual para todas las formulaciones, la adición de los CRI generó panes con mayor contenido de humedad (**Tabla 4.2**). Esto indicaría que a la temperatura de gelatinización del almidón (de 58 a 64 °C), las masas enriquecidas con fibra tuvieron mayor contenido de humedad. En concordancia con estas observaciones, otros autores

afirmaron que las fibras solubles pueden mejorar la gelatinización del almidón en los panes (Polaki *et al.*, 2010).

Por otra parte, si bien la inulina pareciera integrarse bien a la red de gluten, la diluye, lo que resulta en una menor habilidad para retener el gas (Morris y Morris, 2012). Estas mismas observaciones fueron descritas a partir de las fotografías y micrografías obtenidas (**Figura 4.8** y **Figura 4.10**, respectivamente) y en coincidencia con estos autores, se puso en evidencia el efecto sobre la red viscoelástica mediante los parámetros determinados previamente (**Sección 3.2.1** y **3.2.4**). En apoyo a los resultados y observaciones presentadas, Seetharaman *et al.* (1997) concluyeron que la masa que contiene fibra soluble presentó bajo desarrollo de la red de gluten y alto grado de gelatinización del almidón.

3.2.5. Estudio de textura

Propiedades mecánicas

El análisis del perfil de textura (TPA) consiste en comprimir un alimento dos veces, en un movimiento que imita la acción de la mandíbula. La **Figura 4.11** muestra las curvas de fuerza-tiempo resultantes obtenidas para las muestras de miga de pan.

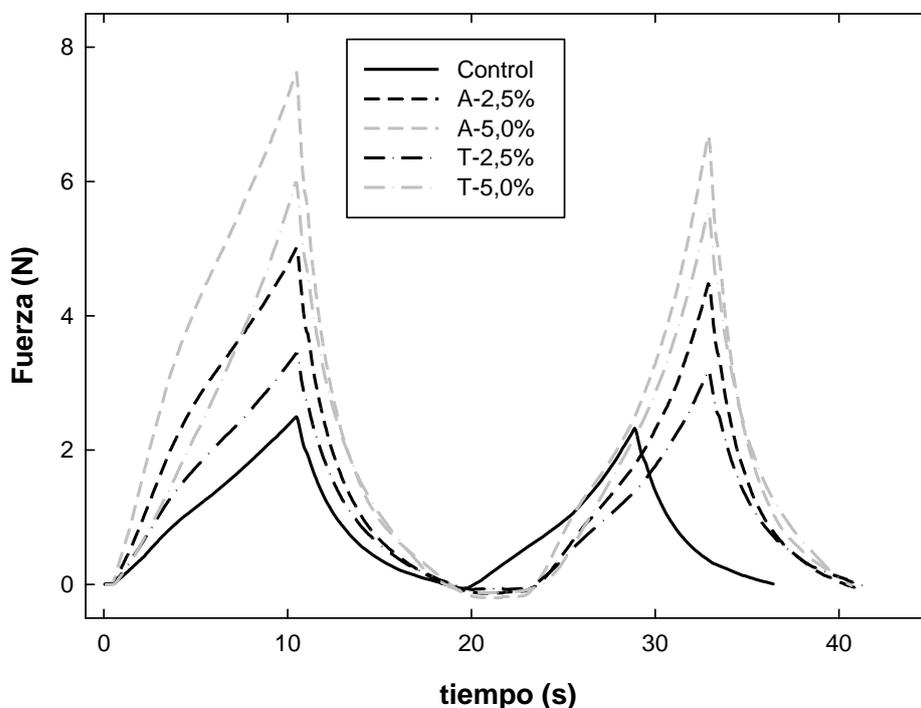


Figura 4.11. Curvas de fuerza vs. tiempo obtenidas a partir de la prueba de TPA en panes de harina de trigo enriquecidos con diferentes tipos y concentraciones de inulina.

Se puede observar que las curvas se desplazaron hacia arriba a concentraciones crecientes de CRI, y que los CRI-A tuvieron un efecto más fuerte que los CRI-T.

Los parámetros texturales calculados se enumeran en la **Tabla 4.5**. Los resultados del ANOVA mostraron que la adición de CRI tuvo un efecto significativo sobre todos los parámetros texturales de la miga de pan.

Tabla 4.5. Efecto de la adición de inulina en polvo (0, 2,5 y 5,0 g/100 g de harina de trigo) sobre las propiedades mecánicas del pan.

Muestra	Dureza (N)	Resortividad	Cohesividad	Masticabilidad (N)
Control	2,50 ± 0,25 a	0,85 ± 0,02 a	0,72 ± 0,01 b	1,53 ± 0,16 a
T-2.5	3,45 ± 0,16 a	0,90 ± 0,01 b	0,75 ± 0,02 bc	2,31 ± 0,11 ab
A-2.5	5,02 ± 0,51 b	0,90 ± 0,01 b	0,67 ± 0,03 a	3,00 ± 0,13 b
T-5.0	6,00 ± 0,71 b	0,88 ± 0,02 ab	0,79 ± 0,01 c	4,16 ± 0,59 c
A-5.0	7,62 ± 0,89 c	0,90 ± 0,01 b	0,64 ± 0,02 a	4,35 ± 0,41 c

En primer lugar, la dureza (D) se redujo en el siguiente orden: A-5,0 > T-5,0, A-2,5 > T-2,5, control. Estos resultados muestran una clara tendencia: los valores de D aumentaron a concentraciones crecientes de CRI y CRI-A tuvo un efecto más fuerte que CRI-T. A su vez, la mayor firmeza de la miga fue observada en los panes de menor volumen, como se mencionó previamente. Además, los panes con CRI- 5 presentaron porcentajes de fracción alveolar significativamente bajos (**Tabla 4.4**). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Rossell *et al.* (2001), quienes concluyeron que el incremento de la dureza de la miga es una consecuencia del engrosamiento de las paredes que rodean las celdas de gas de la miga de pan y de la disminución de la superficie total de las celdas de gas en el pan que contiene fibras solubles. También, Morris y Morris, (2012) informaron que la utilización de inulina y FOS en panificados aumentó la dureza de la miga.

Por otra parte, algunos autores sostienen que una cantidad apreciable de agua podrían haberse unido fuertemente a las fibras añadidas durante la panificación, moléculas que ya no estuvieron disponibles para el desarrollo de la red de almidón de gluten, causando una red de gluten con poco desarrollo y panes de volumen reducido (Brennan y Cleary, 2007).

El aumento de la dureza (o firmeza) de la miga descrito previamente fue atribuido al efecto de dilución (discutido en la **Sección 3.2.1**), que afecta la retención de gas y resulta en un pan de bajo volumen (Mandala *et al.*, 2009; Meyer y Peters, 2009; Morris y Morris, 2012). También otros autores concluyeron que el aumento de la dureza de los panes con fibras se debe a su menor volumen (Gallagher *et al.*, 2003; He y Hosney, 1990).

En tanto, Gómez *et al.*, (2003) reportaron también que los panes de menor tamaño fueron más densos y presentaron una estructura de la miga compacta, resultando en valores de firmeza de la miga más altos que las migas sin fibras y que una posible explicación es el engrosamiento de las paredes que rodean las burbujas de aire en la miga. Esto está en concordancia con nuestros resultados, que mostraron coincidencia entre el aumento de la dureza de la miga y la disminución en el volumen específico del pan en la concentración más elevada de CRI de ambas fibras (**Tabla 4.5**), que a su vez se asoció con la disminución en el módulo elástico de la masa. También, en acuerdo con estos autores, se observó una relación positiva entre el engrosamiento de las paredes alveolares y los valores de D.

En segundo lugar, la resortividad (R) de la miga del pan control fue significativamente menor que la de los panes con CRI, entre los cuales no hubo diferencias significativas. En contraste con nuestros resultados, algunos autores encontraron que R disminuye cuando el volumen de la miga del pan disminuye (Laurikainen *et al.*, 1998). Sin embargo, otros autores también encontraron un comportamiento irregular en la resortividad de la miga de pan enriquecidos con fibras y lo atribuyeron a que existen otros factores que influyen en la solidez que presente la estructura de la miga (Mandala *et al.*, 2009).

En tercer lugar, la cohesividad (C) disminuyó en el siguiente orden: T-5,0 \geq T-2,5 \geq control > A-2,5, A-5,0. Esto sugiere que CRI-T tuvo un efecto positivo sobre la C de las migas de pan, mientras CRI-A tuvo un efecto negativo en la C.

Finalmente, la masticabilidad (M) disminuyó en el orden siguiente: A-5,0, T-5,0 > A-2,5 \geq T-2,5 \geq control. Estos resultados mostraron la misma tendencia que los valores de D. Los valores de M aumentaron al aumentar las concentraciones de CRI, y a su vez la inulina CRI-A tuvo un efecto más fuerte que CRI-T. Vale la pena recordar que M es directamente proporcional a D.

El efecto de la adición de inulina en polvo a la harina de trigo, sobre las propiedades mecánicas de la miga de pan, principalmente la dureza, fue estudiado en varios trabajos.

En acuerdo con nuestros resultados, la mayor parte de estos trabajos (O'Brien *et al.*, 2003; Poinot *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002) informaron el aumento en la dureza de la miga de pan con la adición de inulina. Sin embargo, Hager *et al.* (2011) no encontraron ningún efecto significativo de la adición de inulina sobre D (día 0) y los resultados de Peressini y Sensidoni (2009) con inulina ST (GPn = 10) no mostraron una tendencia clara. Wang *et al.* (2002) también encontraron un aumento de la masticabilidad de la miga del pan con inulina adicionada (en acuerdo con nuestros resultados), y ningún efecto significativo en los parámetros de cohesividad y resortividad. También, en acuerdo con estos autores, se observó una relación positiva entre el engrosamiento de las paredes alveolares y los valores de D.

En cuanto al efecto de la longitud de la cadena de inulina sobre la dureza de la miga, nuestros resultados mostraron que CRI-A (GPn \geq 10) tuvo un mayor efecto de endurecimiento que CRI-T (GPn 9,2). Esto está en concordancia con Peressini y Sensidoni (2009), quienes también observaron un incremento de la dureza a mayor GP de la inulina. Sin embargo, hubo una cierta discrepancia entre nuestros resultados debido a que la inulina de cadena más larga produjo el mayor efecto sobre la dureza de la miga (D), pero el volumen del pan (V) fue más afectado por la inulina de cadena más corta. Una posible razón es que la diferencia en GP entre CRI -T y el CRI-A no fue lo suficientemente grande como para determinar un efecto consistente del GP sobre la D y V.

En consecuencia, no fue posible establecer una conclusión sólida sobre el efecto de la longitud de cadena de la inulina en la panificación y en las propiedades de pan. Otros autores también obtuvieron resultados no concluyentes en las propiedades texturales del pan e indicaron que existen otros factores que influyen en la estabilidad y en el comportamiento de la estructura de la miga de pan (Mandala *et al.*, 2009).

3.2.6. Evaluación sensorial

Se demostró que la adición de CRI de ambas fibras en la concentración más alta (5,0 g en 100 g de harina) tuvo un efecto significativo sobre todas las propiedades físicas del pan. Por otra parte, la simple observación mostró que la calidad del pan hecho con 5,0 g de CRI-T (muestra T-5,0) fue inaceptable (demasiado plano, por demás húmedo, y demasiado oscuro). Por lo tanto, los panes con 5,0 g de CRI de ambas fibras (T-5,0 y A-5,0) se descartaron para el análisis sensorial. En tanto, las formulaciones con agregado de CRI en la concentración más baja (2,5 g en 100 g de harina) tuvieron un

efecto menor sobre las propiedades del pan, pero aún significativa en algunas de estas propiedades.

Por lo tanto, fue de gran importancia determinar si estas diferencias tuvieron un impacto en las propiedades sensoriales de los panes y analizar su aceptación por parte de los consumidores. Así, panes enriquecidos con 2,5 g de CRI de ambas fibras (T-2,5 y A-2,5) se sometieron al análisis sensorial junto con la muestra control. Todos los atributos evaluados (olor, sabor, esponjosidad, color de la miga y textura de la miga) de estas tres muestras obtuvieron más de seis puntos (**Tabla 4.6**), lo cual significa que estas muestras fueron aceptables.

Tabla 4.6. Efecto de la adición de inulina en polvo (0 y 2,5 g/100 g de harina de trigo) sobre las propiedades organolépticas del pan (en todos los casos $p > 0,05$).

Muestra	Olor	Sabor	Esponjosidad	Color de la miga	Textura de la miga
Control	6,64 ± 2,16	6,61 ± 2,25	6,86 ± 2,00	6,78 ± 1,91	6,92 ± 2,03
T-2,5	6,24 ± 2,41	6,12 ± 2,65	6,76 ± 2,12	6,54 ± 2,22	6,93 ± 2,06
A-2,5	6,18 ± 2,35	6,50 ± 2,44	6,75 ± 2,20	6,35 ± 2,34	6,79 ± 2,28

Además, no se encontraron diferencias significativas entre las tres muestras, en ninguno de los atributos evaluados. Los resultados detallados de las respuestas de los consumidores a la encuesta pueden verse en el Anexo al final de este Capítulo.

Algunos autores mencionaron que las formulaciones con contenidos de inulina de achicoria similares a los utilizados en el presente trabajo mejoraron las propiedades sensoriales del pan en comparación con el control. Esto fue atribuido a la capacidad de la inulina de simular el comportamiento de la grasa, dado que otorga una sensación en boca agradable, al mismo tiempo que permite una liberación gradual del sabor y una percepción de la textura aceptable durante el consumo (Wang *et al.*, 2002).

En tanto, Peressini y Sensidoni (2009) también encontraron que con el reemplazo de la harina con hasta 5% de inulina comercial (de GP 10-23) se obtienen panes de calidad sensorial aceptable.

Por otra parte, las puntuaciones de los descriptores de la evaluación sensorial de los panes enriquecidos con CRI fueron superiores a las obtenidas con otras fibras dietéticas (Abdul-Hamid y Siew Luan, 2000; Knuckles *et al.*, 1997).

En particular, de los resultados obtenidos en los panes con 2,5 g de CRI vale la pena destacar que, a pesar de las diferencias significativas encontradas en las propiedades mecánicas, parámetros de color, y características del grano de la miga, los consumidores no encontraron diferencias significativas en los atributos sensoriales relacionados con estas propiedades, como son textura, esponjosidad y color de la miga (así como tampoco en el olor y el gusto). Este es un resultado muy positivo, ya que significa que la adición de inulina a la harina de trigo no fue en detrimento de ninguno de los atributos sensoriales del pan, y que el consumidor común fue incapaz de distinguir la diferencia entre el pan blanco, de consumo habitual por parte de la población, y los panes enriquecidos con inulina. Este hecho es destacable principalmente para los CRI obtenidos de topinambur, dado que no hay antecedentes en panificados enriquecidos con inulina de topinambur.

4. Conclusiones

Los CRI utilizados en las formulaciones de los panes fueron de diferentes fuentes vegetales (achicoria y topinambur), y a su vez presentaron diferencias tanto en su grado de pureza como en su GP (siendo ambos parámetros de mayor valor en los CRI-A). Por esto fue de gran importancia analizar el comportamiento de las masas y de sus panes. Dado que las características del producto final dependieron no solo del tipo de inulina utilizada (de su origen y GP y de la presencia de carbohidratos de bajo peso molecular) y de su contenido en la formulación, sino también pudieron deberse a la distribución de pesos moleculares y a la presencia de otros componentes.

El enriquecimiento del pan blanco con 5,0 g de inulina en polvo extraída de tubérculos de topinambur (CRI-T) por 100 g de harina de trigo produjo cambios significativos en las propiedades viscoelásticas de la masa y en las propiedades físicas del pan debido al efecto de dilución, dando un pan de calidad inaceptable. Sin embargo, la adición de una concentración menor de CRI-T (2,5 g/100 g de harina) no produjo cambios significativos en la reología de la masa, como así tampoco en los parámetros de calidad del pan, excepto en la uniformidad del grano de la miga y en el color.

Lo más relevante fue que no se encontraron diferencias significativas en los atributos sensoriales evaluados, en comparación con la muestra control. Estos hallazgos indican que el pan de trigo puede ser apto para enriquecerse con la fibra soluble CRI-T hasta un 2,5 g/100 g de harina, sin consecuencias desfavorables en la “maquinabilidad” de la masa, ni en la capacidad de retención de gas, y manteniendo los atributos de calidad del

pan convencional. Resultados similares se encontraron con la inulina de achicoria comercial

El enriquecimiento del pan blanco con fibra dietaria es de interés en la panificación industrial debido a la creciente demanda de productos alimenticios más saludables. Por lo antedicho, es posible afirmar que la inulina obtenida de topinambur es un ingrediente de gran potencial para ser incorporado en un producto de consumo masivo, como es el pan blanco, y así contribuir al aumento de la ingesta diaria de fibra soluble.

Este estudio ha demostrado el potencial del desarrollo de panes ricos en fibra soluble con el fin de aumentar la aceptabilidad y la ingesta de fibra dietética.

Anexo II

Formulario presentado a cada consumidor para el análisis sensorial de los panes.

Nombre:

Consumidor N°

Estudios:	Primario <input type="checkbox"/>	Secundario <input type="checkbox"/>	Universitario <input type="checkbox"/>
-----------	-----------------------------------	-------------------------------------	--

Por favor, evalúe las muestras de izquierda a derecha.

Indique su opinión sobre las siguientes características:

Muestra N°

	Me disgusta mucho					Me gusta mucho				
Olor	<input type="checkbox"/>									
Color de la miga	<input type="checkbox"/>									
Esponjosidad	<input type="checkbox"/>									
Textura de la miga	<input type="checkbox"/>									
Sabor	<input type="checkbox"/>									

Muestra N°

	Me disgusta mucho					Me gusta mucho				
Olor	<input type="checkbox"/>									
Color de la miga	<input type="checkbox"/>									
Esponjosidad	<input type="checkbox"/>									
Textura de la miga	<input type="checkbox"/>									
Sabor	<input type="checkbox"/>									

Muestra N°

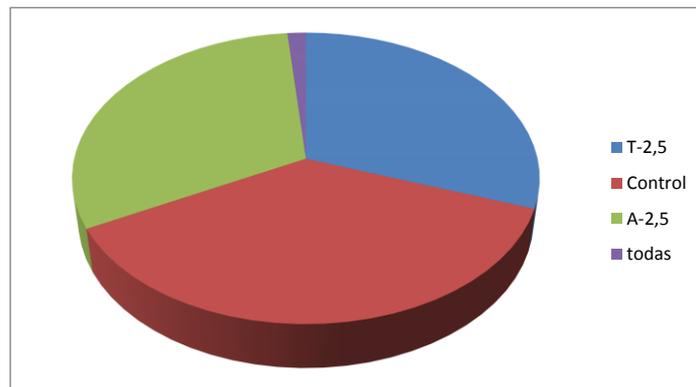
	Me disgusta mucho					Me gusta mucho				
Olor	<input type="checkbox"/>									
Color de la miga	<input type="checkbox"/>									
Esponjosidad	<input type="checkbox"/>									
Textura de la miga	<input type="checkbox"/>									
Sabor	<input type="checkbox"/>									

1) Que muestra le gustó más, en general? Por qué?

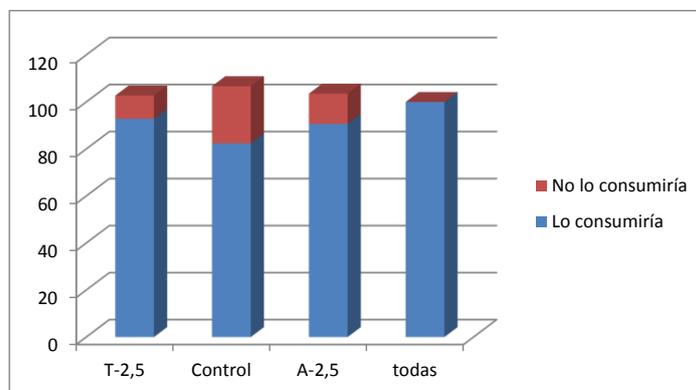
2) Consumiría este producto?. Por qué si? ó Por qué no?

3) Lo compraría?

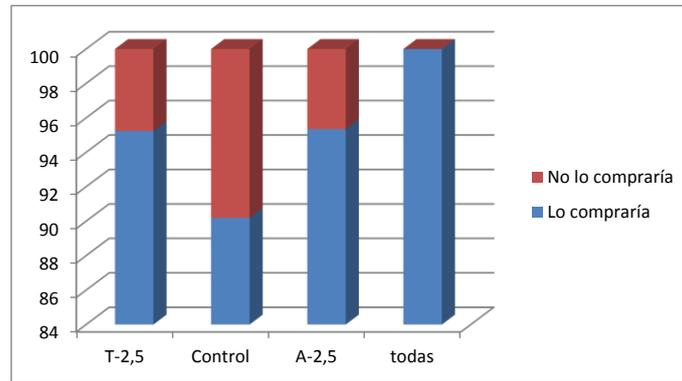
Respuesta a la pregunta 1



Respuesta a la pregunta 2



Respuesta a la pregunta 3



5. Abreviaturas

Ab: absorción farinográfica

AFLO: aflojamiento

CRI: carbohidratos ricos en inulina

CRI-A: carbohidratos ricos en inulina provenientes de achicoria

CRI-T: carbohidratos ricos en inulina provenientes de topinambur

E: estabilidad de la masa

FQN: número de calidad.

GPn: grado de polimerización medio

Hab: habitante

HR: humedad relativa

P: tenacidad

RVL: región viscoelástica lineal

TD: tiempo de desarrollo de la masa

VE: volumen específico

W: energía de deformación

6. Referencias

- AACC. (2000). *Approved Methods of the AACC. Methods 46-13. Ninth Edition.* The Association. USA.
- AACC. (2000). Method 10-05.01. *Guidelines for measurement of volume by rapeseed displacement approved methods of analysis (10th ed.).* St. Paul, MN, USA AACC International.
- Abdul-Hamid, A. y Luan, Y. S. (2000). Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food chemistry*, 68(1): 15-19.
- Ahlborn, G. J., Pike, O. A., Hendrix, S. B., Hess, W. M. y Huber, C. S. (2005). Sensory, mechanical, and microscopic evaluation of staling in low-protein and glutenfree breads. *Cereal Chemistry*, 82(3): 328-335.
- Almeida, E.L., Chang, Y.K. y Steel, C.J. (2013). Dietary fibre sources in bread: influence on technological quality. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 50(2):545-553.
- Añon, M. C., Puppo, M. C., Pedroza-Islas, R., Oliete, B., y Villagómez-Zavala, D. (2009). Valor nutricional y saludable de materias primas para la elaboración de productos de panificación. Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación, Universidad de Valparaíso y CYTED p 71.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S. y Perera, C. O. (2010). Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: a review. *Journal of food science*, 75(8): 163-174.
- Arai, S. (2002). Global view on functional foods: Asian perspectives', *British Journal of Nutrition*, 88(2): 139- 143.
- Aravind, N., Sissons, M.J., Fellows, C.M., Blazek, J. y Gilbert, E.P. (2012). Effect of inulin soluble dietary fibre addition on technological, sensory, and structural properties of durum wheat spaghetti. *Food Chemistry*, 132(2): 993-1002.
- Bonnand-Ducasse, M., Della Valle, G., Lefebvre, J. y Saulnier, L. (2010). Effect of wheat dietary fibres on bread dough development and rheological properties. *Journal of Cereal Science*, 52(2): 200-206 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2010.05.006>.
- Borneo, R. y Aguirre, A. (2008). Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. *LWT e Food Science and Technology* 41(10):1748-1751.

- Bourne, M. C. (2002). Principles of objective texture measurement. In S. L. Taylor (Ed.), *Food texture and viscosity: Concept and measurement* pp. 182-186. San Diego: Academic Press.
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7): 62-66.
- Brasil, J.A., Silveira, K.C., Salgado, S.M., Livera, A.V.S., Faro, Z.P. y Guerra, N.B., (2011). Effect of the addition of inulin on the nutritional, physical and sensory parameters of bread. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(1): 185-191.
- Brennan, C. S. y Cleary, L. J. (2007). Utilisation Glucagel® in the β -glucan enrichment of breads: A physicochemical and nutritional evaluation. *Food Research International*, 40(2): 291-296.
- Brennan, M., Monro, J.A. y Brennan, C.S. (2008). Effect of inclusion of soluble and insoluble fibres into extruded breakfast cereal products made with reverse screw configuration. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(12): 2278-2288.
- Brescia, V.F., Sacco, D., Sgaramella, A., Pasqualone, A., Simeone, R., Peri, G. y Sacco, A., (2007). Characterisation of different typical Italian breads by means of traditional spectroscopic and image analyses. *Food Chemistry*, 104(1): 429-438.
- Chen, H., Rubenthaler, G. L., Leung, H. K. y Baranowski, J. D. (1988). Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. *Cereal Chem*, 65(3): 244-247.
- Civille GV, Szczesniak AS. 1973. Guidelines to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4(2): 204-223.
- Collar, C., Santos, E. y Rosell, C. M. (2007). Assessment of the rheological profile of fibre-enriched bread doughs by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3): 820-826 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.026>.
- Crowley, P., Grau, H. y Arendt, E. K. (2000). Influence of additives and mixing time on crumb grain characteristics of wheat bread. *Cereal Chemistry*, 77(3): 370-375.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Diplock, A. T., P. J. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E. B. Fern y M. B. Roberfroid. (1999), Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(1): 122-131.

- Dobraszczyk, B. J., y Morgenstern, M. P. (2003). Rheology and the breadmaking process. *Journal of Cereal Science*, 38(3): 229-245.
- Franck, A. (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*, 87(2): 287-291.
- Gallagher, E., Gormley, T. R. y Arendt, E. K. (2003). Crust and crumb characteristics of gluten-free breads. *Journal of Food Engineering*, 56(2): 153-161.
- Gan, Z., Ellis, P. R. y Schofield, J. D. (1995). Gas cell stabilisation and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21(3): 215-230 <http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.1995.0025>.
- Gan, Z., Galliard, T., Ellis, P. R., Angold, R. E. y Vaughan, J. G. (1992). Effect of the outer bran layers on the loaf volume of wheat bread. *Journal of Cereal Science*, 15(2): 151-163.
- Gómez, M., Ronda, F., Blanco, C. A., Caballero, P. A. y Apestegua, A. (2003). Effects of dietary fibre on dough rheology and bread quality. *European Food Research Technology*, 216(1): 51-56.
- Hager, A. S., Ryan, L. A. M., Schwab, C., Gänzle, M. G., O'Doherty, J. V. y Arendt, E. K. (2011). Influence of the soluble fibres inulin and oat β -glucan on quality of dough and bread. *European Food Research and Technology*, 232(3): 405-413.
- Hayman, D.A., Hosney, R.C. y Faubion, J.M. (1998). Effect of pressure (crust formation) on bread crumb grain development. *Cereal Chemistry* 75(5): 577-580.
- He, H. y Hosney, R. C. (1990). Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. *Cereal Chemistry*, 67(6): 603-608.
- Hempel, S., Jacob, A. y Rohm, H. (2006). Influence of inulin modification and flour tipo on the sensory quality of prebiotic wafer crackers. *Eur Food Res Technol*, 224(3): 335-341.
- Ishida, N., Takano, H., Naito, S., Isobe, S., Uemura, K., Haishi, T., Kose, K., Koizumi, M. y Kano, H. (2001). Architecture of baked breads depicted by a magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, 19(6): 867-874.
- Juszczak, L., Witczak, T., Ziobro, R., Korus, J., Cieślak, E. y Witczak, M., (2012). Effect of inulin on rheological and thermal properties of gluten-free dough. *Carbohydrate Polymers*, 90(1): 353-360.
- Kamman, P.W. (1970). Factors affecting the grain and texture of white bread. *Baker's Digest*, 44 (2): 34-38.

- Karolini-Skaradzinska, Z., Bihuniak, P., Piotrowska, E. y Wdowik, L. (2007). Properties of dough and qualitative characteristics of wheat bread with addition of inulin. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(4): 267-270.
- Knuckles, B. E., Hudson, C. A., Chiu, M. M. y Sayre, R. N. (1997). Effect of β -glucan barley fractions in high-fiber bread and pasta. *Cereal Foods World*, 42(2): 94-99.
- Krupa-Kozak, U., Altamirano-Fortoul, R., Wronkowska, M. y Rosell, C. M. (2012). Breadmaking performance and technological characteristic of gluten-free bread with inulin supplemented with calcium salts. *European Food Research and Technology*, 235(3): 545-554.
- Krystallis, A., Maglaras, G. y Mamalis, S. (2008). Motivations and cognitive structures of consumers in their purchasing of functional foods. *Food Quality and Preference*, 19(6): 525-538.
- Ktenioudaki, A. y Gallagher, E. (2012). Recent advances in the development of high-fibre baked products. *Trends in Food Science & Technology*, 28(1): 4-14.
- Lassoued, N., Babin, P., Della Valle, G., Devaux, M. F. y Réguerre, A. L. (2007). Granulometry of bread crumb grain: contributions of 2D and 3D image analysis at different scale. *Food Research International*, 40(8): 1087-1097.
- Laurikainen T., Harkonen H., Autio K. y Poutanen K. (1998). Effects of enzymes in fibre- enriched baking, *J. Sci Food Agric*, 76(1): 239-249.
- Lee, M.R., Swanson, B.G. y Bail B.K. (2001). Influence of amylase content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chem*, 78(6): 701-706.
- León, A. E., Rosell, C. M., Gómez Pallarés, M., Brites, C., Haros, M. y Benedito, C. (2007). De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica Edit. Lit. 480 pp.
- Liu, Z. y Scanlon, M. G. (2004). Revisiting crumb texture evaluation methods: Tension, compression, and indentation. *Cereal Foods World*, 49(2): 76-82.
- Lutz, M. y León, A. E. (Eds.). (2009). Aspectos Nutricionales y Saludables de los productos de panificación. Universidad de Valparaíso.
- Mandala, I., Polaki, A. y Yanniotis, S. (2009). Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients. *Journal of Food Engineering* 92(2): 137-145.
- Meredith, P. 1964. A theory of gluten structure. *Cereal Sci. Today* 9(1):30-33.
- Meyer, D. y Peters, B. (2009). Enhancing the nutritional value of bread with inulin. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20(3): 43-47.

- Miranda, R., 2001. Trigo. Cuaderno de actualización de AACREA, 63: 113-117.
- Mirsaeedghazi, H., Emam-Djomeh, Z. y Mousavi, S. M. A. (2008). Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(1): 112-119.
- Mondal, A. y Datta, A. K. (2008). Bread baking—a review. *Journal of Food Engineering*, 86(4): 465-474.
- Morris, C. y Morris, G. A. (2012). The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. *Food Chemistry*, 133(2): 237-248.
- O'Brien, C. M., Mueller, A., Scannell, A. G. M., y Arendt, E. K. (2003). Evaluation of the effects of fat replacers on the quality of wheat bread. *Journal of Food Engineering*, 56(2/3): 265-267.
- Pantanelli, 2003. Informe Farináceo. Cadenas Alimentarias: Harina de trigo.- Alimentos Argentinos 22: 25-28.
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/revista/ediciones/28/Harina_trigo.htm
- Park, H., Seib, P. A. y Chung, O. K. (1997). Fortifying Bread with a Mixture of Wheat Fiber and Psyllium Husk Fiber Plus Three Antioxidants 1. *Cereal Chemistry*, 74(3): 207-211.
- Peressini, D. y Sensidoni, A. (2009). Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 49(2): 190-201.
- Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-Priol, J., Fillonneau, C., Le-Bail, A. y Prost, C. (2010). Influence of inulin on bread: Kinetics and physico-chemical indicators of the formation of volatile compounds during baking. *Food Chemistry*, 119(4): 1474-1484 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.029>.
- Polaki A., P. Xasapis, C. Fasseas, S. Yanniotis, I. Mandala. (2010). *Journal of Food Engineering* Fiber and hydrocolloid content affect the microstructural and sensory characteristics of fresh and frozen stored bread (97): 1-7.
- Pomeranz, Y., Shogren, M. D., Finney, K. F. y Bechtel, D. B. (1997). Fiber in breadmaking. Effects on functional properties. *Cereal Chemistry*, 54(1): 25-41.
- Praznik, W., Cieslik E. y Filipiak K- Florkiewidz A. (2002). Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: Composition and application in bread. *Food/Nahrung*, 46(3): 151-157. *Nahrung/Food*, 46(3): 151-157.

- Ribotta, P. D., Tadini, C. C., Gularte, M. A., Collar, C., Galotto, M. J., Gómez Pallarés, M. y Añón, M. C. (2009). Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados. Ed. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Córdoba – Argentina, 327pp.
- Rosell, C. M., Rojas, J. A. y de Barber, C. B. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15(1): 75-81.
- Rosell, C. M., Santos, E., y Collar, C. (2006). Mixing properties of fibre-enriched wheat bread doughs: A response surface methodology study. *European Food Research and Technology*, 223(3): 333-340.
- Salmeenkalio Marttila, M., Roininen, K., Autio y K., Lähteenmäki, L. (2004). Effect of gluten and transglutaminase on microstructure, sensory characteristics and instrumental texture of oat bread. *Agricultural and Food Science*, 13(2): 138-150.
- Sangnark, A. y Noomhorm, A. (2004). Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. *Food Research International*, 37(1): 66-74 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2003.09.007>.
- Sapirstein, H., Roller, R. y Bushuk, W. (1994). Instrumental measurement of bread crumb grain by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 71(4): 383-391.
- Scanlon, M. G. y Zghal, M. C. (2001). Bread properties and crumb structure. *Food Research International*, 34(10): 841-864.
- Scott, K. P., Duncan, S. H. y Flint, H. J. (2008). Dietary fibre and the gut microbiota. *Nutrition Bulletin*, 33(3): 201-211.
- Seetharaman, K., McDonough, C. M., Waniska, R. D., y Rooney, L. W. (1997). Microstructure of wheat flour tortillas: effects of soluble and insoluble fibres. *Food science and technology international*, 3(3): 181-188.
- Shewry, P. R., Popineau, Y., Lafiadra, D. y Belton P. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: Findings of the Eurowheat project. *Trends Food Science & Technology*, 11(12): 433-441.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. y Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3): 456-467.
- Sosulski, F. W. y Wu, K. K. (1988). High-fiber breads containing field pea hulls, wheat, corn, and wild oat brans. *Cereal Chemistry*, 65(3): 186-191.

- Spiegel, J. E., R. Rose, P. Karabell, V. H. Frankos, and D. F. Schmitt, 1994 “Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients,” *Food Technology*, vol. 1, no. 1, pp. 85-89.
- Stauffer, C. E. (1990). *Functional additives for bakery foods*. Springer Science & Business Media. 279 pp
- Sudha, M. L., Vetrmani, R. y Leelavathi, K. (2007). Influence of fibre from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality. *Food Chemistry*, 100(4): 1365-1370.
- Tan J, Zhang H, Gao X. (1997). SEM image processing for food structure analysis. *Journal of Texture Studies*, 28(6): 657-672.
- Tudorica, C.M., Kuri, V. y Brennan, C.S. (2002). Nutritional and physicochemical characteristics of dietary fiber enriched pasta. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2): 347-356.
- Wang, J., Rosell, C. M. y Benedito de Barber, C. (2002). Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*, 79(2): 221-226.
- Ziobro, R., Korus, J., Juszczak, L. y Witczak, T. (2013). Influence of inulin on physical characteristics and staling rate of gluten-free bread. *Journal of Food Engineering*, 116(1): 21-27.

Capítulo 5

Conclusiones generales y trabajos futuros

En este capítulo se describen las conclusiones de mayor relevancia del presente trabajo, así como también las perspectivas futuras y posibles líneas de investigación que se desprenden de los resultados y conclusiones obtenidos, que darían continuidad al presente estudio en trabajos futuros.

7. Conclusiones generales

La caracterización composicional y fisicoquímica al momento de la cosecha de los tubérculos de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) del cultivar Bianka fue de relevancia, no solo debido a la variabilidad composicional que presenta la especie, influenciada por factores fisiológicos y agroclimáticos, sino también a que son nulos los registros de cultivares en Argentina. Los tubérculos de topinambur tienen como componente principal a la inulina, además de minerales y proteínas de alto valor biológico, que en suma contribuyen a posicionarlo como cultivo de apreciable valor nutricional e industrial, con aplicaciones diversas en el desarrollo de productos alimenticios.

El presente trabajo aportó información sobre las características de los tubérculos de topinambur almacenados durante diferentes tiempos a 4-5 °C y 98% HR. Así mismo, se obtuvieron datos de los carbohidratos ricos en inulina extraídos en medio acuoso a partir de tubérculos de topinambur de diferentes estadios de almacenamiento, y de su cinética de hidrólisis ácida. Esto podría ser de utilidad para optimizar las condiciones de almacenamiento de los tubérculos de topinambur, así como también para seleccionar la mejor condición de hidrólisis en la producción de fructosa a partir de extractos vegetales, o bien para la preparación de productos químicos.

Los datos obtenidos en las muestras de carbohidratos ricos en inulina purificados, indicaron que la hidrólisis enzimática que se desarrolló en los tubérculos durante su almacenamiento influyó significativamente sobre el contenido de inulina y su grado de

polimerización promedio respecto a los de tubérculos no almacenados. Según estos resultados, los tubérculos de topinambur almacenados a 4 °C por períodos inferiores a 8 meses podrían ser utilizados para la obtención de polifruktanos, mientras que tubérculos con tiempos de almacenamiento superiores a dicho período, serían aptos como fuente de fructooligosacáridos. Así, queda de manifiesto que las condiciones de almacenamiento de los tubérculos de topinambur determinan sus características fisicoquímicas y las de sus carbohidratos ricos en inulina. El período de almacenamiento debería ser considerado estratégicamente en función del uso al que van a ser sometidos dichos tubérculos, sabiendo que el grado de polimerización promedio de la inulina condiciona su funcionalidad tecnológica en alimentos.

También se aportaron datos sobre la influencia del grado de polimerización de la inulina, afectado por el tiempo de almacenamiento de tubérculos de topinambur, sobre las propiedades prebióticas de la inulina extraída. En este sentido, los resultados obtenidos permitieron demostrar que, independientemente del grado de polimerización promedio, todas las inulinas fueron fermentadas por la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei*, siendo la inulina con grado de polimerización promedio 9 (extraída de tubérculos almacenados durante 4 meses) la que presentó las mayores tasas de crecimiento, comparables a las obtenidas con glucosa e inulina comercial de achicoria (grado de polimerización promedio ≥ 10). Este resultado indicaría que hay un grado de polimerización promedio óptimo de inulina que promueve en mayor medida el crecimiento de microorganismos probióticos.

Por último, se elaboraron panes blancos a base de harina de trigo, enriquecidos con inulina. En las formulaciones de los panes se utilizaron dos concentraciones de carbohidratos ricos en inulina, de diferentes fuentes vegetales (topinambur y achicoria), que a su vez presentaron diferencias tanto en su grado de pureza como en su grado de polimerización. Dado que estos factores determinan las características del producto final, fue de gran importancia analizar su efecto sobre el comportamiento de las masas y las propiedades de sus panes.

El resultado más relevante fue que el enriquecimiento del pan blanco con la adición de 2,5 g de inulina de topinambur/100 g de harina no produjo cambios significativos en la reología de la masa, como así tampoco en los parámetros de calidad del pan, excepto en la uniformidad del grano de la miga y en el color. Lo más destacable fue que no se encontraron diferencias significativas en los atributos sensoriales evaluados, en comparación con la muestra control. Estos hallazgos indican que el pan de trigo puede

enriquecerse con inulina de topinambur en concentraciones de hasta 2,5 g/100 g de harina, sin consecuencias desfavorables en la “maquinabilidad” de la masa y en la capacidad de retención de gas, manteniendo los atributos de calidad del pan convencional. Resultados similares se encontraron con la inulina de achicoria comercial.

En base a los resultados del presente trabajo es posible afirmar que la inulina obtenida de topinambur es un ingrediente de gran potencial para ser incorporado en un producto de consumo masivo como es el pan blanco, y así contribuir al aumento de la ingesta diaria de fibra soluble y sus consecuentes efectos benéficos sobre la salud.

Estos conocimientos contribuyen a confirmar que el topinambur es una fuente viable de un ingrediente bioactivo, como es la inulina, para la elaboración de alimentos funcionales. Esto podría fomentar el interés de la agro-industria local en el desarrollo de productos con valor agregado a partir de estos cultivos, y abriría la posibilidad de producir inulina a nivel nacional, brindando un producto equivalente al actualmente disponible en el mercado, de origen importado.

8. Perspectivas y trabajos futuros

A nivel mundial la inulina ha adquirido una creciente notoriedad y se ha observado cierta estabilidad en su crecimiento en el comercio internacional. Este incremento está asociado a los múltiples beneficios que el producto tiene como ingrediente de los alimentos funcionales, como también a los nuevos y crecientes usos en la industria químico-farmacéutica, de alimentación animal y de envases y embalajes. Es por ello que se justifica ampliar el conocimiento sobre el manejo del cultivo para el control del grado de polimerización promedio de la inulina de topinambur a partir de diferentes combinaciones de momentos de cosecha y tiempos de almacenamiento de los tubérculos, así como su posterior procesamiento y uso.

A partir de los estudios y discusiones presentados en la presente Tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan principalmente en dos grandes líneas. Una dirigida al procesamiento, incluyendo sus diferentes etapas y la calidad del producto obtenido, y otra en su utilización como ingrediente bioactivo en productos panificados y lácteos.

En cuanto al procesamiento, la etapa de extracción desarrollada en el presente trabajo podría ser una alternativa rápida para convertir una gran cantidad de tubérculos frescos en extracto bruto de inulina, que podría ser almacenado congelado para

tratamientos posteriores, dada la cosecha estacional de dicho cultivo. Además, dicha alternativa disminuiría el riesgo de degradación de los tubérculos frescos durante el almacenamiento en frío. A su vez, se podrían implementar mejoras al método de extracción acuoso y de purificación de los carbohidratos ricos en inulina utilizado en este trabajo. Un modo de mejorar el rendimiento de extracción de carbohidratos ricos en inulina del tubérculo sería empleando ultrasonido para facilitar la liberación de la misma. Por otra parte, se podría utilizar ultrafiltración como método para clarificar el extracto de inulina en lugar del tratamiento con cal-carbonatación y carbón activado, que es laborioso y requiere mucho tiempo.

Cabe considerar otras alternativas para la obtención de inulina de topinambur de un grado de polimerización promedio determinado, como podría ser la utilización de la técnica de inmovilización de enzimas. Esta metodología podría reducir los costos generados durante el almacenamiento prolongado de los tubérculos. Como complemento a los datos de carbohidratos ricos en inulina obtenidos de tubérculos de topinambur, podría estudiarse su distribución de pesos moleculares, que enriquecería el conocimiento sobre la actividad enzimática específica del tubérculo durante su almacenamiento.

Por otra parte, sería interesante considerar el procedimiento de liofilización utilizado en el presente trabajo, para la obtención de harina de tubérculos de topinambur aplicable en la industria alimenticia (incorporación a sopas en polvo, en formulaciones de comidas preparadas deshidratadas, etc).

Numerosos trabajos reportan un comportamiento diferencial de las bacterias probióticas frente a un sustrato prebiótico, por lo cual podría ser de interés ampliar el estudio de capacidad prebiótica utilizando otras cepas probióticas, de modo de poder establecer la combinación apropiada para el desarrollo de un alimento funcional que contenga en su formulación un prebiótico y un probiótico. El ensayo de capacidad prebiótica realizado bajo condiciones *in vitro*, podría ser complementado con estudios *in vivo*, considerando sus limitaciones.

Con referencia a la segunda gran línea, el presente trabajo podría ser utilizado como punto de partida para estudiar la aplicación de inulina de topinambur como reemplazante de la materia grasa en la formulación de panificados y comparar con una formulación semejante con inulina comercial obtenida de achicoria. También sería de interés investigar el efecto de la inulina de topinambur sobre la digestibilidad del

almidón y en consecuencia sobre el índice glucémico de los panes con carbohidratos ricos en inulina, dada la creciente demanda de alimentos con bajo índice glucémico y el aumento de casos de diabetes en la población.

Aún quedan pendientes estudios sobre el efecto de la formulación de panificados con carbohidratos ricos en inulina sobre:

- el comportamiento durante su almacenamiento, considerando que podría haber un retardo en la retrogradación de la amilopeptina, que se refleje en un menor endurecimiento del pan;
- la reología y estructura de masas congeladas, dado que la inulina interviene en la formación de cristales de hielo generando cristales pequeños, lo cual evitaría el daño mecánico y podría contribuir a la preservación de las características de la masa;
- la calidad del pan con la incorporación de enzimas pentosanasas (como es el volumen específico, la firmeza y la masticabilidad de la miga) para minimizar los efectos negativos de la incorporación de porcentajes elevados de inulina de topinambur sobre el volumen específico y la firmeza.

El desarrollo de estos estudios potenciaría el interés de la industria de panificados en la incorporación de fibra soluble obtenida de topinambur, conjuntamente con el beneficio de poder elaborar el pan con la tecnología de masas congeladas, que brinda al consumidor un producto fresco y recién horneado.

Otro trabajo que podría desprenderse de la presente tesis es el estudio de formulaciones del pan con combinaciones de carbohidratos ricos en inulina y harinas de trigo de distintas calidades, con el objeto de modificar la tenacidad de las masas y mejorar su comportamiento durante el amasado. Esto podría ser una buena alternativa para aprovechar harinas de calidad inferior para elaborar productos panificados funcionales de calidad aceptable.

Finalmente, así como se estudió la incorporación de inulina de topinambur en la formulación de panes, quedaría pendiente analizar su incorporación en una amplia diversidad de alimentos. En este sentido, está previsto continuar trabajando en el desarrollo de queso ricota entero y bajo en grasa, enriquecido con inulina de topinambur, para estudiar los aspectos tecnológicos, características nutricionales, sensoriales y reológicas del producto funcional elaborado.