



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

**EFFECTO DE *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* Y
Propionibacterium freudenreichii SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS, FACTORES ANTINUTRICIONALES Y CARACTERÍSTICAS
SENSORIALES DE QUESO DE LECHE DE SOYA MADURADO**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M.C. CLAUDIA MENDOZA AVENDAÑO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

JULIO 2020



“2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata”

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas **11/septiembre/2020.**

OFICIO No. DEPI-573/2020.

**C. M.C. CLAUDIA MENDOZA AVENDAÑO
PASANTE DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ
PRESENTE.**

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC.DR. MIGUEL ABUD, DRA. ALICIA GRAJALES LAGUNES, DRA. MARIA CELINA LUJAN HIDALGO, DRA SANDY LUZ OVANDO CHACÓN, DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO en el sentido de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada “EFECTO DE Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum Y propionibacterium freudenreichill SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS, FACTORES ANTINUTRICIONALES Y CARACTERISTICAS SENSORIALES DE QUESO DE LECHE DE SOYA MADURADO”, elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Doctora en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

SIN MAS POR EL MOMENTO ENVIO UN CORDIAL SALUDO.

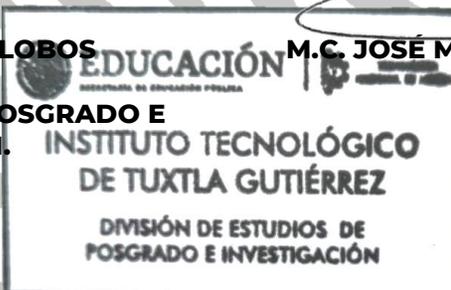
ATENTAMENTE.

Vo. Bo.

*Excelencia en Educación Tecnológica
Ciencia y Tecnología con Sentido Humano*

**DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS
MALDONADO
JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E
INVESTIGACION.**

**M.C. JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ
DIRECTOR.**



C.c.p. Servicios escolares
C.c.p. Archivo



AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada (445964) para la realización del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología.

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento otorgado (6361.17-P y 5651.19-P) para el desarrollo del proyecto.

Al doctor Miguel Abud Archila por aceptar dirigir este proyecto, por sus consejos, revisiones y el apoyo en el trabajo. Por apoyarme en cada etapa, por siempre confiar en mí y motivarme durante todos estos años.

A mis revisoras: la doctora Sandy Luz Ovando Chacón, la doctora Rocío Meza-Gordillo y la doctora María Celina Luján Hidalgo. Gracias por todas las observaciones y consejos durante el desarrollo de mi formación y del proyecto.

A Kevin, Alejandra, Lili, y Lupita, por su valioso apoyo para la realización de este proyecto.

A mi familia, por apoyarme durante todo este tiempo y por no dejarme caer. Y sobre todo gracias a ti ♡.

RESUMEN

La leche de soya es un alimento rico en proteínas, compuestos fenólicos y libre de lactosa. Sin embargo, por sus características organolépticas y la presencia de compuestos antinutricionales su consumo es poco popular entre la población de países occidentales. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG, *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG y *Propionibacterium freudenreichii* para reducir el contenido de factores antinutricionales, incrementar la producción de compuestos bioactivos y mejorar las características organolépticas de queso de leche de soya madurado. En una primera etapa la leche de soya fue fermentada 24 h con *L. plantarum* y *L. fermentum* por separado, evaluando los cambios en la actividad de la α -galactosidasa y β -glucosidasa, así como del contenido de fitatos, isoflavonas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la leche de soya durante la fermentación. Después de la fermentación de la leche de soya, el crecimiento microbiano incrementó 1.2 y 1.4 log UFC/g para ambas cepas. Los resultados mostraron que ambas cepas son capaces de producir las enzimas α -galactosidasa y β -glucosidasa, además de convertir las isoflavonas β -glucósidos en sus correspondientes agliconas, con un incremento del 420-490%. Además, mediante la fermentación de la leche de soya se logró disminuir el 20% del contenido de fitatos. Posteriormente, los quesos de soya fueron obtenidos mediante la fermentación de leche de soya durante 8 h con *L. plantarum*, *L. fermentum*, con o sin la adición posterior de *P. freudenreichii*. Se utilizó queso de soya elaborado con ácido láctico como control. Se determinó el número de microorganismos probióticos presentes en los quesos de soya a los 0, 20 y 40 días de maduración a 15°C, de acuerdo a la metodología de la NOM-121-SAA1-1994. Además, el contenido de ácido láctico y acético así como el perfil de compuestos volátiles también fueron determinados en el queso de soya. Los microorganismos *L. plantarum*, *L. fermentum* y *P. freudenreichii* sobrevivieron a una concentración mayor a 7 log UFC/g después de 40 d en quesos obtenidos mediante fermentación y cumplen con lo especificado en la norma NOM-121-SSA1-1994. Sin embargo, el queso control presentó cuentas microbianas indeseables antes de los 20

días. Después de 40 d de maduración, en los quesos de soya obtenidos mediante fermentación de la leche de soya, el contenido de hexanal fue 96% menor que en los quesos de soya recién elaborados (tiempo cero). Sin embargo, los resultados de la evaluación sensorial indicaron que no existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos. El queso de soya obtenido por fermentación con los microorganismos estudiados, así como la metodología usada, permiten obtener queso de soya madurado con mejor perfil de compuestos volátiles que el queso control. Estos resultados sugieren que este queso tenga mejor aceptación que el elaborado mediante acidificación. Sin embargo, es necesario realizar un estudio sensorial detallado utilizando jueces entrenados para evidenciarlo.

Palabras clave: antioxidantes, alimento funcional, isoflavonas, factores antinutricionales

ABSTRACT

Soy milk is a food that is high in protein, phenolic compounds and lactose free. However, due to its organoleptic characteristics and the presence of antinutritional compounds, its consumption is not very popular among the population of western countries. The aim of this study was to evaluate the potential of *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG, *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG and *Propionibacterium freudenreichii* to reduce the content of anti-nutritional factors, increase the production of bioactive compounds and improve the organoleptic characteristics of soy cheese ripened. In a first stage, soy milk was fermented for 24 h with *L. plantarum* and *L. fermentum* separately, evaluating the changes in the activity of the α -galactosidase and β -glucosidase, the content of phytates, isoflavones, phenolic compounds and antioxidant activity of soy milk during fermentation. After soy milk fermentation, the growth was increased from 1.2 to 1.4 log CFU/g for both strains. The results showed that both strains are capable of producing the α -galactosidase and β -glucosidase enzymes, in addition to converting the β -glucoside isoflavones into their corresponding aglycones, with an increase of 420-490%. In addition, by fermenting soy milk, approximately 20% of the phytate content could be decreased. After, soy cheeses were obtained by fermenting soy milk with *L. plantarum*, *L. fermentum* with or without the subsequent addition of *P. freudenreichii* during 8 h. Soy cheese made with lactic acid was used as a control. The number of microorganisms in cheese were determined at 0, 20 and 40 d of ripening at 15°C. In addition, the lactic, acetic acid content as well as the sensory and volatile compounds profile of soy cheese were determined. The microorganisms *L. plantarum*, *L. fermentum* and *P. freudenreichii* survived at a concentration greater than 7 log CFU/g after 40 d of ripening and these cheeses meet the standard of NOM-121-SSA1-1994 Mexican test. However, control cheese had undesirable microbial counts before 20 d. After 40 d, with fermentation of soy milk, the hexanal content in soy cheeses was reduced by 96% compared to freshly made tofu. However, the results of the sensory evaluation indicated that there is no significant statistical difference ($p > 0.05$) between treatments. Soy cheeses obtained by fermentation with *L. plantarum*, *L. fermentum* and *P. freudenreichii*, as well as the

technology used, allowed to obtain soy cheese with better volatil profile than the control cheese. That results suggested that soy cheese fermented could be more attractive to the consumer. However, a detailed sensory study using trained judges is necessary to demonstrate this.

Key words: antioxidants, functional food, isoflavones, anti-nutritional factors.

CUADRO DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Probióticos	5
2.1.1 Beneficios obtenidos por el consumo de alimentos probióticos	5
2.1.2 Fuentes de aislamiento de probióticos.....	6
2.2 Alimentos funcionales	8
2.3 Soya.....	9
2.3.1 Composición química.....	10
2.3.2 Usos de la soya	11
2.3.3 Leche de soya	11
2.3.3.1 Composición química de la leche de soya	13
2.3.3.1.1 Compuestos bioactivos	13
2.3.3.1.2 Factores antinutricionales	15
2.3.3.2 Alimentos funcionales a partir de leche de soya	17
2.4 Queso de soya	20
2.4.1 Métodos de preparación	20
2.5 Maduración de quesos.....	22
2.5.1 Efecto de la maduración sobre las propiedades nutricionales y sensoriales	22
2.5.2 Uso de co-cultivos en la maduración de quesos.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo general	28
4.2 Objetivos específicos	28
5. METODOLOGÍA.....	29
5.1 Microorganismos.....	29

5.2 Preparación de leche de soya.....	29
5.3 Fermentación de leche de soya	30
5.3.1 Determinación de inhibidores de tripsina	30
5.3.2 Determinación del crecimiento celular y pH.....	31
5.3.3 Determinación de actividad α -galactosidasa.....	32
5.3.4 Determinación de actividad β -glucosidasa.....	33
5.3.5 Evaluación de isoflavonas	33
5.3.6 Actividad antioxidante	34
5.3.7 Determinación de fitato	35
5.3.8 Diseño experimental y análisis estadístico	36
5.4 Elaboración y maduración de queso de soya	36
5.4.1 Evaluación de la sobrevivencia de <i>Lactobacillus</i> sp. y <i>P. freudenreichii</i> durante la maduración	37
5.4.2 Determinación de fenoles totales.....	37
5.4.3 Determinación de actividad antioxidante	38
5.4.4 Determinación de compuestos volátiles durante la maduración	38
5.4.5 Determinación de isoflavonas durante la maduración	39
5.4.6 Cuantificación de ácido láctico y ácido acético durante la maduración..	40
5.4.7 Análisis sensorial	40
5.4.8 Diseño experimental y análisis estadístico	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1 Fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> y <i>L. fermentum</i>	42
6.1.1 Determinación de inhibidores de tripsina y fitatos en leche de soya.....	42
6.1.2 Crecimiento celular y pH durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas	44
6.1.3 Actividad α -galactosidasa durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas	45
6.1.4 Actividad β -glucosidasa y contenido de isoflavonas durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas	47

6.1.5 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en la leche de soya fermentada con bacterias ácido lácticas	51
6.1.6 Contenido de fitato durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas.....	54
6.2 Queso de soya	57
6.2.1 Sobrevivencia de <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> y <i>P. freudenreichii</i> en queso de soya durante su maduración.....	57
6.2.2 Concentración de ácido láctico y ácido acético en el queso de soya durante su maduración	61
6.2.3 Contenido de fitato durante la maduración de queso de soya.	64
6.2.4 Contenido de isoflavonas durante la maduración de queso de soya	65
6.2.5 Fenoles totales y actividad antioxidante en queso de soya durante la maduración	69
6.2.6 Evolución de compuestos volátiles en queso de soya durante la maduración.....	72
6.2.7 Evaluación sensorial.....	81
7. CONCLUSIONES.....	83
8. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS	84
9. BIBLIOGRAFÍA	85

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 5.1 Diseño experimental para la elaboración de queso de soya.....	41
Cuadro 6.1 Concentración de inhibidores de tripsina en leche de soya	42
Cuadro 6.2 Concentración de fitatos en leche de soya	43
Cuadro 6.3 Concentración de isoflavonas durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i>	48
Cuadro 6.4 Concentración de isoflavonas durante la fermentación de leche de soya con <i>L. fermentum</i>	50
Cuadro 6.5 Reducción de fitato durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> y <i>L. fermentum</i>	54
Cuadro 6.6 Crecimiento celular de <i>P. freudenreichii</i> durante la maduración del queso de soya.....	58
Cuadro 6.7 Contenido de sólidos totales en los quesos de soya durante 40 días de maduración	60
Cuadro 6.8 Contenido de ácido láctico de los quesos de soya durante la maduración	62
Cuadro 6.9 Contenido de fitato en quesos de soya durante su maduración.....	65
Cuadro 6.10 Contenido de isoflavonas en los quesos de soya al inicio de la maduración.....	66
Cuadro 6.11 Concentración de isoflavonas en los quesos de soya después de 20 días de maduración.....	69
Cuadro 6.12 Contenido fenoles totales en los quesos de soya durante la maduración	70
Cuadro 6.13 Compuestos volátiles en los quesos obtenidos por los diferentes tratamientos al inicio del almacenamiento	75
Cuadro 6.14 Análisis sensorial del queso de soya.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Producción de hexanal a través de la ruta de la lipoxigenasa.....	12
Figura 2.2 Estructura de isoflavonas agliconas.	14
Figura 2.3 Conversión de isoflavonas β -glucósidos a agliconas	19
Figura 2.4 Conversión de aldehídos a alcoholes y ácidos.....	21
Figura 2.5 Ruta metabólica de <i>Propionibacterium</i> para la producción de ácido propiónico y ácido acético.....	25
Figura 6.1 Crecimiento celular (\blacklozenge) y pH (\blacksquare) durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> , crecimiento celular (\bullet) y pH (\blacktriangle) durante la fermentación de leche de soya con <i>L. fermentum</i>	44
Figura 6.2 Actividad α -galactosidasa durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> (\blacklozenge) y <i>L. fermentum</i> (\bullet).....	46
Figura 6.3 Actividad β -glucosidasa durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> (\blacklozenge) y <i>L. fermentum</i> (\bullet).....	47
Figura 6.4 Mecanismo de reacción de la enzima β -glucosidasa.	49
Figura 6.5 Contenido de fenoles totales durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> (\blacksquare) y <i>L. fermentum</i> (\square).....	51
Figura 6.6 Formación de vinilfenoles.....	52
Figura 6.7 Actividad antioxidante de los extractos hidrofílicos y lipofílicos durante la fermentación de leche de soya con <i>L. plantarum</i> y <i>L. fermentum</i>	53
Figura 6.8 Crecimiento celular de <i>L. fermentum</i> y <i>L. plantarum</i> durante la maduración del queso de soya.	57
Figura 6.9 Concentración de ácido acético durante la maduración del queso de soya.	63
Figura 6.10 Cambios en el pH durante la maduración de queso de soya.....	64
Figura 6.11 Evolución del contenido de β -glucósidos y agliconas durante 20 d de maduración	67
Figura 6.12 Actividad antioxidante durante la maduración del queso de soya.....	71

Figura 6.13 Reacciones enzimáticas que conducen a la formación de aldehídos en soya.....	73
Figura 6.14 Evolución de aldehídos, alcoholes y ácidos durante la maduración.....	76
Figura 6.15 Contenido de hexanal en los quesos de soya después de 40 d de maduración.	78
Figura 6.16 Contenido de ácido hexanoico en los quesos de soya después de 40 d de maduración.	78
Figura 6.17 Contenido de ácido 3-hexenoico en los quesos de soya después de 40 d de maduración.	79
Figura 6.18 Reacciones enzimáticas que conducen a la formación de ácido 3-hexenoico.....	80

1. INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max*) se ha utilizado en varios países en desarrollo como un componente nutricional importante debido a los efectos benéficos (hipolipemiente, anticolesterolémico, reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, entre otros) que provoca en la salud de los consumidores, los cuales se deben principalmente a la presencia de compuestos bioactivos, como: isoflavonas, péptidos con actividad antioxidante y compuestos fenólicos (Chen *et al.*, 2012; Bedani *et al.*, 2013).

Una amplia variedad de productos de soya son comercializados, principalmente: tofu, yogurt de soya, helado de soya, salsa de soya, harina de soya, entre otros. Sin embargo, su consumo en el occidente se ve limitado por su sabor, debido a la presencia de compuestos volátiles (hexanal, 2-hexanal, nonanal, etc.) que imparten el característico sabor indeseable de la soya (Kaneko *et al.*, 2014). Además, los productos elaborados a partir de soya pueden contener compuestos antinutricionales, principalmente fitatos, inhibidores de tripsina y oligosacáridos no digeribles tales como rafinosa y estaquiosa, que usualmente se asocian con malestar estomacal (MacDonald *et al.*, 2012; Gemedé y Ratta, 2014), por lo cual, es importante la búsqueda de estrategias que permitan mejorar los atributos de estos productos.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son ampliamente utilizadas en la fabricación de alimentos debido a que contribuyen a desarrollar el sabor, aroma, mejorar la digestibilidad y aceptabilidad de los alimentos (yogur, quesos, etc.), además de aumentar la vida útil de los productos a través de la producción de compuestos antibacteriales (Bedani *et al.*, 2013; Mishra y Mishra, 2015). La leche de soya constituye un medio para el cultivo de BAL, debido a la presencia de proteínas, y azúcares tales como: sacarosa, rafinosa y estaquiosa, que son fermentadas por la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* (Rekha y Vijayalakshmi, 2011). La hidrólisis de estos oligosacáridos requiere la actividad de la enzima α -galactosidasa, que hidroliza el enlace α -galactósido presente en estos azúcares no digeribles (Hati *et al.*, 2014; Baú *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, existen reportes que indican que la fermentación con BAL se ha utilizado como una estrategia para

reducir los compuestos antinutricionales (fitatos, inhibidores de tripsina y oligosacáridos) en productos a base de soya (Gao *et al.*, 2013; Obadina *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2014). Así también, mediante la fermentación de la soya, es posible incrementar la producción de compuestos bioactivos, entre ellos las isoflavonas agliconas y la actividad antioxidante (Zhao y Shah, 2014; Xiao *et al.*, 2015). No obstante, es necesario realizar más estudios con diferentes cepas con la finalidad de determinar si el comportamiento en la reducción de factores antinutricionales y formación de compuestos bioactivos en la leche de soya depende o no de la cepa empleada y de su fuente de obtención.

A pesar de sus grandes atributos nutricionales, la soya es poco consumida por personas del occidente siendo el principal obstáculo en el consumo de los productos de soya la textura, el aspecto visual y el sabor a frijol (Li *et al.*, 2017). Por lo anterior, para mejorar la aceptación de productos de soya, diversos autores han desarrollado alimentos que intentan imitar las características de textura y aspecto visual de otros productos aceptados por la mayoría de las personas, principalmente yogurt (Mishra y Mishra, 2015) y queso (Serrazanetti *et al.*, 2013). En muchos países se han fabricado quesos de soya utilizando la adición de sales para la producción del gel, sin embargo, la textura y sabor de los productos finales es poco satisfactoria comparados con los obtenidos mediante fermentación (Serrazanetti *et al.*, 2013). Es así como el uso de co-cultivos para la elaboración de alimentos fermentados de soya, constituyen una alternativa para favorecer la producción de compuestos aromáticos y mejorar la aceptación global de los quesos de soya. Wu *et al.* (2012) reportaron que *Propionibacterium freudenreichii* fue capaz de crecer en leche de soya, consumiendo el 69% de ácido láctico producido por *Bifidobacterium adolescentis* (Wu *et al.*, 2012) desarrollando características sensoriales particulares en estos productos. Sin embargo, el uso de *Propionibacterium* únicamente se ha evaluado en la fermentación de leche de soya y no se ha demostrado su efecto en la elaboración de queso de soya. Aunque se han propuesto métodos para la eliminación de aromas no deseados (tratamientos térmicos, alteración genética de la soya y adición de saborizantes), la mayoría de estos métodos tienen aspectos negativos como la interferencia de la

funcionalidad de las proteínas y el desarrollo de otros atributos sensoriales negativos. Una estrategia para solucionar el sabor desagradable de los productos de soya, es la fermentación con BAL. Mediante la fermentación de soya con estas bacterias, se pueden reducir los compuestos volátiles que son responsables del sabor a frijol (hexanal, 2-hexanal, entre otros) (Kaneko *et al.*, 2014) y mejorar sus características sensoriales (Serrazanetti *et al.*, 2013). Feng *et al.* (2014) reportaron que los lípidos tienen un papel importante en la formación de aromas en productos fermentados de soya. Sin embargo, existe poca información sobre la relación del desarrollo de compuestos volátiles y los cambios en la composición de lípidos en queso madurado de soya elaborado mediante fermentación.

La fermentación de la leche de soya con BAL para la producción de queso madurado de soya, surge como una alternativa para su aprovechamiento, ya que mediante la fermentación es posible mejorar el sabor y textura de estos alimentos, así como incrementar la producción de compuestos bioactivos y mejorar las propiedades benéficas para la salud (Zhao y Shah, 2014; Baú *et al.*, 2015). Por lo tanto, la búsqueda y la evaluación de nuevas cepas para la producción de alimentos fermentados de soya es de gran relevancia. En el 2012, González-Escobar evaluó el potencial probiótico de 24 bacterias ácido lácticas aisladas de la taberna, reportando la presencia de BAL capaces de crecer a concentraciones de orden de 10^9 UFC/mL con tiempos de duplicación cortos (1.16-1.49 h) y capaces de sobrevivir a la digestión simulada alcanzando una supervivencia por arriba del 60%, además de ser capaces de fermentar rafinosa, carbohidrato presente en la soya, el cual puede causar malestar estomacal. En la evaluación *in vivo* estas cepas demostraron además ser capaces de reducir los niveles de colesterol sérico y triglicéridos en un 33.9 y 15.88%, respectivamente (Ramírez-Torres, 2015), lo que permitió sugerirlas como posibles probióticos.

Aunque ya ha sido reportada la producción de queso de soya obtenido mediante fermentación de leche de soya con BAL, la mayoría de estas investigaciones se basan únicamente en las características sensoriales y parámetros de textura de estos alimentos. Por lo cual, la evaluación de factores antinutricionales y formación de

compuestos bioactivos durante el proceso de elaboración de queso de soya elaborado a partir de leche de soya fermentada ha sido poco estudiada. Además, el uso de *Propionibacterium freudenreichii* para la producción de queso madurado de soya no se ha reportado. Por lo anterior, el desarrollo de esta investigación contribuirá a generar conocimiento sobre los cambios fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales durante el proceso de maduración de queso de soya. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG, *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG y *Propionibacterium freudenreichii* para la producción de queso madurado de soya con mayor contenido de compuestos bioactivos y características organolépticas atractivas para el consumidor.

2. ANTECEDENTES

2.1 Probióticos

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped" (FAO/OMS, 2002). A través de los años, muchas especies de microorganismos han sido utilizados como probióticos, entre ellas las bacterias ácido lácticas. Estos microorganismos generalmente fueron aislados de diferentes tipos de fuentes: de la flora natural de los humanos, de carnes, frutas y alimentos fermentados, entre otros. Las bacterias ácido lácticas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados, predominando el género *Lactobacillus*. Debido a la importancia de estos microorganismos, se ha optado por la búsqueda de nuevas fuentes alternativas para su obtención, principalmente microorganismos aislados de alimentos fermentados (Nawaz *et al.*, 2011).

2.1.1 Beneficios obtenidos por el consumo de alimentos probióticos

El consumo de probióticos se ha asociado a muchos beneficios para la salud en humanos. Algunos probióticos tienen efectos benéficos contra enfermedades del tracto gastrointestinal, control de infecciones en el tracto urogenital, disminución en la incidencia de diarreas, disminución de colesterol sérico y enfermedades cardiacas, así como en la estimulación del sistema inmune y movimiento intestinal (Gupta y Garg, 2009; Narayan *et al.*, 2010).

Varias especies de *Lactobacillus* han sido científicamente establecidas y/o clínicamente probadas en cuanto a sus efectos en la salud, tales como la reducción y prevención de la diarrea (McFarland, 2006; Kale-Pradhan *et al.*, 2010). Algunos de los productos comerciales disponibles para combatir tales diarreas son: productos lácteos fermentados como el yogurt, leches pasteurizadas, tabletas y cápsulas que contienen células vivas ($\geq 10^6$ UFC/mL) de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium* spp, entre otras especies (Ray, 1996).

2.1.2 Fuentes de aislamiento de probióticos

Los probióticos generalmente han sido aislados de diferentes tipos de fuentes, tales como: la flora normal de los humanos (boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino) y de muchos animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Ogueke, 2010).

Por otra parte se han aislado microorganismos probióticos de la leche materna recolectada asépticamente (Martín *et al.*, 2009) y de las heces de los lactantes (Martín *et al.*, 2003). Otra fuente de probióticos es el tracto gastrointestinal de humanos, de hecho, muchas de las cepas probióticas utilizadas en la actualidad son aisladas de esta fuente (Ryan *et al.*, 2008).

Los productos lácteos son otra una fuente de aislamiento de bacterias probióticas, la mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados, predominando los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ogueke, 2010). Existen reportes que evalúan los productos fermentados tradicionales como posibles fuentes naturales de bacterias probióticas. Se han aislado BAL probióticas de masas fermentadas (Ayeni *et al.*, 2011), de quesos (Zago *et al.*, 2011).

Otros estudios reportan que bacterias probióticas también son aisladas de sustratos fermentados no lácteos, como la carne, frutas, aceitunas y encurtidos (Rivera-Espinoza *et al.*, 2010), demostrando propiedades como reducción del colesterol, tolerancia a ácidos y bilis y actividad antimicrobiana (Fontana *et al.*, 2013).

Sin embargo, la importancia que han adquirido los probióticos en los últimos años ha incrementado su demanda, por esa razón se ha optado por la búsqueda de nuevas fuentes alternativas para su obtención, así como el interés de usar bacterias ácido lácticas aisladas de productos fermentados naturalmente (Nawaz *et al.*, 2011).

En el sureste mexicano, la taberna es una bebida fermentada obtenida de la savia de palma *Acrocomia aculeata* mejor conocida como palma de coyol (Alcántara *et al.*, 2010). Esta bebida se produce por la fermentación de la savia del tallo de la palma adulta. Al consumo de esta bebida se le han atribuido propiedades medicinales, entre las cuales destacan su capacidad desinflamante y cicatrizante de úlceras estomacales

(Rodríguez-Álvarez, 2011). La presencia de BAL en la taberna fue investigada mediante el empleo de técnicas tradicionales y mediante el análisis e identificación con técnicas moleculares (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010). En el 2012, Alegría-Mundo, mediante un análisis molecular, evaluó la dinámica poblacional de bacterias ácido lácticas que participan en el proceso de fermentación natural de la savia de la palma de *Acrocomia aculeate*. Muestreos de taberna durante los primeros 5 días de fermentación permitieron aislar al menos 35 BAL. Posteriormente se realizó la identificación mediante biología molecular de estas bacterias, reportando la presencia de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG (Mendoza-Avendaño, 2015; Ramírez-Torres, 2015). González-Escobar (2013) realizó la evaluación *in vitro* del potencial probiótico de las BAL aisladas de la taberna para seleccionarlas por su capacidad de crecimiento, supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas, capacidad de disociación de taurocolato de sodio, producción de ácido láctico, producción de exopolisacáridos, fermentación de azúcares y actividad antimicrobiana. Los resultados reportaron que estas bacterias mostraron un crecimiento de 9.67 ± 0.01 log UFC/mL (4.69×10^9 UFC/mL) con una velocidad específica de crecimiento promedio de 0.46 ± 0.01 h⁻¹, y tiempo de duplicación promedio de 1.49 ± 0.01 h. En la prueba de fermentación de azúcares se encontró que las BAL fueron capaces de fermentar rafinosa. El estudio también reporta la producción de ácido láctico por las BAL a concentraciones de 19-22.95 g/L con porcentajes de conversión de glucosa de 86.50-96.79%. Todas las BAL evaluadas fueron capaces de desconjugar el taurocolato de sodio y las sales biliares, lo que sugiere que estas cepas son capaces de reducir el colesterol de la sangre utilizando este mecanismo. *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG fue capaz de crecer a concentraciones de 9.55 ± 0.56 log UFC/mL (3.54×10^9 UFC/mL), con una producción de ácido láctico de 18.06 ± 1.26 g/L y una supervivencia a la simulación gastrointestinal por arriba del 60% (Mendoza-Avendaño *et al.*, 2015). Posteriormente, Ramírez-Torres (2015) realizó la evaluación de las características probióticas *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG. Los resultados reportaron que la administración de *Lactobacillus plantarum* a ratones hipercolesterolémicos redujo los niveles de

colesterol sérico total y triglicéridos en sangre en un 33.9% y 15.88% respectivamente. Además, en este estudio se demostró que es una cepa segura y susceptible de ser empleada para el consumo humano. Debido a estos atributos encontrados en las cepas aisladas de la taberna se puede decir que éstas tienen un gran potencial probiótico, sin embargo, el potencial biotecnológico de estas BAL en la elaboración de alimentos fermentados no ha sido reportado.

2.2 Alimentos funcionales

En los últimos años se ha desarrollado un creciente interés por el consumo y producción de alimentos que ayuden a mejorar la salud, mediante la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. De ahí surge el término “alimento funcional” el cual se refiere a un alimento que además de proporcionar nutrientes, proporciona un efecto benéfico sobre la salud y reduce el riesgo de enfermedades de quien los consume. Este término también se puede aplicar a aquellos alimentos que contienen prebióticos y/o probióticos (Granato *et al.*, 2010). Entre los alimentos funcionales más populares destacan aquellos que contienen probióticos. Las aplicaciones alimentarias para los probióticos se encuentran principalmente en productos lácteos, como yogurt, bebidas, quesos, helados, barras nutritivas, cereales, fórmulas infantiles, entre otros (Granato *et al.*, 2010). Sin embargo, la mayoría de estos alimentos son productos pertenecientes al sector lácteo. A pesar de lo anterior, factores como la preferencia por comida vegetariana o la intolerancia a la lactosa ha estimulado el uso de materias primas no lácteas. Aunado a lo anterior, la alergia a los productos lácteos afecta negativamente a muchas personas en todo el mundo (alrededor del 75% de la población) (Solomons, 2002). En México se reportó que en 2014, alrededor del 83% de la población padecía de intolerancia a la lactosa (IMSS, 2014). Debido a que no existe un tratamiento que pueda aumentar la capacidad de producción de lactasa, los síntomas ocasionados por el consumo de lactosa deben ser controlados por la dieta, ya sea consumiendo sustitutos de la leche o productos alternativos disponibles en el mercado. Esto ha inducido a realizar investigaciones

sobre el desarrollo de alimentos no lácteos portadores de probióticos para atraer una gama amplia de consumidores (Granato *et al.*, 2010).

2.3 Soya

La soya (*Glycine max*) es una semilla perteneciente a la familia de las leguminosas, generalmente esférica de 8 a 10 mm de diámetro y de color amarillo. En promedio, los granos de soya contienen aproximadamente 40-41% de proteínas, 35% de carbohidratos, 8-24% de aceites y 5% de cenizas en base seca (Medic *et al.*, 2014).

Numerosos estudios realizados con animales y seres humanos demostraron que el consumo de esta semilla y sus derivados tiene efectos importantes en mejorar la salud de las personas que la consumen, principalmente en el tratamiento de enfermedades del corazón, huesos y en la disminución de los síntomas de la menopausia (Day *et al.*, 2013; Coscueta *et al.*, 2016). Debido a la presencia de compuestos bioactivos y sus propiedades como antioxidante, antihipertensivo, hipocolesterolémico, entre otros, en los últimos años se ha presentado un gran desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento en la producción de alimentos (quesos, yogurt, harina) (Chen *et al.*, 2012; Day *et al.*, 2013; Coscueta *et al.*, 2016).

Esta leguminosa es originaria del este de Asia, sin embargo, gracias al intercambio cultural y el empleo de la soya como símbolo de la alimentación vegetariana/ vegana, la preparación y consumo de alimentos a base de esta leguminosa, así como su cultivo se ha extendido a otras partes del mundo (Riciputi *et al.*, 2016). El mayor productor de soya es Estados Unidos, con un 34% de la producción mundial, seguido de Brasil y Argentina con el 29 y 19% respectivamente (Medic *et al.*, 2014). En México se produjeron aproximadamente 432,927.48 toneladas en el 2017, siendo el quinto mayor productor Chiapas con 24,049 toneladas. En México se cultiva principalmente para la elaboración de alimentos para animales y para el consumo humano, en este último se utiliza en mayor medida para la elaboración de harinas y obtención de aceite, el cual se emplea para la producción de margarinas, mantequillas y chocolate (SIAP, 2018).

2.3.1 Composición química

Las semillas de soya contienen en promedio 40-41% (en base seca) de proteína, las cuales se pueden clasificar en cuatro grupos según su función: enzimas, proteínas estructurales, de membrana y de almacenamiento. Las proteínas de almacenamiento representan el 65-80% del total de proteínas de la semilla. Las principales proteínas de almacenamiento de estas semillas son la glicinina y β -conglucina. Además de las proteínas de almacenamiento, la soya contiene proteínas de baja abundancia responsables de la movilización de nutrientes o de la defensa contra los macro y microorganismos, entre ellas se encuentran los inhibidores de tripsina y la enzima lipoxigenasa, que cataliza la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados lo que conlleva al desarrollo de la rancidez y el sabor afrijolado (Krishnan, 2001; Medic *et al.*, 2014).

Los lípidos representan alrededor del 8-24% del peso de la semilla, funcionan principalmente como reserva de energía para la planta y constituyentes de las membranas. Los principales ácidos grasos presentes en la soya son el ácido linoleico (18:2), seguido del ácido oleico (18:1), ácido palmítico (16:0), ácido linolénico (18:3) y ácido esteárico (18:0) (Peñalvo *et al.*, 2004). También se ha reportado la presencia de tocoferoles, los cuales sirven como defensa para proteger las membranas biológicas contra el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados. Inhiben la peroxidación lipídica al eliminar las especies reactivas de oxígeno y los radicales peroxilo y, por lo tanto, evitan que reaccionen con los lípidos (Medic *et al.*, 2014). En la soya se reporta la presencia de carbohidratos estructurales los cuales son polisacáridos de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas) y carbohidratos no estructurales (oligosacáridos). Las semillas de soya contienen alrededor de 11-25% de carbohidratos solubles, los azúcares solubles más abundantes son sacarosa (1.1-7.4%), estaquiosa (1.2-6.9%), rafinosa (0.1-1.4%), glucosa (0.003-2.4%) y fructosa (0.03-2.5%) (Medic *et al.*, 2014). La rafinosa y la estaquiosa se consideran factores antinutricionales debido a que su consumo está asociado a alteraciones digestivas en humanos (Hati *et al.*, 2014).

2.3.2 Usos de la soya

La soya es ampliamente utilizada para producir alimentos como, la leche de soya, salsa de soya, tempeh, tofu, entre otros. Los alimentos producidos con soya han formado parte durante muchos años de la alimentación de los países orientales (Villares *et al.*, 2011). En los países occidentales, la soya se procesa principalmente para la producción de harina de soya que sirve como una fuente de proteína, la cual se utilizan como componente de alimentos para animales o para la producción de proteína texturizada, concentrado de soya y aislado de soya. Estos productos se utilizan como ingredientes en la elaboración de fórmulas infantiles, productos cárnicos y sustitutos de productos cárnicos, bebidas de proteínas, bases para sopa, etc. Mientras que el aceite es utilizado para usos alimentarios y para la producción de biodiesel (Friedman *et al.*, 2001; Graef *et al.*, 2009; Medic *et al.*, 2014).

El consumo de productos a base de soya se ha incrementado paulatinamente, no solo por su alto valor nutricional, sino también por sus beneficios en la salud, como la reducción de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y cáncer (Al-Wahsh *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso de la soya como materia prima para la elaboración de alimentos en los países occidentales muchas veces está limitado por su sabor a “frijol/pasto” (Krishna *et al.*, 2003).

2.3.3 Leche de soya

Uno de los productos comúnmente elaborados a partir del grano de soya es la leche de soya, la cual es un líquido blanquecino que se elabora mediante el remojo (en agua) de la semilla, seguida de la molienda y posterior separación del líquido de los residuos (Day, 2013; Mishra y Mishra, 2013). Sin embargo, su consumo se ve limitado por su sabor, debido a la presencia de compuestos volátiles que imparten el característico sabor indeseable del frijol (Kaneko *et al.*, 2014). Estos sabores indeseables (frijol, verde, hierba, astringente, amargo) están asociados con productos derivados de la oxidación de lípidos poliinsaturados mediante la acción de la enzima lipoxigenasa (LOX) presente en la soya (Vong y Liu, 2018). Los granos de soya contienen ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico

(C18:3). Ambos ácidos grasos contienen una estructura *cis*, *cis*-1,4-pentadieno la cual puede producir hidroperóxidos cuando son oxidados, los cuales son posteriormente convertidos en compuestos volátiles asociados a sabores indeseables como el hexanal (Figura 2.1) (Kaneko *et al.*, 2014). Las LOX son metalproteínas con un ion hierro (III) en el centro activo. La enzima es activada por su producto de oxidación; es decir, cuando el Fe²⁺ se oxida a Fe³⁺. Del sustrato oxidable se extrae un átomo de hidrógeno del grupo pentadieno (1-*cis*, 4-*cis*) para formar el radical pentadienilo de los ácidos grasos. La reacción con el oxígeno produce un radical peroxilo. El radical peroxilo formado es reducido por la enzima y, por fijación de un protón se forma el hidroperóxido. A partir del ácido linoleico se forma el ácido linoleico 13-hidroperóxido. Posteriormente la enzima hidroperóxido liasa cataliza la adición de un H⁺, lo cual provoca la eliminación del –OH del hidroperóxido como H₂O. Esto conduce a la formación de un catión éter alílico con la carga localizada en el carbono 13, adyacente al oxígeno. Subsecuentemente, se produce la adición de H₂O al ion de carbono, lo que finalmente produce el hexanal y ácido 12-oxo, 9 dodecenoico (Ogura & Sankawa, 1997; Grechkin, 2002).

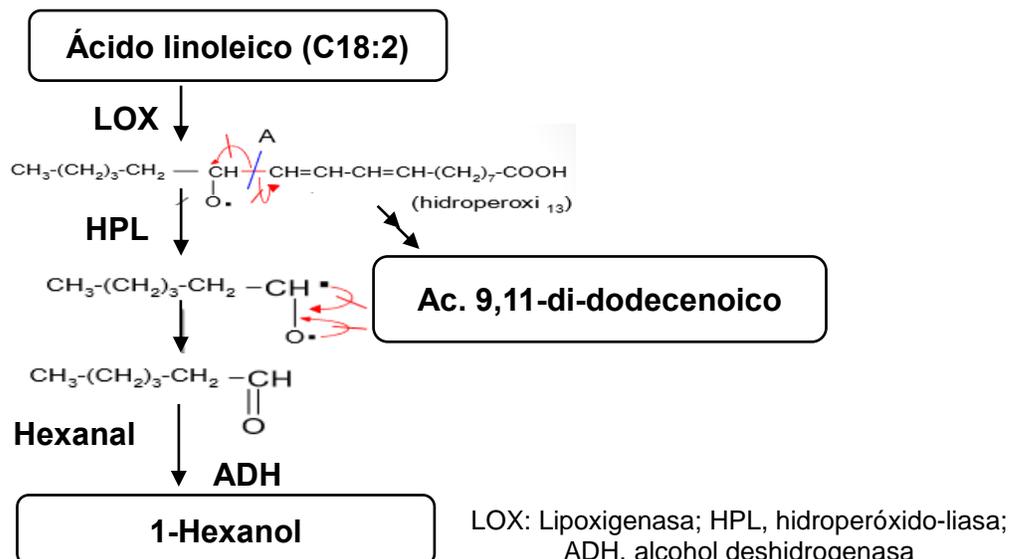


Figura 2.1 Producción de hexanal a través de la ruta de la lipoxigenasa.

Además, los productos elaborados a partir de soya pueden contener compuestos antinutricionales, principalmente fitatos, inhibidores de tripsina y oligosacáridos no digeribles como los mencionados anteriormente, que usualmente se asocian con malestar estomacal (MacDonald *et al.*, 2012; Gemede y Ratta, 2014).

2.3.3.1 Composición química de la leche de soya

2.3.3.1.1 Compuestos bioactivos

Diversos estudios realizados con animales y seres humanos demostraron que el consumo de la soya y sus derivados tiene efectos importantes en mejorar la salud de las personas que la consumen, principalmente en el tratamiento de enfermedades del corazón, huesos y en la disminución de los síntomas de la menopausia (Day *et al.*, 2013; Coscueta *et al.*, 2016). Estos beneficios se atribuyen a la presencia de compuestos bioactivos, es decir, a la presencia de compuestos que ejercen un efecto benéfico en alguna función corporal del individuo que lo consume, produciendo una mejora en su salud y bienestar o reduciendo el riesgo de padecer una enfermedad. La leche de soya es una fuente de antioxidantes, algunos compuestos fenólicos y vitaminas hidrosolubles (vitamina B1, B2 y B3) que contribuyen a su actividad antioxidante hidrófila, mientras que las vitaminas liposolubles (vitamina A y E) se relacionan con su capacidad antioxidante lipófila (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013).

Entre los principales compuestos bioactivos reportados en la leche de soya se encuentran los compuestos fenólicos. Estos compuestos son importantes ya que son utilizados en la industria alimentaria como aditivos y/o conservadores para proporcionar protección contra la degradación oxidativa de los alimentos provocada por la acción de los radicales libres. Los compuestos fenólicos presentes en la soya poseen capacidad antioxidante, previniendo o controlando la formación de radicales libres con efectos nocivos para la salud y por lo tanto son importantes para reducir el riesgo de enfermedades crónicas (Chiou *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos pueden captar eficazmente los radicales libres y retrasar el daño oxidativo y, por consiguiente, reducir los malos olores y sabores extraños

derivados de la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Los compuestos fenólicos no sólo reducen la oxidación y degradación de los alimentos, sino que también desempeñan un papel importante en la prevención de una serie de enfermedades crónicas tales como enfermedades cardíacas, distintos tipos de cáncer y enfermedades neurológicas como Alzheimer y el Parkinson (Lobo *et al.*, 2010). Entre los compuestos fenólicos reportados en la leche de soya se encuentran el ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinámico, catequina, ácido clorogénico (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Zhao y Shah, 2014).

Otros compuestos de interés son las isoflavonas, que son derivados de fenoles heterocíclicos con una estructura similar a los estrógenos. Estas derivan de la unión de un precursor aromático (hidroxicinamil coenzima-A éster) con un alifático (malonil coenzima-A). Compuestos por dos anillos bencénicos (A y B) unidos por un anillo pirano heterocíclico (C) (Figura 2.2). La posición del anillo benzoico B divide a las flavonas en dos clases: flavonas (posición 2) e isoflavonas (posición 3) (Messina y Mark, 1999).

Las principales isoflavonas que se encuentran en la leche de soya son los β -glucósidos daidzina y genistina (los azúcares se unen en la posición 7 del anillo) y sus respectivas agliconas genisteína y daidzeína. En menor cantidad se encuentran el β -glucósido glicitina y la aglicona gliciteína (Baú *et al.*, 2015).

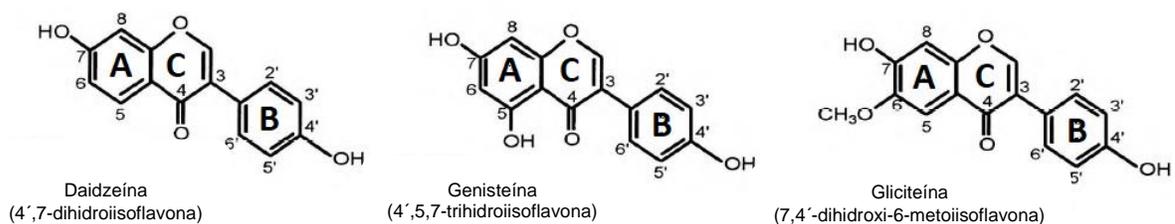


Figura 2.2 Estructura de isoflavonas agliconas (adaptado de Messina y Mark, 1999).

Las isoflavonas en la soya se encuentran en mayor concentración como β -glucósidos, y, debido a su unión con la glucosa, son compuestos con mayor solubilidad en agua que sus respectivas agliconas. En los humanos, las agliconas se absorben fácilmente

en la parte superior del intestino delgado por difusión pasiva. En contraste, las isoflavonas β -glucósidos no son absorbidas pasivamente a través del tracto gastrointestinal; para que la absorción ocurra, estas deben ser hidrolizadas hasta su forma aglicona, las cuales son más hidrofóbicas y tienen peso molecular más bajo (Izumi *et al.*, 2000; Manach *et al.*, 2004). Las agliconas pueden ser absorbidas o metabolizadas a diferentes compuestos con capacidades para unirse a los receptores estrogénicos. La genisteína se metaboliza a *p*-etilfenol y dihidrogenesteína mientras que la daidzeína se convierte en *o*-desmetilangolesina, equol y otros metabolitos (An *et al.*, 2001).

Las isoflavonas son similares estructuralmente a los estrógenos humanos. A las isoflavonas presentes en la soya se les atribuye diversas propiedades terapéuticas, las cuales se han relacionado con la capacidad de estas moléculas para unirse a los receptores de estrógenos. Estudios sugieren que estos fitoestrógenos son capaces de actuar como estrógenos débiles, particularmente en presencia de bajos niveles de estrógenos endógenos, como en el caso de las mujeres postmenopáusicas, lo cual provoca una disminución de los síntomas de la menopausia (An *et al.*, 2001). Las isoflavonas ayudan a prevenir el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos propios de la formación de tumores (cáncer de mama), de esta forma se deja al tumor sin fuente de alimentación impidiendo que crezca y se facilita que el organismo pueda eliminarlo. Las isoflavonas también pueden ayudar a la formación de los huesos. El equol (derivado de las isoflavonas) puede ayudar a aumentar la densidad de los huesos, haciéndolos más resistentes y fuertes. Una de las propiedades químicas más importantes de las isoflavonas es su poder antioxidante, atribuido a la capacidad del grupo fenólico de captar y remover los radicales libres (Mitchell *et al.*, 1998).

2.3.3.1.2 Factores antinutricionales

Los alimentos de origen vegetal pueden contener factores antinutricionales, los cuales son sustancias capaces de reducir el valor nutritivo de los alimentos ya que interfieren con la biodisponibilidad de minerales y/o la digestibilidad de proteínas y carbohidratos (MacDonald *et al.*, 2012). Entre los principales factores antinutricionales que se han

reportado en la soya se encuentran los fitatos, los inhibidores de tripsina y los oligosacáridos.

Entre los principales carbohidratos presentes en la soya se encuentran los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa. La rafinosa está formada por una molécula de galactosa unida a una de sacarosa por un enlace glucosídico ($1\alpha\rightarrow 6$). La estaquiosa es un tetrasacárido formado por dos unidades de α -D-galactosa, una unidad de D-glucosa y una β -D-fructosa unidas secuencialmente como galactosa ($\alpha 1\rightarrow 6$) galactosa ($\alpha 1\rightarrow 6$) glucosa ($\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$) fructosa (Meisenberg y Simmons, 2018).

El consumo de estos azúcares puede provocar malestar estomacal, debido a que los humanos no pueden sintetizar la enzima α -galactosidasa, enzima requerida para hidrolizar los galactooligosacáridos a D-galactosa y sacarosa en el intestino delgado. En consecuencia estos azúcares tras ser ingeridos se acumulan en el intestino grueso, donde son degradados por la acción de bacterias anaerobias, produciendo dióxido de carbono, hidrógeno y metano, lo cual provoca el malestar (Baú *et al.*, 2015).

El fitato o ácido mioinositol hexafosfórico (IP_6) se considera un factor antinutricional debido a que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales. La molécula de fitato posee seis radicales (es una molécula polianiónica —múltiples cargas negativas—) que muestran fuerte capacidad para quelar varios cationes. Por ejemplo, es bien conocida su capacidad para unirse y bloquear o precipitar otros minerales presentes en la dieta como el Ca, Co, Cu, Mg y Zn, y de unirse y bloquear diferentes proteínas. La precipitación y bloqueo de estos minerales dificulta la actividad de las enzimas digestivas, su absorción y provoca una disminución de su digestibilidad y un aumento de su excreción. Además, muchos de los complejos que forma el fitato con proteínas y minerales son insolubles, lo cual reduce la biodisponibilidad de éstos (Frölich y Asp, 1985; Nolan *et al.*, 1987). El fósforo que se encuentra presente en la molécula de fitato, no puede ser aprovecharlo por los seres humanos, ya que no tienen la capacidad de producir la enzima fitasa, la cual es necesaria para hidrolizar el ácido fítico y liberar el fósforo (Martínez *et al.*, 1996).

Así mismo, la soya contiene inhibidores de tripsina, las cuales interfieren en el funcionamiento de proteasas intestinales (tripsina). La presencia de inhibidores de

tripsina provoca la mala absorción de los alimentos, secreción incrementada de enzimas pancreáticas e hipertrofia/hiperplasia pancreática (Dragičević *et al.*, 2010).

2.3.3.2 Alimentos funcionales a partir de leche de soya

Algunos de los alimentos elaborados con soya que se pueden encontrar en el mercado son especialmente bebidas y productos probióticos desarrollados con extracto de soya mezclado con jugos de frutas, yogur de soya, entre otros (Champagne y Gardner, 2008). La soya se considera un buen sustrato para el desarrollo de alimentos funcionales, ya que la fermentación por probióticos tiene el potencial de reducir su sabor a grano, reducir los niveles de carbohidratos que son responsables de la producción de gas en el sistema intestinal, aumentar los niveles de isoflavonas agliconas y favorecer los cambios deseables en poblaciones bacterianas en el tracto gastrointestinal. Larkin *et al.* (2007) reportaron que la combinación de soya con probióticos o prebióticos provocó un efecto significativo en la disminución de colesterol de baja densidad (LDL).

Donkor *et al.* (2008) reportaron que la proteína de leche de soya fermentada puede estimular el crecimiento de muchas cepas probióticas como *L. acidophilus*, *L. casei*, entre otras. Además, los alimentos fermentados a base de soya pueden proporcionar beneficios adicionales para el consumidor, debido a sus diversas propiedades funcionales (anticolesterolémico, anticancerígeno, entre otras). El desarrollo de un alimento fermentado a base de soya requiere la selección de cepas con la capacidad de crecer en el sustrato, así como la capacidad de competir o incluso establecer una sinergia entre cepas y que éstas se mantengan viables durante el procesamiento. Así también se busca que estos alimentos tengan propiedades sensoriales atractivas y estabilidad durante el almacenamiento (Mishra y Mishra, 2015).

Como se mencionó anteriormente, el consumo de leche de soya y sus derivados en países occidentales es limitado debido a la presencia de factores antinutricionales y principalmente a sus características sensoriales. A menudo, durante el proceso de elaboración de estos alimentos (por ejemplo mediante los tratamientos con temperaturas altas) se pueden eliminar una parte de estos compuestos

antinutricionales. Sin embargo, estos procedimientos pueden afectar la calidad nutricional del alimento (Zhang *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, la elaboración de productos elaborados con soya debe estar orientada a eliminar estas sustancias antes de ser consumidos, pero a su vez dañar en menor medida las demás características del producto y mejorar sus características sensoriales (sabor, olor, textura, entre otros.). En la industria de los alimentos se han desarrollado diversas alternativas para mejorar las propiedades de los alimentos, entre ellas destacan el uso de probióticos. Dentro de los microorganismos más utilizados como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), ya que desempeñan un papel importante por su contribución al desarrollo del sabor, aroma y mejora del valor nutricional de los productos alimenticios que los contienen. Además, pueden contribuir a aumentar la vida útil de los productos y gracias a su habilidad para producir ácido láctico puede ayudar a preservar a los alimentos de microorganismos que pueden provocar enfermedades. La soya puede utilizarse para el cultivo de BAL, debido a la presencia de proteínas, sacarosa, rafinosa, estaquiosa y diversos ácidos grasos, los cuales son utilizados por la mayoría de las BAL. Por esta razón la incorporación de bacterias probióticas en la leche de soya, se ha utilizado como una alternativa para mejorar la aceptabilidad de estos productos (Hati *et al.*, 2014; Baú *et al.*, 2015).

Existen reportes que indican que la fermentación con BAL se ha utilizado como una estrategia para reducir los compuestos antinutricionales (ácido fítico, inhibidores de tripsina y oligosacáridos) en productos de soya, debido a la capacidad de estas bacterias para producir diversas enzimas, entre ellas, la enzima fitasa [mio-inositol hexakis (dihidrógeno fosfato) fosforilasa, EC 3.1.3.8], la cual cataliza la hidrólisis secuencial de fitato a fosfato (Sudarmadji y Markakis 1977) y la enzima α -galactosidasa (α -D-galactósido galactohidrolasa, EC 3.2.1.22) la cual es capaz de reducir los antinutrientes en los cereales durante la fermentación y catalizar la hidrólisis de enlaces α -D-glucosídicos presentes en la rafinosa y estaquiosa (Hati *et al.*, 2014). En leche de soya suplementada con proteína de suero de leche, se reporta la reducción del contenido de oligosacáridos (25-80%) cuando se realizó la fermentación con *Lactobacillus plantarum* (Hati *et al.*, 2014), mientras que en harina de soya

fermentada con *Lactobacillus brevis* se reporta la reducción de inhibidores de tripsina (57%) y fitato (96%) (Adeyemo *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013).

Así mismo, mediante la fermentación de la soya, se puede aumentar el contenido de compuestos bioactivos presentes (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014), principalmente las isoflavonas que mediante la acción de la enzima β -glucosidasa (EC. 3.2.1.21) (Baú *et al.*, 2015), pueden ser convertidas de β -glucósidos a agliconas (Figura 2.3), las cuales tienen mayor efecto benéfico en la salud humana que otros tipos de isoflavonas.

La fermentación de soya con BAL se ha utilizado como una estrategia para obtener leche de soya fermentada con alto contenido de aglicona y así también incrementar la capacidad antioxidante de la leche de soya (Xiao *et al.*, 2015). Zhao y Shah (2014) reportaron que mediante la fermentación de leche de soya con *Lactobacillus rhamnosus*, se logró la biotransformación de isoflavonas y se incrementó la capacidad antioxidante de la leche de soya. Baú *et al.* (2015) reportaron en la fermentación de leche de soya la presencia de β -glucosidasas, la cual provocó la bioconversión de β -glucósidos a sus correspondientes agliconas.

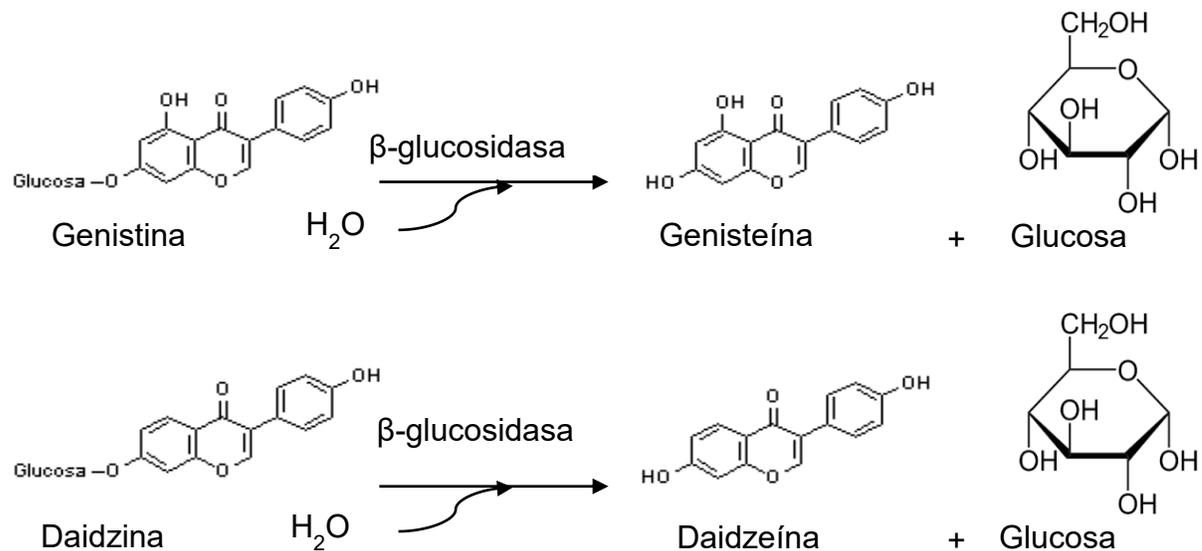


Figura 2.3 Conversión de isoflavonas β -glucósidos a agliconas.

2.4 Queso de soya

Uno de los productos comúnmente elaborados a partir del grano de soya es el tofu o queso de soya. El queso de soya, también conocido como cuajada de soya, es un alimento blando, similar al queso, compuesto principalmente de proteínas y lípidos (Villares *et al.*, 2011; Day, 2013). Su consumo es popular en Asia ya que constituye una excelente fuente de proteínas y aminoácidos esenciales, razón por la cual su consumo se ha extendido a los países occidentales (Cao *et al.*, 2017; Kawaguchi *et al.*, 2018).

La formación del queso de soya es principalmente atribuida a las propiedades de gelificación de las proteínas de la soya. Las proteínas de soya, las cuales al ser desnaturalizadas térmicamente forman agregados debido al aumento de grupos hidrófobos alrededor de la superficie molecular inducida por calentamiento. Cuando se añade un coagulante, las proteínas agregadas interactúan entre sí para formar las proteínas polimerizadas con una estructura de red tridimensional estable. Otros componentes no proteicos, tales como agua, polisacáridos, lípidos y otros componentes traza, están atrapados en esta red (Zhang y Qin, 2018).

2.4.1 Métodos de preparación

El queso de soya se elabora a partir de la coagulación de leche de soya (Li *et al.*, 2017; Fei *et al.*, 2017), misma que se induce usando sales (Molamma y Conrad, 2006), ácidos orgánicos (Cao *et al.*, 2017) y/o ácidos provenientes de la fermentación microbiana (Li *et al.*, 2017). Sin embargo, los procesos con sales orgánicas son frecuentemente utilizados. Entre los coagulantes más utilizados se encuentran el cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y sulfato de calcio ($CaSO_4$), aunque generalmente ocasionan que el producto final tenga una textura grumosa, tiempo de vida de anaquel corto e incluso que durante el almacenamiento el tofu tenga problemas de sinéresis. Además el producto final suele tener baja aceptación sensorial en los países occidentales debido a su sabor a frijol o amargo (Cao *et al.*, 2017; Serrazanetti *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, la elaboración del queso de soya podría estar orientada a mejorar estas características y aumentar su aceptación en los países occidentales.

Una estrategia para mejorar las características de los quesos de soya, es la fermentación con BAL, ya que mediante la fermentación de leche de soya con BAL, se puede inhibir la peroxidación de ácidos grasos insaturados y/o se puede reducir los compuestos volátiles que son responsables del sabor a frijol (hexanal, 2-hexanal, 3-hexenal, entre otros) dando lugar a la formación de sus correspondientes alcoholes y ácidos (Figura 2.4) (Serrazanetti *et al.*, 2013).

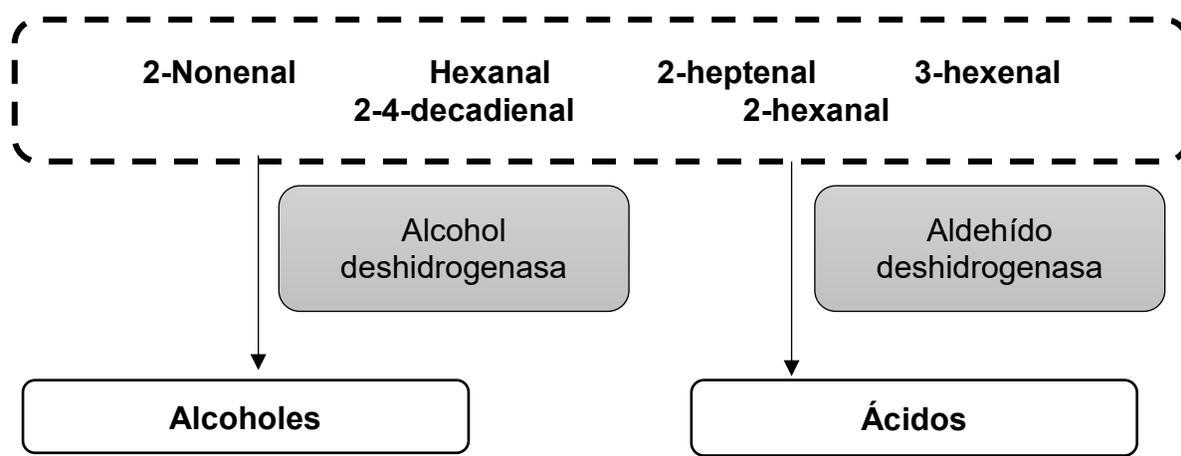


Figura 2.4 Conversión de aldehydos a alcoholes y ácidos (Adaptado de Vong y Liu, 2018).

Existen investigaciones que indican que mediante la elaboración de queso de soya a partir de leche fermentada con BAL se logra mejorar la estabilidad y calidad del producto final (Serrazanetti *et al.*, 2013), así como incrementar la concentración de compuestos bioactivos (Riciputi *et al.*, 2016). Estas BAL se han utilizado ampliamente en la industria de los alimentos como cultivos iniciadores en alimentos y bebidas fermentadas, ya que pueden mejorar las características nutricionales (Granato *et al.*, 2010) y organolépticas (Mohammadi y Mortazavian, 2011), además de aumentar la vida útil de los productos a través de la producción de compuestos antibacterianos tales como ácido láctico (Tiwari *et al.*, 2008). Sin embargo, el proceso de elaboración del tofu mediante fermentación involucra el calentamiento de la cuajada a 80°C por lo que, estas bacterias frecuentemente no logran permanecer vivas en el producto final (Riciputi *et al.*, 2016; Serrazanetti *et al.*, 2013).

Durante la fermentación de la leche de soya con bacterias ácido lácticas el pH disminuye, formándose un gel turbio debido a que los ácidos inducen la gelificación de proteínas por precipitación isoelectrónica (a pH 5.5-5.8). Lo anterior permite la agregación de las moléculas de proteínas desnaturalizadas, a través de interacciones proteína-proteína y proteína-agua. Posteriormente, se aplica un tratamiento térmico (60-80°C, durante aproximadamente 30 minutos) permitiendo que se formen agregados de proteínas solubles, compuestos por polipéptidos ácidos y básicos de glicinina unidos mediante enlaces disulfuro. Estos agregados interactúan mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces hidrógeno para formar partículas proteicas con subunidades básicas de glicinina en el interior y subunidades ácidas de glicinina y subunidades α y α' de β -conglucina en el exterior (Cao *et al.*, 2017).

2.5 Maduración de quesos

El queso de soya es un alimento perecedero y tiene una vida útil corta de alrededor de 2 semanas, debido a su alto contenido de humedad (>80%) y pH (5.8-6.2). Por otra parte su consumo se ve limitado debido a su sabor, debido a la presencia de aldehídos (n-hexanal, nonanal, entre otros) que le confieren el sabor a frijol o a hierba, sabor poco agradable para personas occidentales. Una de las estrategias empleadas en los quesos para mejorar estas características es el proceso de maduración (Lee *et al.*, 2014). De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, los quesos madurados son alimentos que se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda, con o sin corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

2.5.1 Efecto de la maduración sobre las propiedades nutricionales y sensoriales

La maduración del queso es el término utilizado para describir el proceso mediante el cual se permite desarrollar el sabor, textura, aroma y apariencia en el producto

madurado. Estos cambios son resultado de cambios físicos y bioquímicos (proteólisis, glucólisis, lipólisis), que se rigen por la microbiología, la actividad enzimática y la composición de la cuajada. Durante la maduración las enzimas liberadas por las bacterias permiten la degradación de las proteínas en péptidos y aminoácidos, y la descomposición de los ácidos grasos en cetoácidos, cetonas y ésteres. Estos productos de descomposición son importantes en el desarrollo del sabor, aroma y textura. También se pueden desarrollar características especiales en el queso durante la maduración, por ejemplo: la formación de venas azules en el queso Roquefort y los orificios (ojos) en el Emmental. La temperatura y la humedad se controlan cuidadosamente para promover el desarrollo de la flora microbiana deseable y la secreción de las enzimas responsables de los cambios. El tiempo de maduración varía de 4 semanas a 28 meses dependiendo de la variedad de queso (El Soda y Awad, 2011).

La maduración del queso puede realizarse mediante dos regímenes básicos: la maduración natural, es decir, en condiciones de secado y la maduración en paquetes impermeables a la humedad, como en el caso de quesos sin corteza (Dusterhoft *et al.*, 2017). La velocidad y el grado de maduración pueden verse influidos por la temperatura y la humedad. Las condiciones típicas de almacenamiento/maduración son: 4-20°C, 70-90% de humedad relativa, según el tipo de queso. Las condiciones de maduración tienen un efecto directo sobre la velocidad de maduración. Así mismo, la proteólisis y otros procesos enzimáticos son más lentos a temperaturas bajas.

2.5.2 Uso de co-cultivos en la maduración de quesos

La producción de queso implica una interacción compleja de la leche, el cuajo y las bacterias. En el proceso de pasteurización de la leche se eliminan más del 99% de las bacterias presentes, por lo cual se añaden cultivos iniciadores a la leche después del tratamiento térmico (Law y Tamime, 2010; Engels *et al.*, 2017). Por su acción metabólica las bacterias fermentan la leche y en consecuencia disminuyen en el queso los carbohidratos disponibles y se lleva a cabo la producción de ácido láctico y ácido acético, reduciendo el pH del queso (5.1-5.2) (Engels y Wouters, 2013; Engels *et al.*,

2017). Todos estos cambios ayudan a inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados. Por lo cual, el cultivo iniciador desempeña un papel crucial en el proceso de elaboración del queso, pero también en el proceso de maduración.

Los microorganismos que tienen poca o ninguna función en la producción de ácidos durante la fermentación de la leche se denominan cultivos secundarios o co-cultivos. El uso de co-cultivos para la elaboración de alimentos fermentados es una alternativa para favorecer la producción de compuestos aromáticos y mejorar las características sensoriales de estos alimentos. Es importante la selección de cepas que tengan la capacidad de crecer en el sustrato y presenten capacidad para competir y/o establecer un crecimiento sinérgico entre las cepas que forman parte del cultivo (Engels *et al.*, 2017). En ese sentido, las bacterias propiónicas han sido utilizadas ampliamente como co-cultivos en la producción de quesos madurados elaborados mediante fermentación con bacterias ácido lácticas, ya que pueden utilizar el ácido láctico y péptidos producidos por las BAL y transformarlos en ácido propiónico y ácido acético (Figura 2.5), los cuales son importantes componentes del sabor en quesos madurados (Rodríguez *et al.*, 2011). *Propionibacterium* es utilizado principalmente en la producción de queso Emmental, en el cual tiene un papel importante en la formación de “ojos”. La fermentación de alimentos mediante el uso de bacterias ácido propiónicas (BAP) contribuye al desarrollo de las características físicas y organolépticas, así también contribuye a mejorar la vida útil a través de la biopreservación, mediante la producción de ácidos orgánicos (Wyk *et al.*, 2018).

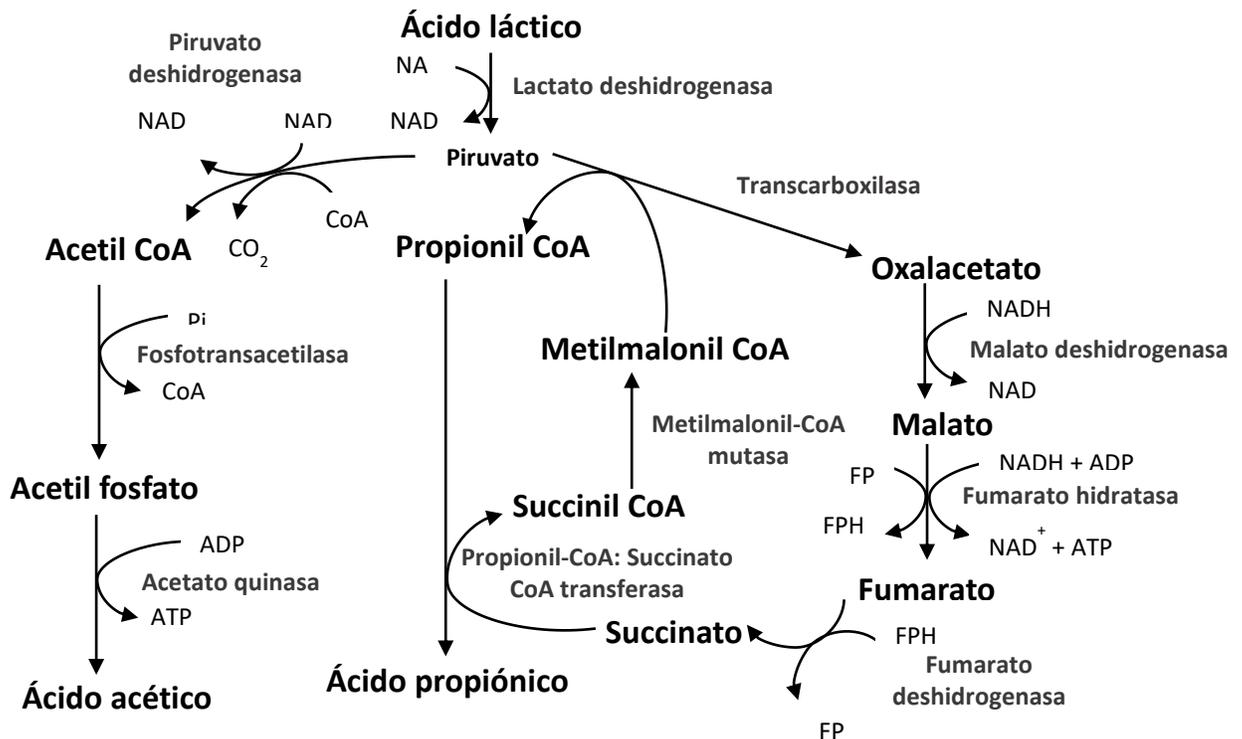


Figura 2.5 Ruta metabólica de *Propionibacterium* para la producción de ácido propiónico y ácido acético (adaptado de Wyk *et al.*, 2018).

Las BAP son microorganismos mesofílicos, capaces de crecer a temperaturas de 15-40°C (Ahmadi *et al.*, 2015) y pueden convertir diversas fuentes de carbono (lactato, galactosa, fructosa, glucosa) en productos de fermentación como propionato, acetato, succinato y CO_2 (Zhang *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2012) reportan que *Propionibacterium* tiene la capacidad de crecer en leche de soya, produciendo ácido propiónico y ácido láctico durante la fermentación. Por lo cual, las bacterias propiónicas podrían ser utilizadas para la elaboración de quesos de soya permitiendo obtener un producto con mejores características sensoriales.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años existe un creciente interés por el consumo y producción de alimentos probióticos y funcionales. Entre los cuales se encuentran los análogos de los productos lácteos, los cuales son elaborados con soya (*Glycine max*). En promedio, la soya seca contiene aproximadamente 40-41% de proteína (Medic *et al.*, 2014), y se han cuantificado altos niveles de compuestos fenólicos bioactivos, como las isoflavonas (β -glucósidos y agliconas), ácido benzoico, clorogénico, gálico, cinámico y ferúlico (Zhao y Shah, 2014). Estos compuestos bioactivos confieren propiedades antioxidantes (Marazza *et al.*, 2012), antihipertensivas (Wang *et al.*, 2015) e hipocolesterolemicas (Belleville, 2002). Por esta razón, se considera una excelente alternativa para desarrollar alimentos funcionales (Day, 2013). Muchos productos de soya se comercializan y venden en todo el mundo; de estos, el queso de soya, es un producto muy consumido en los países orientales. El queso de soya, comúnmente llamado tofu, contiene proteínas y lípidos (Villares *et al.*, 2011; Día, 2013), así como también un alto contenido de nutrientes como las isoflavonas (Prabhakaran *et al.*, 2006). Aunque el queso de soya tiene muchas propiedades nutricionales, es un producto poco atractivo para la mayoría de los consumidores en los países occidentales, ya que la presencia de aldehídos (nonanal y n-hexanal, principalmente), le confieren el sabor indeseable de "hierba verde" o sabor amargo (Lee y Kuo 2011). Por otra parte, los productos de soya pueden contener factores antinutricionales, principalmente fitatos y oligosacáridos, como la rafinosa y la estaquiosa (MacDonald *et al.*, 2012; Gemede y Ratta, 2014). Estos oligosacáridos generalmente se asocian con dolores de estómago (Baú *et al.*, 2015). El fitato puede afectar la biodisponibilidad de minerales, solubilidad, funcionalidad y digestibilidad de proteínas y carbohidratos (García-Mantrana *et al.*, 2015). Por lo anterior, es importante evaluar estrategias para mejorar los atributos de estos alimentos. La fermentación de la leche de soya con BAL se ha utilizado como estrategia para reducir el contenido de factores antinutricionales en los alimentos, debido a su capacidad para producir enzimas como la α -galactosidasa y fitasa. Además, las BAL juegan un papel importante en la producción

de isoflavonas agliconas durante la fermentación de alimentos de soya, a través de la producción de β -glucosidasa. Aunado a lo anterior, las BAL se han utilizado en todo el mundo como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos madurados, así también como la adición de cultivos secundarios como *P. freundereinchii*, con la finalidad de mejorar las características nutricionales (Granato *et al.*, 2010), el perfil sensorial y la vida útil, mediante la producción de compuestos antibacterianos como el ácido láctico (Tiwari *et al.*, 2009).

Por esa razón, en este trabajo se propuso un proceso para obtener queso de soya mediante fermentación de la leche de soya con *L. plantarum* BAL-03-ITTG y *L. fermentum* BAL-21-ITTG, microorganismos autóctonos que mediante pruebas *in vitro* mostraron potencial como probióticos (González-Escobar, 2012). Así mismo, debido de a que no existen reportes sobre el uso de *Propionibacterium freudenreichii* para la formulación de quesos de soya y su efecto sobre sus propiedades, se evaluó el efecto de *L. plantarum*, *L. fermentum* y la adición de *P. freudenreichii* sobre el contenido de compuestos bioactivos, perfil volátil y características sensoriales del queso de soya durante su maduración.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG, *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG y *Propionibacterium freudenreichii* para reducir el contenido de fitatos y oligosacáridos, incrementar la producción de isoflavonas agliconas y mejorar las características organolépticas de queso de leche de soya madurado.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar el crecimiento microbiano, reducción de factores antinutricionales y producción de compuestos bioactivos durante la fermentación de leche de soya con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG.

Evaluar el efecto de la adición de *Propionibacterium freudenreichii* sobre las propiedades bioquímicas, microbiológicas y sensoriales de queso de soya obtenido mediante fermentación con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*.

Evaluar las propiedades bioquímicas, microbiológicas y sensoriales de queso de soya durante su maduración.

Hipótesis

La fermentación de leche de soya con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG reducirá el contenido de factores antinutricionales e incrementará la formación de compuestos bioactivos.

El queso de soya elaborado mediante la fermentación de leche de soya con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG y *Propionibacterium freudenreichii* como co-cultivo, presentará mejores propiedades nutricionales y tendrá mejor perfil de compuestos volátiles y características sensoriales que el queso de soya obtenido mediante la acidificación con ácido láctico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Microorganismos

Lactobacillus fermentum BAL-21-ITTG y *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG se obtuvieron de la colección de cultivos del laboratorio de investigación en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, en México. Las cepas conservadas en glicerol (30% v/v) a -18°C , fueron activadas mediante dos transferencias sucesivas de 500 μL en 5 mL de caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe), incubadas a 35°C durante 12 h y con una agitación de 80 rpm. Para mantener las cepas activas se tomaron 1000 μL de las cepas reactivadas y se transfirieron a tubos de ensaye conteniendo 10 mL de caldo MRS (DIBICO), se incubaron durante 15 h a 36°C . Transcurrido el tiempo de incubación los tubos se almacenaron a 4°C , realizando resiembras bajo las mismas condiciones cada 21 días.

El cultivo de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* fue obtenido de la empresa Vivolac (Ciudad de México, México), los cultivos liofilizados se mantuvieron a -18°C hasta su uso.

5.2 Preparación de leche de soya

La leche de soya se preparó según García-Mantrana *et al.* (2015) con algunas modificaciones. La soya lavada se remojó en agua en una proporción de 1:4 (p:v) a $97\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, luego se drenó y se mezcló con agua en una relación de 1:7 (p:v) y se licuó durante 3 min con licuadora. La mezcla se filtró a través de dos capas de tela y se obtuvieron aproximadamente 480 mL de leche de soya por 100 g de granos de soya en peso húmedo. La leche de soya fue sometida a un tratamiento térmico a 112°C durante 12 min y se almacenó a 4°C hasta su uso. El objetivo del tratamiento térmico fue disminuir la carga microbiana que resultase del proceso de elaboración de la leche de soya y favorecer únicamente el crecimiento de los microorganismos inoculados y que a la vez este proceso térmico no provocara cambios en la apariencia de la leche.

5.3 Fermentación de leche de soya

La leche de soya se fermentó con *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* por separado. La leche de soya se inoculó con un 1% de un inóculo que contenía entre 7.2 y 7.4 log UFC/g de cultivos de *Lactobacillus*. La leche de soya inoculada se incubó a 37°C durante 24 h. Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h para la determinación del recuento de células viables, pH, actividad α -galactosidasa y β -glucosidasa, actividad antioxidante, contenido de fitato e isoflavonas. Las muestras para la determinación de la actividad de la α -galactosidasa y la β -glucosidasa, la actividad antioxidante, fitatos y el contenido de isoflavonas se liofilizaron previamente de acuerdo con Enciso-Sáenz *et al.* (2018) utilizando un liofilizador (Labconco FreeZone 2.5 L, Kansas, E.U.A.), a -40°C y 0.250 mbar durante 24 h. Finalmente, las muestras liofilizadas se almacenaron en botellas de vidrio ámbar a -18°C hasta su uso.

5.3.1 Determinación de inhibidores de tripsina

Antes de la fermentación, la leche de soya se sometió a tratamiento térmico (112°C durante 12 min). Con el fin de determinar la presencia de inhibidores de tripsina (IT) y fitatos en la leche de soya después del tratamiento térmico, se evaluó la concentración de estos factores antinutricionales en la leche de soya antes y después del tratamiento térmico.

Para la determinación de inhibidores de tripsina se tomaron 10 gramos de leche de soya y se liofilizaron a -40°C y 0.250 mbar (Labconco, EUA). Posteriormente las muestras se desengrasaron con hexano (1:10; p:v) y se dejaron incubar a 25°C durante 1 hora. La determinación de inhibidores de tripsina se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Coscueta *et al.* (2016). Un gramo de las muestras se mezcló con 50 mL de NaOH 0.01 M, la suspensión se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron (3500 rpm, 10 min), el sobrenadante se separó para realizar la determinación de inhibidores de tripsina. Se tomaron 0.28 mL del sobrenadante obtenido, posteriormente se agregaron 0.72 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 8.20) y 0.20 mL de solución de

trabajo tripsina bovina (TRP), se mezcló a 37°C durante 2 min y se agregó 1.30 mL de solución de trabajo α -N- benzoyl-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA). Inmediatamente después de mezclar se midió la absorbancia a 410 nm. El control fue preparado de la siguiente manera: 1.0 mL de buffer Tris-HCl 0.05 M (pH 8.20), 0.20 mL de solución TRP y 1.30 mL de solución BAPNA.

El resultado se expresó en unidades de inhibidores de tripsina por gramo de muestra (UIT/g). El cálculo se realizó siguiendo la ecuación 1.

$$UIT / g = \frac{100 \times 2.5 (m_{control} - m_{muestra})}{0.280} D50 \quad (1)$$

Donde 100 es el factor de conversión 0.01 U; ($m_{control} - m_{muestra}$) es la diferencia entre la absorbancia del control y la muestra; D, es el factor de dilución del sobrenadante, calculado como el volumen final dividido por la cantidad de alícuota tomada para diluir el extracto; 50 es el volumen de extracción de NaOH 0.01 M usada por gramo de leche de soya; 0.28 la alícuota en mL que se utiliza en el ensayo y 2.5, el volumen final de la reacción en mL.

Los reactivos se prepararon de acuerdo a lo descrito por Coscueta *et al.* (2016). La solución stock TRP se preparó disolviendo 10 mg de TRP en 1 mL de HCl 0.001 M, se almacenó a 18°C hasta su uso. La solución de trabajo TRP fue preparada por una dilución 1:100 de la solución stock TRP con buffer Tris 0.050 M, pH 8.20. La solución stock BAPNA fue preparada disolviendo 100 mg de BAPNA sólido en 2.3 mL de dimetil sulfóxido, la solución fue almacenada a 18°C hasta su uso. La solución de trabajo BAPNA fue preparada por una disolución 1:100 de la solución stock BAPNA con buffer Tris-HCl 0.050 M pH 8.20.

5.3.2 Determinación del crecimiento celular y pH

El recuento de células viables de BAL se determinó por triplicado mediante siembra en placa empleando agar MRS, las placas se incubaron a 37°C durante 72 h. Los resultados se expresaron como log UFC/g de la leche de soya fermentada. El pH de

la leche fermentada se determinó con un potenciómetro digital (Oakton pH 1100 Series, VernonHills, IL, E.U.A.).

5.3.3 Determinación de actividad α -galactosidasa

Los extractos enzimáticos se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Baú *et al.* (2015). Se mezclaron 500 mg de leche de soya fermentada liofilizada con 5 mL de buffer de acetato de sodio (0.2 M, pH 4.8) y se incubaron durante 1 hora a 200 rpm a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm, 4°C, durante 10 min (Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania) y el sobrenadante se filtró con un filtro millipore de 0.45 μ m (Millipore, Tullagreen, Irlanda). El filtrado se utilizó como extracto enzimático para determinar la actividad de la α -galactosidasa de acuerdo con Scalabrini *et al.* (1998). El ensayo de actividad enzimática se realizó mediante la hidrólisis de *p*-nitrofenil- α -D-galactopiranosido (pNPG), determinando la cantidad de *p*-nitrofenol liberado. La mezcla de reacción utilizada para el ensayo consistió en 250 μ L de extracto enzimático y 500 μ L de pNPG 5 mM preparado en buffer de citrato de sodio 50 mM y se dejó en incubación durante 30 min a 37°C. La reacción fue inactivada mediante la adición de 500 μ L de carbonato de sodio (0.2 M) y se midió la absorbancia a 410 nm usando un espectrofotómetro. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado por la reacción enzimática se determinó mediante una curva de calibración preparada con *p*-nitrofenol (en el rango de 0.02-0.44 μ M/mL). Una unidad de actividad enzimática (UA) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo. Los resultados se expresan en UA por gramo de muestra seca (UA/g). El cálculo se realizó siguiendo la ecuación 2.

$$\text{Actividad enzimática: } \frac{\frac{abs - b}{m} * V}{M * t} \quad (2)$$

donde: abs, es la absorbancia; b, es ordenada al origen de la recta; m, es la pendiente de la recta (mg/mL); V, volumen del ensayo (mL); M, masa de la muestra (g); t, tiempo de reacción (min).

5.3.4 Determinación de actividad β -glucosidasa

La obtención del extracto enzimático se realizó de acuerdo al método descrito por Baú *et al.* (2015). Para la actividad de la β -glucosidasa, se mezclaron 500 mg de leche de soya fermentada liofilizada con 3 mL de buffer de citrato (0.05 M, pH 4.5) que contenía NaCl (0.1 M) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron (4°C, 6500 rpm, 15 min), el sobrenadante (extracto enzimático) se utilizó para determinar la actividad enzimática mediante el método descrito por Sanches de Lima *et al.* (2014), determinando la cantidad de *p*-nitrofenol liberado a partir de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido. Se incubaron 800 μ L del sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (1 mM, en buffer de citrato 0.1 M, pH 6) a 30°C durante 10 min. A continuación, se añadieron 200 μ L del extracto enzimático y se dejó incubar a 30°C durante 30 min. La reacción se inactivó mediante la adición de 1 mL de carbonato de sodio (0.5 M). Posteriormente, la mezcla se centrifugó (4500 rpm, 4°C, 10 min) y se midió la absorbancia a 420 nm usando un espectrofotómetro. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado por la reacción enzimática se determinó mediante una curva de calibración preparada con soluciones estándares de *p*-nitrofenol (en el rango de 0.02-0.44 μ M/mL). Una unidad de actividad enzimática (UA) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo. Los resultados se expresan en UA por gramo de muestra seca (UA/g). El cálculo se realizó siguiendo la ecuación 3.

$$\text{Actividad enzimática: } \frac{\frac{abs - b}{m} * V}{M * t} \quad (3)$$

donde: abs, es la absorbancia; b, es la ordenada al origen de la recta; m, es la pendiente de la recta (mg/mL); V, es el volumen del ensayo (mL); M, masa de la muestra (g); t, tiempo de reacción (min).

5.3.5 Evaluación de isoflavonas

La extracción y la cuantificación de isoflavonas (daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína y genisteína) presentes en leche de soya fermentada y no fermentada se determinaron según Zhao y Shah (2014) con algunas modificaciones.

Un gramo de las muestras liofilizadas se mezcló con 20 mL de metanol al 80% y se incubó en un baño de agua a 65°C en la oscuridad durante 2 h. Las muestras se agitaron cada 10 min y se enfriaron a temperatura ambiente. Cuando las muestras se enfriaron, se agregaron 0.8 mL de NaOH (2 M) a la mezcla y se agitó (120 rpm) a temperatura ambiente durante 10 min antes de agregar 0.5 mL de ácido acético glacial. La mezcla se filtró y se agregaron 8 mL de filtrado seguido de la adición de 2 mL de metanol al 50%. La solución se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min y se filtró (0.22 µm, Millipore), la cuantificación se realizó por HPLC empleando un detector UV/Vis (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) y una columna Zorbax ODS (250 mm x 4.6 mm x 5 µm; Agilent Technologies, Wilmington, E.U.A.). Se aplicó un gradiente lineal con una mezcla de dos disolventes: (A) 88% de agua, 10% de metanol, 2% de ácido acético y (B) metanol, manteniendo un flujo constante de 0.8 mL/min. El gradiente para cada solvente comenzó a 90:10 (A%: B%) y disminuyó linealmente a 40:60 (A%: B%) durante 25 min, luego se mantuvo durante 8 minutos antes de volver a las condiciones iniciales 90: 10 (A%: B%). La longitud de onda de detección fue de 260 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL. Para las curvas de calibración, se usaron daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína y genisteína (Pureza ≥95, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U.A). Los resultados se expresaron en mg de isoflavonas por g de muestra en base seca (mg/g).

5.3.6 Actividad antioxidante

El contenido de fenoles totales presentes en las muestras se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu descrito por Morales-de la Peña *et al.* (2010). Un gramo de leche de soya se aforó a 10 mL con agua destilada y se mezcló. Se tomó 0.5 mL de la muestra con 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 10 mL de Na₂CO₃ (20%). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h. Las mezclas se filtraron (0.45 µm, Millipore) y la absorbancia se midió a 725 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman Coulter Du® 73, Alemania). Las concentraciones se determinaron comparando la absorbancia de las muestras con una curva de calibración construida utilizando ácido gálico (Pureza ≥97.5, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U.A.). Los

resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de leche de soya (mg EAG/100 g de leche de soya fermentada). La actividad antioxidante de la leche de soya se determinó midiendo la eficacia de inhibición del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH, Sigma®, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, E.U.A), siguiendo la metodología descrita por Zhao y Shah (2014). Una alícuota de 2 g de leche de soya fermentada se mezcló con 4 mL de metanol al 80% y se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue considerado como la fracción hidrófila. Para la fracción lipófila, se mezcló una alícuota de 2 g de leche de soya fermentada con 4 mL de hexano y se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min a 4°C. Para determinar la actividad antioxidante se tomaron 0.2 mL de los extractos hidrófilos o lipófilos y se mezclaron con 3.8 mL de solución metanólica de DPPH (0.025 g/L). Las mezclas se agitaron vigorosamente y se mantuvieron en la oscuridad durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 517 nm usando como blanco metanol. Los resultados se calcularon y expresaron como el porcentaje de inhibición del radical DPPH (Ecuación 4):

$$\text{Inhibición de DPPH (\%)} = ((Ac-Asm) / Ac) \times 100 \quad (4)$$

donde Ac es la absorbancia del control (la solución metanólica del radical DPPH sin extracto) y Asm es la absorbancia en presencia del extracto.

5.3.7 Determinación de fitato

Para la extracción de ácido fítico se utilizó la metodología propuesta por Frühbeck *et al.* (1995). Se añadieron 20 mL de HCl (0.65 N) a 0.2 g de las muestras liofilizadas y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 4500 rpm durante 30 min a 15 °C y se recuperó el sobrenadante. Para la determinación de fitato, el pH de los extractos se ajustó a 6.0 con una solución de NaOH (1 N), y luego 10 mL se transfirieron a la columna con resina (8 mm x 65 mm; resina de intercambio aniónico Dowex® 1-X8). La columna se lavó con 15 mL de NaCl (0.1 N). El fitato se eluyó con 15 mL de NaCl (0.7 N) y el extracto purificado se recolectó, se tomaron 3 mL de agua

desionizada (utilizada como blanco) o 3 mL de extracto purificado a los que el pH se ajustó previamente a 3 y se les añadió 1 mL de reactivo de Wade (0.03% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ más 0.3% de ácido sulfosalicílico disuelto en agua desionizada) y se midió la absorbancia a 500 nm. Las concentraciones se determinaron comparando la absorbancia de las muestras con una curva de calibración construida utilizando fitato de sodio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U.A.).

5.3.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones para la fermentación de la leche de soya. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las variables de respuestas (concentración de inhibidores de tripsina, crecimiento celular, pH, actividad α -galactosidasa, actividad β -glucosidasa, concentración de isoflavonas, actividad antioxidante y concentración de fitatos) y se utilizó la diferencia mínima significativa para comparar las medias con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ para cada prueba. Para el análisis estadístico de los datos se empleó el Software Statgraphics Centurion XV.

5.4 Elaboración y maduración de queso de soya

El queso de soya se elaboró a partir de leche fermentada de soya según lo descrito en la sección 5.3. *L. fermentum* se inoculó al 1% (de un cultivo desarrollado durante 15 h) en la leche de soya y se incubó a 37°C durante 8 h. Posteriormente la leche de soya fermentada se calentó a 50±2°C durante 30 min, una vez formada la cuajada, se eliminó el suero y se adicionó inulina (1.5%, p/p) y sal (1%, p/p). La cuajada se transfirió a moldes redondos de 10.5 cm de diámetro y 6.5 cm de altura. Para los quesos a los cuales se les adicionó *Propionibacterium freudenreichii*, posterior al calentamiento de la leche a 50±2°C durante 30 min y enfriamiento, se adicionó el cultivo de *Propionibacterium freudenreichii* (con una concentración final aproximada de 1.7×10^8 UFC/g de cuajada) el cual previamente fue reactivado durante 24 h en leche de soya.

Como control se utilizó queso de soya elaborado con leche de soya acidificada con ácido láctico hasta tener un pH de 5.2.

Para el proceso de maduración, los quesos se incubaron a $15\pm 2^{\circ}\text{C}$, 82-86% humedad relativa, los quesos se empacaron al vacío después de 5 d, se tomaron muestras al inicio, 20 y 40 d de maduración para evaluar la sobrevivencia de los microorganismos, la concentración de fitatos, la actividad antioxidante, el contenido de isoflavonas, la composición de compuestos volátiles y el análisis sensorial del queso de soya. Asimismo, se llevó a cabo la enumeración de coliformes, levaduras y hongos mediante siembra en placa en agar bilis rojo violeta y agar papa dextrosa respectivamente según la NOM-121-SSA1-1994. La cuantificación del crecimiento celular se llevó a cabo mediante el conteo de las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) (Serrazanetti *et al.*, 2013).

5.4.1 Evaluación de la sobrevivencia de *Lactobacillus sp.* y *P. freudenreichii* durante la maduración

Para evaluar la sobrevivencia de las BAL, 10 g de queso se mezclaron con 90 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizaron. El crecimiento celular se evaluó mediante siembra en placa en agar MRS. La cuantificación del crecimiento celular se llevó a cabo mediante el conteo de las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL).

5.4.2 Determinación de fenoles totales

La obtención de los extractos se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Lee *et al.* (2018). Se tomaron 1 g de la muestra liofilizada y se mezcló con 9 mL de metanol al 50% y se agitó a 130 rpm durante 18 h. Posteriormente, el extracto se filtró dos veces primeramente utilizando papel filtro Whatman No. 42 y posteriormente con filtro Millipore (0.45 μm). El filtrado se utilizó para analizar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

El contenido de fenoles totales fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu. Un mililitro del extracto se mezcló con 1.8 mL de agua destilada y se agregó 0.2 mL

del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. La mezcla se incubó durante 3 min y luego se añadieron 0.4 mL de carbonato de sodio al 7%. La mezcla se dejó incubar durante 1 h a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 725 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Beckman Coulter Du® 73, Alemania). Las concentraciones se determinaron comparando la absorbancia de las muestras con una curva de calibración construida utilizando ácido gálico (Pureza ≥ 97.5 , Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U.A.). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/g de muestra.

5.4.3 Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó midiendo la eficiencia de inhibición del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) de acuerdo al protocolo descrito por Lee *et al.* (2018). Una alícuota de 1 mL de los extractos se mezclaron con 1 mL de agua destilada y se agregó 1 mL de DPPH 0.2 mM. Las mezclas se agitaron y se mantuvieron en la oscuridad durante 30 min. La absorbancia se midió a 517 nm usando como blanco metanol. Los resultados se calcularon y expresaron como el porcentaje de inhibición del radical DPPH (Ecuación 5):

$$\text{Inhibición de DPPH (\%)} = ((Ac-Asm) / Ac) \times 100 \quad (5)$$

donde Ac es la absorbancia del control (la solución metanólica del radical DPPH sin extracto) y Asm es la absorbancia en presencia del extracto.

5.4.4 Determinación de compuestos volátiles durante la maduración

La determinación de compuestos volátiles presentes en el queso de soya se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies) utilizando el método descrito por Lee *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Se colocaron 2.5 g de las muestras de queso en viales cromatográficos para head-space de 15 mL y se adicionó como estándar interno 4-metil-2-pentanol (100 μ L) a una concentración final de 40 ppm. Los viales se sellaron herméticamente y se almacenaron a -18°C hasta su análisis. Se empleó una fibra de

microextracción en fase sólida (SPME) con una fase de 75 μm de carboxen/polidimetilsiloxano (Supelco 57324-U). Las muestras se equilibraron por 21 min a 60°C, posteriormente la fibra se expuso dentro del vial para la adsorción de los compuestos volátiles durante 30 min. Finalmente, la fibra se introdujo en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases y se realizó el proceso de desorción durante 10 min. Se utilizó una columna DB-Waxter de 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm (Agilent Technologies), utilizando como fase móvil helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura inicial de horno fue de 40°C durante 4 min, posteriormente la temperatura se incrementó hasta 185°C a una velocidad de 5°C/min manteniéndose a esa temperatura durante 20 min. Las señales fueron identificadas por comparación de sus espectros de masas con la librería NIST98.

5.4.5 Determinación de isoflavonas durante la maduración

La extracción y la cuantificación de isoflavonas (daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína y genisteína) presentes en el queso de soya se determinaron según Verardo *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Los extractos de las muestras se filtraron usando un filtro de nylon (0.45 μm). La cuantificación de isoflavonas se realizó en un queipo HPLC acoplado a un detector UV/Vis (Perkin Elmer), se empleó una columna Zorbax C18 (250 mm x 4.6 mm x 5 μm ; Agilent Technologies, Wilmington, E.U.A.). Las fases móviles consistieron en (A) agua más 1% de ácido acético y (B) acetonitrilo a un flujo de 0.8 mL/min. Se utilizó el siguiente gradiente: 1.5 min, 5% B; 11.5 min, 22% B; 13 min, 25% B; 14.5 min, 28% B; 15.5 min, 30% B; 16.5 min, 31% B; 18 min, 32% B; 19.5 min, 34% B; 20.5 min, 35% B; 22 min, 40%; 23.5 min, 50% B; 26.5 min 100% B; 41.5 min, 100% B; 46.5min, 5% B; 49.5 min, 5%B; 59.5 min, 10% B; 64.5 min, 5% B; 69.5 min, 5% B. La longitud de onda de detección fue de 260 nm. El volumen de inyección fue de 20 μL . Para las curvas de calibración, se usaron como estándares externos daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína y genisteína (Pureza \geq 95%, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U.A) como estándares externos. Los resultados se expresaron en mg de isoflavonas por g de muestra en base seca (mg/g).

5.4.6 Cuantificación de ácido láctico y ácido acético durante la maduración

La cuantificación de ácido láctico y ácido acético se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Perkin Elmer, series 200) conectado a un detector de IR (PerkinElmer, series 200^a). Se utilizó 1 gramo de las muestras liofilizadas y se mezcló con 10 mL de agua destilada, posteriormente se homogenizó y se centrifugó (4500 rpm, 20 minutos), posteriormente se filtró a través de una membrana Millipore con tamaño de poro de 0.22 μm . Para la cuantificación se utilizó una columna Hi-Plex Ca (300x7.7 mm) (Agilent Technologies, Alemania) mantenida a 85°C. Se emplearon condiciones isocráticas a un flujo de 0.6 mL/min, utilizando como fase móvil agua tridestilada y un volumen de inyección de 10 μL . Las soluciones estándar de los analitos a cuantificar fueron preparadas en agua tridestilada para conocer los tiempos de elución y las curvas de calibración respectivas (Audisio *et al.*, 2011).

5.4.7 Análisis sensorial

Para la prueba de aceptación de los atributos (apariencia, color, aroma, sabor, textura y aceptación general) del queso de soya, se utilizó una escala hedónica estructurada con 9 puntos (9: me gusta extremadamente, 8: me gusta mucho, 7: me gusta moderadamente, 6: me gusta ligeramente, 5: ni me gusta ni me disgusta, 4: me disgusta ligeramente, 3: me disgusta moderadamente, 2: me disgusta mucho, 1: me disgusta extremadamente) (Kamizake *et al.*, 2018). Las muestras se presentaron simultáneamente a los jueces en orden aleatorio.

El panel sensorial estaba conformado por 60 jueces no entrenados. Entre ellos, el 20.59% consume alimentos con soya con frecuencia (más de 5 veces por semana), el 47.06% consume alimentos con soya moderadamente (1 a 5 veces por semana), el 23.53% consume alimentos con soya ocasionalmente (1 a 3 veces por mes) y el 8.82% casi nunca consume alimentos con soya (1 a 5 veces al año). El jurado estuvo conformado por 59% de mujeres y 41% de hombres. Los jueces tuvieron entre 15 y 70 años de edad, de los cuales, 17.65% tenía entre 15 y 30 años, 44.12% entre 31 y 50 años y 38.24% entre 51 y 70 años.

5.4.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la fermentación de la leche de soya con *Lactobacillus* sp. y la adición de *Propionibacterium freudenreichii* sobre las propiedades del queso de soya, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con dos repeticiones (Cuadro 5.1). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las respuestas (la sobrevivencia de los microorganismos, la concentración de fitatos, actividad antioxidante, contenido de isoflavonas, composición de compuestos volátiles y el análisis sensorial del queso de soya) y se utilizó la diferencia mínima significativa para comparar las medias con un nivel de significancia de 0.05 para cada prueba. Para el análisis estadístico de los datos se empleó el Software Statgraphics Centurion XV.

Cuadro 5.1 Diseño experimental para la elaboración de queso de soya

Tratamientos	
1	Control
2	<i>L. fermentum</i>
3	<i>L. fermentum</i> + <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
4	<i>L. plantarum</i>
5	<i>L. plantarum</i> + <i>Propionibacterium freudenreichii</i>

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fermentación de leche de soya con *L. plantarum* y *L. fermentum*

6.1.1 Determinación de inhibidores de tripsina y fitatos en leche de soya

En el Cuadro 6.1 se presentan los resultados de la evaluación de IT en la leche de soya. Los resultados indican la presencia de IT en la leche de soya antes de someterla al tratamiento térmico (11.86 mg IT/g).

Cuadro 6.1 Concentración de inhibidores de tripsina en leche de soya

Muestra	UIT/g	IT (mg/g peso seco)
LSC	25,551.01±3649	11.86±1.92
LST	No detectado	No detectado

LSC: Leche de soya control

LST: Leche de soya con tratamiento térmico (112°C, 12 min)

UIT: Unidades de inhibidores de tripsina

IT: Inhibidores de tripsina

Después del tratamiento térmico no se detectó la presencia de IT. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Egounlety *et al.* (2003) quienes señalan que los inhibidores de tripsina son sensibles al tratamiento térmico, ya que el proceso de calentamiento los desnaturaliza. Diversos autores han comprobado que la presencia de inhibidores de tripsina provoca daños a la salud, ya que estos compuestos interfieren en la acción de la enzima intestinal tripsina (debido a la compatibilidad de los enlaces peptídicos de los IT con el sitio activo de la tripsina, se forman complejos estables y enzimáticamente inactivos). Además, la presencia de este compuesto provoca la mala absorción de los alimentos (Coscueta *et al.*, 2017), por lo que es importante destacar que la presencia de IT en los alimentos es indeseable.

El fitato es considerado un factor antinutricional ya que puede ocasionar la disminución de la disponibilidad de micronutrientes (hierro, zinc, calcio, etc.). En el Cuadro 6.2 se presentan los resultados de la evaluación del contenido de fitato presente en la leche de soya antes y después del tratamiento térmico. Los resultados indican que no existe diferencia estadística significativa en la concentración de fitatos. Los resultados concuerdan con lo reportado por Egounlety *et al.* (2003), quienes mencionan que el tratamiento térmico (100°C, 30 min) no tiene un efecto estadístico significativo sobre el contenido de fitatos presentes en granos de soya, caupí y frijol.

Cuadro 6.2 Concentración de fitatos en leche de soya

Muestra	mg fitato/g peso seco
Leche de soya control	2.82±0.05 a
Leche de soya con tratamiento térmico (112°C, 12 min)	2.58±0.11 a
DMS	0.381

Los resultados se expresan como medias \pm es el error estándar de las medias; cada dato es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

Aunque no existen normas que regulen la concentración de fitatos permitida en los alimentos para consumo humano, es deseable que la concentración de fitatos en los alimentos sea mínima (Gibson, 2010). Estas concentraciones dependerían de factores como la edad de las personas, la calidad y variedad de la alimentación, estado de salud de las peronas, entre otros. Debido a que los fitatos permanecieron presentes en la leche de soya sometida a tratamiento térmico, fue importante evaluar en la siguiente etapa de la investigación el efecto de la fermentación de la leche de soya con las BAL sobre el contenido de fitato.

6.1.2 Crecimiento celular y pH durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas

En la Figura 6.1 se presenta el crecimiento celular de *L. plantarum* BAL-03-ITTG y *L. fermentum* BAL-21-ITTG y el cambio de pH durante la fermentación de leche de soya. Durante la fermentación, la población celular de *L. plantarum* incrementó de 7.2 a 8.6 log UFC/g, mientras que para *L. fermentum* la población celular incrementó de 7.4 a 8.6 log UFC/g a las de 24 h de fermentación. La cinética de crecimiento muestra que ambas bacterias tienen una fase de adaptación de 2 y 4 horas para *L. fermentum* y *L. plantarum*, respectivamente. Entre las 2 y 8 horas de fermentación se presenta la fase logarítmica de crecimiento para ambas cepas. Resultados similares fueron reportados por Zhao y Shah (2014) en la fermentación de leche de soya con *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. zeae* y *rhamnosus*, en el cual se reporta un incremento de 1.5-2 log UFC/mL después de 12 a 24 h de fermentación.

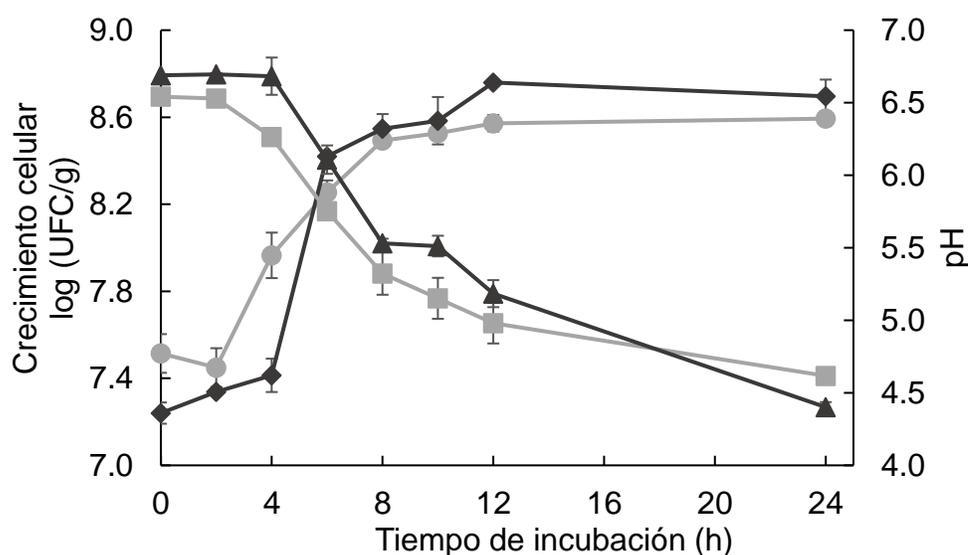


Figura 6.1 Crecimiento celular (◆) y pH (▲) durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum*, crecimiento celular (●) y pH (■) durante la fermentación de leche de soya con *L. fermentum*.

L. plantarum tuvo una velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y un tiempo de duplicación de $0.652 \pm 0.082 \text{ h}^{-1}$ y $1.071 \pm 0.136 \text{ h}$ respectivamente, mientras que para *L. fermentum* la $\mu_{\text{máx}}$ y los tiempos de duplicación fueron $0.394 \pm 0.020 \text{ h}^{-1}$ y

1.763±0.093 h respectivamente. Estos valores son menores a los reportados por Yoon (2008) en el cual la $\mu_{\text{máx}}$ y el tiempo de duplicación fueron de 1.35 h⁻¹ y 0.513 h respectivamente, durante la fermentación de leche de soya con *L. curvatus*.

Durante la fermentación, el pH de la leche de soya descendió de 6.5 a 4.5 para ambas cepas (Figura 6.1); esto podría ser debido principalmente a la producción de ácido láctico. Un comportamiento similar en el descenso de pH fue reportado por Baú *et al.* (2015), alcanzando el valor más bajo (4.97) en la fase estacionaria de crecimiento, después de 20 horas de fermentación.

6.1.3 Actividad α -galactosidasa durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas

La actividad α -galactosidasa en la leche de soya fermentada con las BAL varió entre 0.007-0.019 UA/g de leche de soya para *L. plantarum*, mientras que en la leche de soya fermentada con *L. fermentum*, la actividad varió entre 0.001-0.020 UA/g, alcanzándose la máxima actividad a las 8 h de fermentación. Además, la actividad de la enzima α -galactosidasa mostró un comportamiento similar al crecimiento celular, observando la mayor actividad en la fase de crecimiento exponencial comprendido entre las 2 y 8 h de fermentación, lo que indica que la producción de esta enzima se encuentra asociada al crecimiento microbiano (Figura 6.2). Resultados similares fueron reportados por Baú *et al.* (2015) en la fermentación de leche con kéfir en la cual la actividad enzimática varió entre 0.005 a 0.016 UA/g, logrando una reducción del 99.22 y 84% de rafinosa y estaquiosa respectivamente después de 24 h de fermentación. Por otra parte, Hati *et al.* (2014) reportaron la producción de la enzima α -galactosidasa en leche de soya fermentada con diferentes cepas de *L. rhamnosus*, lo que provocó una reducción del contenido de rafinosa y estaquiosa del 79.8 y 83.8% respectivamente, indicando que la actividad de la enzima α -galactosidasa depende de la cepa empleada y de la cantidad de oligosacáridos presentes en el medio de cultivo.

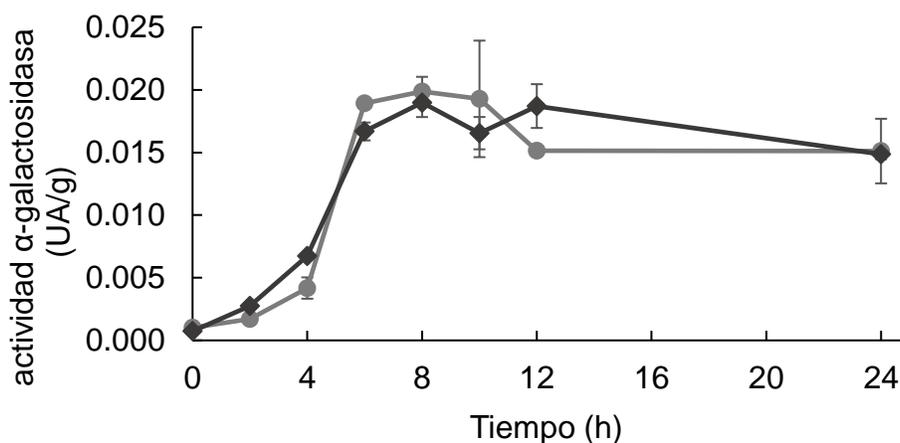


Figura 6.2 Actividad α -galactosidasa durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum* (◆) y *L. fermentum* (●).

Los resultados sugieren que durante la fermentación de la leche de soya con *L. plantarum*-BAL-03-ITTG y *L. fermentum* BAL-21-ITTG, estos microorganismos podrían hidrolizar los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa en azúcares simples que podrían ser utilizados para su crecimiento. La actividad máxima de la enzima se obtuvo después de 8 h de fermentación y luego se mantuvo en valores de 0.019 a 0.015 UA/g hasta las 24 h de fermentación. Resultados similares fueron reportados por Baú *et al.* (2015) quienes reportaron que durante la fermentación de leche de soya con la actividad de la enzima α -galactosidasa se mantiene constante después la fase de crecimiento exponencial. Lo anterior podría deberse a la concentración de azúcares, se ha reportado que durante la fermentación de leche de soya a consecuencia de la hidrólisis de rafinosa y estaquiosa, el contenido de sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa aumenta, lo que puede provocar la represión de la actividad de la α -galactosidasa (Baú *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario realizar el análisis del contenido de azúcares durante la fermentación para evidenciar la disminución de rafinosa y estaquiosa, con el objetivo de determinar si los valores de actividad enzimática obtenidos permitieron la hidrólisis completa o parcial de estos azúcares.

6.1.4 Actividad β -glucosidasa y contenido de isoflavonas durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas

La actividad β -glucosidasa en la leche de soya fermentada con las BAL se observó en el rango de 0.004-0.026 UA/g para *L. plantarum*, alcanzando la actividad máxima a las 10 h de fermentación, mientras que en la leche de soya fermentada con *L. fermentum* estuvo entre 0.006 y 0.027 UA/g. La enzima β -glucosidasa mostró la mayor actividad después de 8 h de fermentación, lo cual coincide con la etapa logarítmica de crecimiento, en esta etapa se presentó una mayor conversión de β -glucósidos a sus correspondientes agliconas. La actividad enzimática disminuyó después de la fase de crecimiento exponencial hasta las 24 h de fermentación (Figura 6.3). Los resultados concuerdan con otros autores, quienes indican que cepas de *Lactobacillus* tienen la capacidad de producir la enzima β -glucosidasa en concentraciones alrededor de 0.005-0.016 UA/g (Baú *et al.*, 2015), reportando que la mayor actividad se presenta en la etapa de crecimiento exponencial, seguida de una disminución de la actividad en la etapa estacionaria (Rekha y Vijayalakshmi *et al.*, 2011; Hati *et al.*, 2014; Baú *et al.*, 2015). La enzima β -glucosidasa es la enzima responsable de catalizar la hidrólisis de isoflavonas β -glucósidos a agliconas (Baú *et al.*, 2015), de ahí su gran importancia.

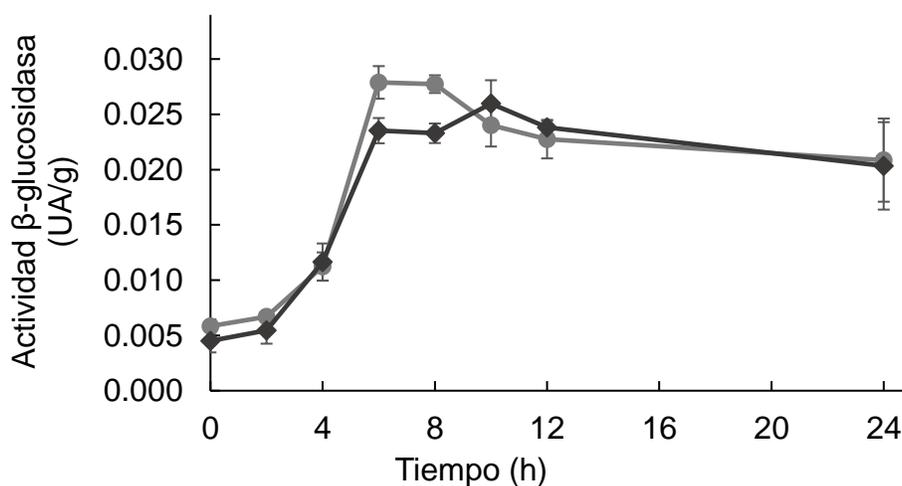


Figura 6.3 Actividad β -glucosidasa durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum* (◆) y *L. fermentum* (●).

En la leche de soya fermentada con *L. plantarum* y *L. fermentum*, se detectó la conversión de β -glucósidos en agliconas. En los Cuadros 6.3 y 6.4 se presentan el contenido de isoflavonas en leche de soya fermentada con *L. plantarum* y *L. fermentum*, respectivamente.

Cuadro 6.3 Concentración de isoflavonas durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum*.

Tiempo (h)	Contenido de isoflavonas (μ moles/g en base seca)					
	β -glucósidos			Agliconas		
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
0	3.967 ^{ab}	0.555 ^a	2.842 ^a	0.333 ^d	0.008 ^c	0.532 ^e
2	4.070 ^a	0.572 ^a	2.847 ^a	0.376 ^{cd}	0.006 ^c	0.459 ^e
4	3.602 ^{ab}	0.490 ^a	2.605 ^a	0.343 ^d	0.006 ^c	0.525 ^e
6	3.500 ^b	0.540 ^a	2.468 ^{ab}	0.804 ^c	0.009 ^c	0.969 ^d
8	2.655 ^c	0.672 ^a	2.133 ^{bc}	1.355 ^b	0.024 ^{bc}	1.175 ^{cd}
10	1.896 ^d	0.611 ^a	1.778 ^c	1.755 ^b	0.032 ^{bc}	1.424 ^c
12	1.605 ^d	0.627 ^a	1.691 ^c	2.326 ^a	0.054 ^b	1.825 ^b
24	0.931 ^e	0.458 ^a	0.949 ^d	2.645 ^a	0.118 ^a	2.450 ^a
DMS	0.528	0.465	0.444	0.460	0.031	0.267

Los resultados se expresan como el promedio de 2 replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

Durante la fermentación de leche de soya el contenido de daidzina y genistina disminuyen significativamente ($p \leq 0.05$) durante la fermentación, pero el contenido de glicitina fue constante durante las 24 h de fermentación, sin embargo el contenido de gliciteína incrementó al final de la fermentación (Cuadro 6.3). Chien *et al.* (2006) reportaron que durante la fermentación de leche de soya con BAL se puede llevar a cabo la hidrolisis de isoflavonas como malonilglicitina, acetilglicitina y glicitina, las cuales pueden contribuir al aumento en la concentración de gliciteína. El contenido de daidzeína y genisteína aumentaron significativamente durante la fermentación. Las isoflavonas β -glucósidos son convertidas en agliconas mediante la acción de la enzima

β -glucosidasa (Figura 6.4), que cataliza la hidrólisis de los enlaces β -glucosídicos para liberar sus correspondientes agliconas, las cuales tienen mayor actividad (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Baú *et al.*, 2015). Las isoflavonas agliconas se absorben en el intestino delgado humano más fácilmente que sus conjugados glucosilados, debido a que las agliconas tienen un menor peso molecular lo cual permite una mejor difusión y absorción (Rekha y Vijayalakshmi, 2011).

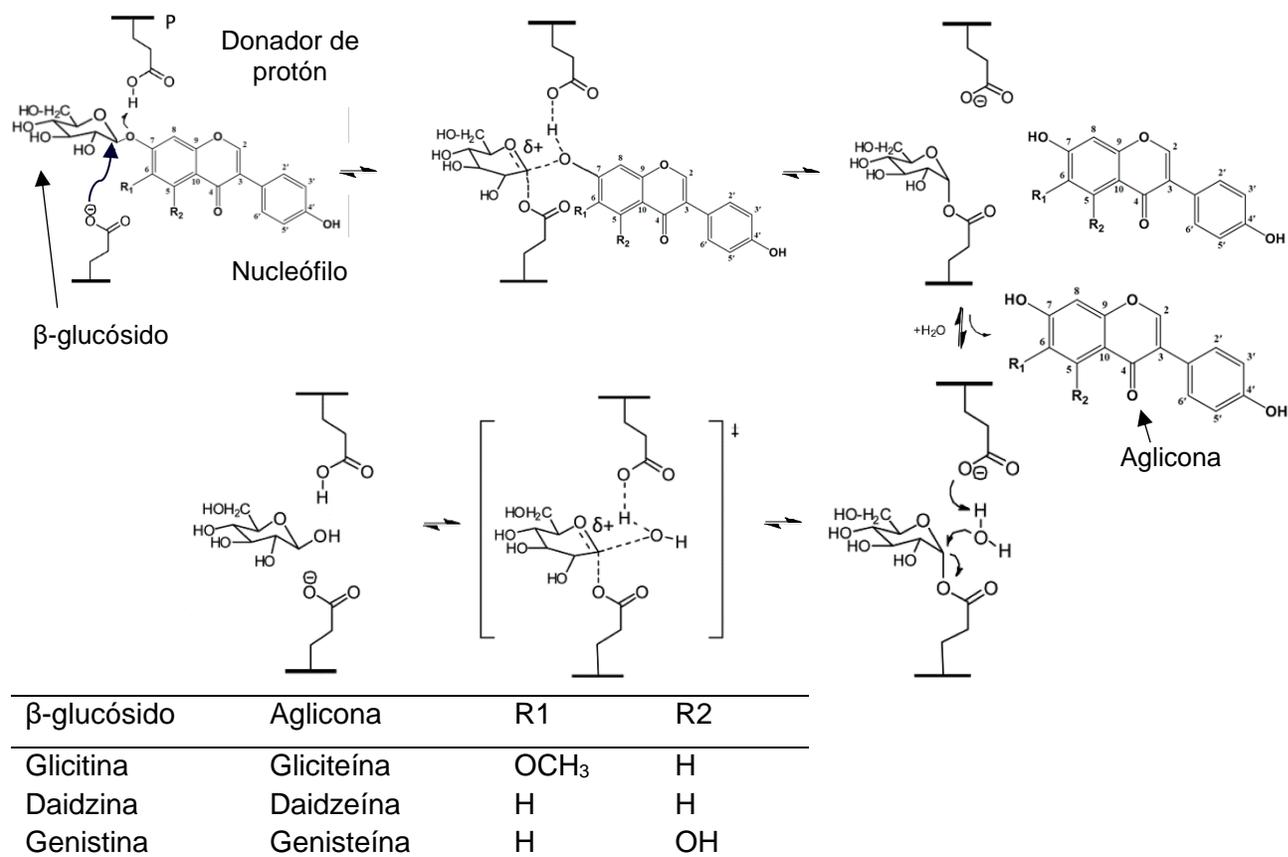


Figura 6.4 Mecanismo de reacción de la enzima β -glucosidasa.

Reacción de doble desplazamiento. El primer paso de la reacción de hidrólisis, comienza con el ataque nucleofílico de un glutamato en el carbono anomérico (C1) del glucósido, formando un intermediario unido covalentemente. El segundo paso es la desglucosilación, en la cual una molécula de agua sirve como el segundo nucleófilo para liberar la glucosa del estado intermedio. (Adaptado de Badieya *et al.*, 2012).

En la leche de soya fermentada después de 24 h con *L. plantarum* el contenido de isoflavonas agliconas incrementó 490%, mientras que en la leche de soya fermentada con *L. fermentum* se observó un aumento de 420%. Estos porcentajes son más altos

que los reportados por Zhao y Shah (2014), quienes observaron que en la leche de soya que contiene glucosa (1%, p/v) después de 12 a 24 h de fermentación con *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. zaeae* y *L. rhamnosus* el contenido de isoflavonas agliconas incrementaba de 309 a 337%.

Cuadro 6.4 Concentración de isoflavonas durante la fermentación de leche de soya con *L. fermentum*.

Tiempo (h)	Contenido de isoflavonas ($\mu\text{moles/g}$ en base seca)					
	β -glucósidos			Agliconas		
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
0	4.201 ^a	0.570 ^a	3.029 ^a	0.361 ^d	0.006 ^c	0.504 ^c
2	3.814 ^a	0.492 ^b	2.692 ^a	0.344 ^d	0.009 ^c	0.505 ^c
4	3.156 ^b	0.412 ^{cd}	2.124 ^b	0.595 ^d	0.008 ^c	0.826 ^c
6	2.829 ^b	0.429 ^{bc}	1.896 ^b	1.248 ^c	0.048 ^b	1.374 ^b
8	1.800 ^{cd}	0.340 ^e	1.263 ^c	2.118 ^b	0.102 ^a	2.011 ^a
10	1.959 ^c	0.380 ^{cde}	1.466 ^c	2.314 ^{ab}	0.111 ^a	2.085 ^a
12	1.682 ^{cd}	0.351 ^{de}	1.327 ^c	2.302 ^{ab}	0.113 ^a	2.018 ^a
24	1.382 ^d	0.368 ^{cde}	1.291 ^c	2.541 ^a	0.114 ^a	2.185 ^a
DMS	0.547	0.069	0.382	0.338	0.026	0.387

Los resultados se expresan como el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

En la leche de soya fermentada con *L. plantarum* y *L. fermentum*, el contenido total de isoflavonas agliconas fue de 1.371 mg/g y 1.27 mg/g respectivamente, mientras que en la leche de soya no fermentada fue de 0.23 mg/g. Estos resultados demuestran que durante la fermentación de leche de soya con las BAL, estos microorganismos tuvieron la capacidad de producir la enzima β -glucosidasa en concentraciones similares a lo reportado por otros autores (Bau *et al.*, 2015) y que tienen la capacidad de producir leche de soya con mayor contenido de agliconas, las cuales se han reportado que tienen mayor efecto benéfico que otro tipo de isoflavonas (Messina y Messina, 2000).

6.1.5 Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante en la leche de soya fermentada con bacterias ácido lácticas

En la Figura 6.5 se muestra el contenido de fenoles totales durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum* y *L. fermentum*. La leche de soya sin fermentar contiene 65 ± 3.61 mg de EAG por 100 g de muestra. Al final de la fermentación, las muestras mostraron una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de fenoles totales. El contenido de fenoles totales disminuye principalmente durante la fase de crecimiento exponencial (las primeras 8 h), lo que sugiere que los microorganismos podrían estar metabolizando algunos de estos compuestos fenólicos o estar siendo utilizados para evitar la oxidación de los ácidos grasos presentes en la leche de soya. Zhao y Shah (2014) reportaron la disminución del contenido de fenoles en leche de soya fermentada con *L. zaeae*.

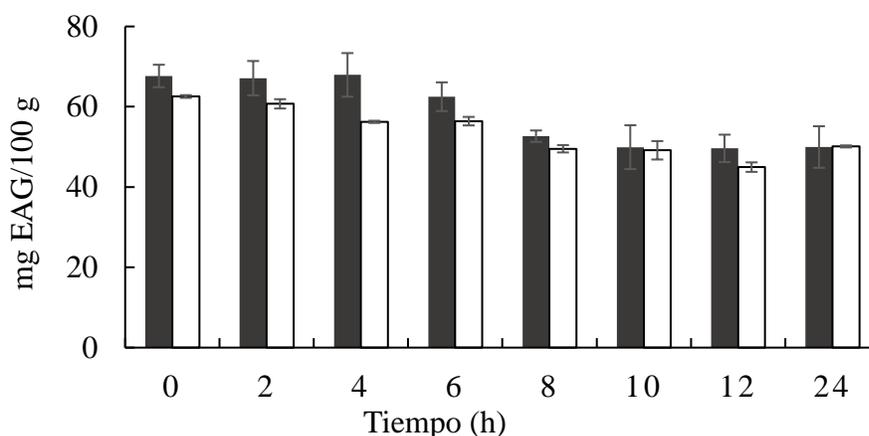


Figura 6.5 Contenido de fenoles totales durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum* (■) y *L. fermentum* (□).

Entre los principales compuestos fenólicos reportados en la leche de soya se encuentran el ácido gálico, el ácido 4-hidroxibenzoico, el ácido *p*-cumárico, el ácido ferúlico, el ácido cinámico y el ácido clorogénico y catequina (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Zhao y Shah, 2014). Se ha reportado que diversas cepas como *L. plantarum* poseen dos descarboxilasas de ácido fenólico (PAD) inducibles en presencia de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico. La enzima PAD descarboxila al ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico a sus correspondientes derivados vinilo (Figura 6.6) (4-vinil fenol y 4-vinil

guayacol) (Rodríguez *et al.*, 2009). Mediante la acción de la enzima PAD y la enzima reductasa, *L. plantarum* puede metabolizar el ácido cafeico a vinil catecol y etil catecol (Cavin *et al.*, 1997).

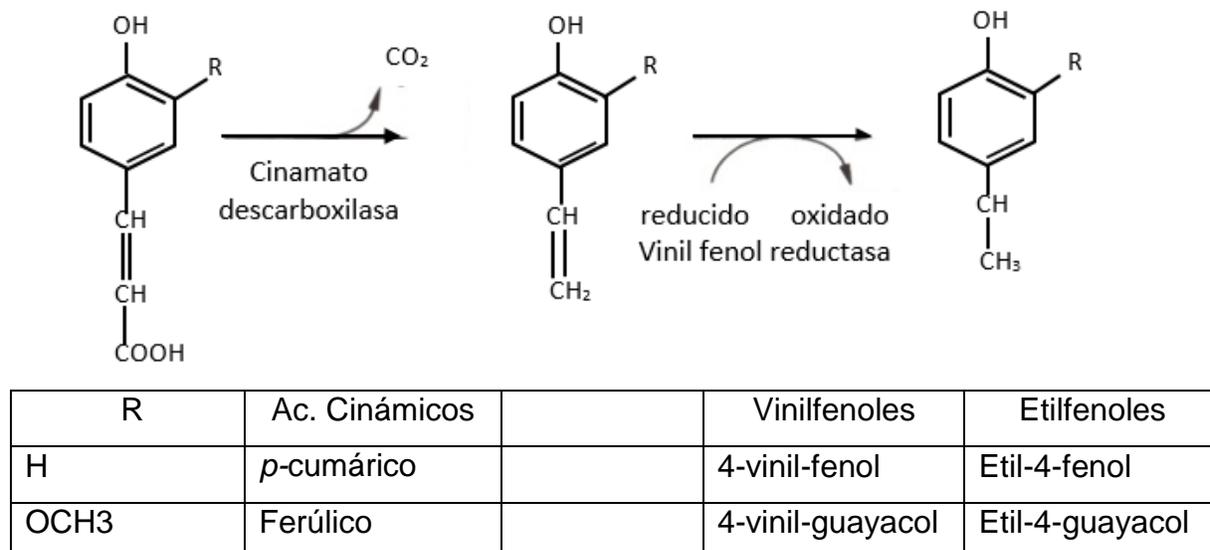


Figura 6.6 Formación de vinilfenoles.

Otra explicación posible es que los compuestos fenólicos podrían estar retrasando o inhibiendo los procesos de oxidación, evitando la formación de compuestos volátiles (aldehídos y cetonas), provocando la disminución de la concentración de estos compuestos fenólicos (Alamed *et al.*, 2009). Virtanen *et al.* (2007) reportaron que durante la fermentación de la leche de soya con BAL se pueden producir péptidos y aminoácidos antioxidantes. Lo anterior podría explicar que en leche de soya fermentada con *L. fermentum* después de 24 h se observó un ligero aumento en el contenido de fenoles totales.

En la Figura 6.7 se presenta la actividad antioxidante de los extractos hidrofílicos y lipofílicos durante la fermentación de la leche de soya. Se observa que la actividad antioxidante del extracto hidrofílico (Figura 6.7A) fue en el rango de 16 a 24% (expresado como porcentaje de inhibición del radical DPPH). Para el extracto hidrofóbico, el porcentaje de inhibición varió entre 0.2 y 1.7%. La actividad antioxidante de los extractos hidrofóbicos y lipofílicos son similares a los reportados por Zhao y Shah (2014), quienes mostraron que durante la fermentación de la leche de soya con

L. acidophilus, *L. paracasei*, *L. zeae* o *L. rhamnosus*, el porcentaje de inhibición del radical DPPH de los extractos (expresado como la sumatoria de la actividad del extracto hidrofóbico y lipofílico) osciló en un rango del 14 al 19.6%. Aunque el contenido de fenoles disminuyó durante la fermentación, la actividad antioxidante se mantuvo constante, no existiendo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) de los extractos hidrofílicos para ambas cepas. Esto podría deberse al aumento de agliconas durante la fermentación.

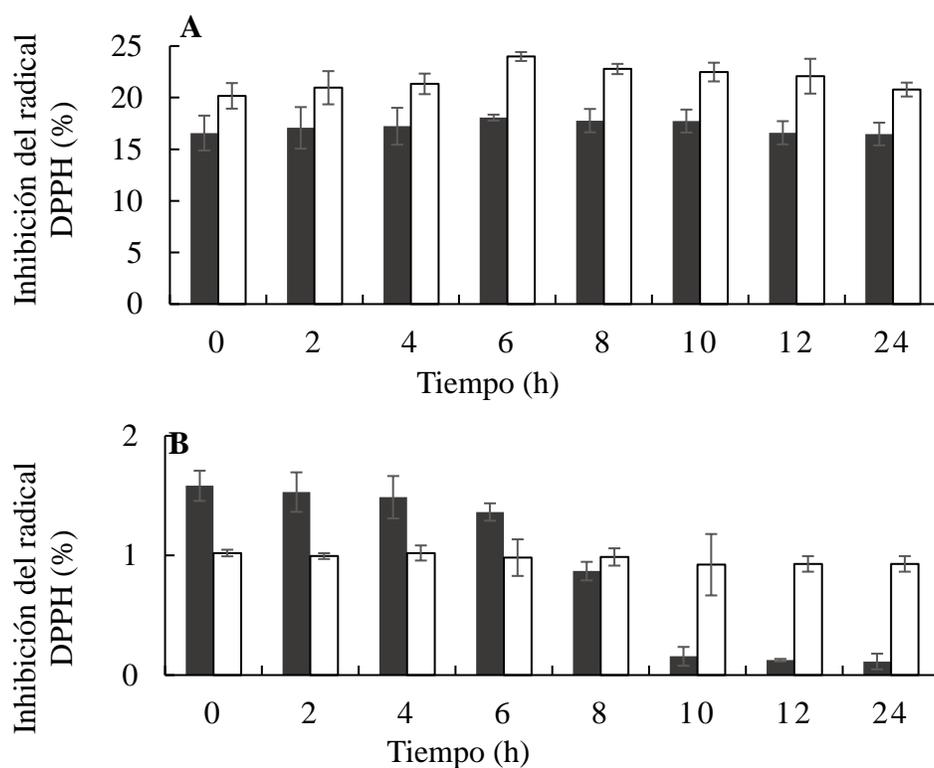


Figura 6.7 Actividad antioxidante de los extractos hidrofílicos (A) y lipofílicos (B) durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum* (■) y *L. fermentum* (□).

Al final de la fermentación, la leche de soya fermentada con *L. plantarum* tuvo una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la actividad antioxidante de los extractos lipofílicos. Sin embargo, este comportamiento no ocurrió en las muestras obtenidas mediante fermentación con *L. fermentum*. Entre los principales antioxidantes lipofílicos reportados en la leche de soya se encuentra la vitamina E (α -tocoferol) y la vitamina A

(retinol), vitamina D y vitamina K (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Zhao y Shah, 2014). Zhao y Shah (2014) reportaron la disminución de la concentración de α -tocoferol en la leche de soya fermentada con *L. acidophilus* y *L. paracasei*, sin embargo, en leche de soya fermentada con *L. zaeae* y *L. rhamnosus* el contenido de α -tocoferol incrementó durante la fermentación, lo cual indica que en presencia de la vitamina A, las BAL pueden presentar un comportamiento diferente. Sin embargo, a nuestro conocimiento no existen reportes que indiquen si las BAL pueden metabolizar esta vitamina presente en la leche de soya.

6.1.6 Contenido de fitato durante la fermentación de leche de soya con bacterias ácido lácticas

Con el fin de determinar si durante la fermentación de la leche de soya con BAL el contenido de fitato disminuía, se evaluó su concentración durante el proceso de fermentación. El contenido inicial de fitato fue de 2.58 ± 0.02 mg/g de leche de soya, pero este disminuyó significativamente en las primeras 6 y 4 h de fermentación con *L. plantarum* y *L. fermentum*, respectivamente (Cuadro 6.5).

Cuadro 6.5 Reducción de fitato durante la fermentación de leche de soya con *L. plantarum* y *L. fermentum*.

Tiempo de incubación (h)	Reducción de fitato (%)	
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
0	0 ^e	0 ^d
2	0.11 ^e	0.86 ^d
4	0.96 ^e	4.57 ^c
6	10.00 ^d	11.87 ^b
8	16.00 ^c	20.26 ^a
10	19.82 ^a	20.59 ^a
12	20.69 ^a	20.52 ^a
24	20.73 ^a	20.90 ^a
DMS	1.729	1.165

Los resultados se expresan como medias, \pm es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

Después de 24 h de fermentación de la leche de soya, la reducción de fitato fue del 20%. Por lo anterior la concentración de fitatos residual se estimó en aproximadamente 2.2 mg/g. Diversos autores han reportado que diferentes cepas de *Lactobacillus* tienen la capacidad de reducir los niveles de fitatos en los alimentos, ya que se ha reportado que las BAL tienen la capacidad de producir la enzima fitasa, la cual cataliza la hidrólisis secuencial de fitato a fosfato (Raghavendra y Halami, 2009; Fischer *et al.*, 2014). El mecanismo de reacción de la fitasa es un mecanismo de dos pasos que incluye la formación de fosfohistidina como intermediario de reacción. El sitio activo está formado por RHGXRXP (Arginina-Histidina-Glicina-X-Arginina-X-Prolina, donde X puede ser cualquier aminoácido) e HD (Histidina-Ácido Aspártico). El residuo His de RHGXRXP sirve como un nucleófilo para atacar el enlace fosfoéster, formando un intermediario covalente (fosfohistidina), mientras que el residuo Asp de HD dona un protón de su grupo carboxilo al sustrato que da como resultado la formación del intermediario fosfoenzima y la liberación del sustrato desfosforilado. Posteriormente, el enlace histidina-fosfato se rompe por hidrólisis por una molécula de agua liberando el grupo fosfato y devolviendo un protón al grupo carboxilo del Asp (Veeramani *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015).

Saraniya y Jeevaratnam (2015) reportaron que en la fermentación de leche de soya la enzima fitasa fue producida por diferentes cepas de *L. plantarum* y *L. pentosus* y se obtuvo una disminución de 47 a 66% del contenido de fitato después de 18 h de fermentación en comparación con la leche de soya no fermentada. Otros autores, sin embargo, reportaron que en leche de soya fermentada con *L. casei* el contenido de fitato se mantuvo constante durante toda la fermentación (García-Mantrana *et al.*, 2015). En leche de soya suplementada con fitato, el contenido de fitato no disminuyó significativamente durante la fermentación y almacenamiento de la leche de soya con diversas cepas de BAL (Tang *et al.*, 2010). Por lo tanto, la capacidad de reducir la concentración de fitato podría depender del origen de la cepa o de las condiciones de cultivo utilizadas.

La concentración residual de fitatos fue de 2.2 mg/g de leche de soya, la presencia de fitatos en los alimentos no es deseada, debido a que es considerado un factor antinutricional ya que reduce la biodisponibilidad de proteínas y minerales presentes en la dieta (Frölich y Asp, 1985; Nolan et al., 1987). Se ha reportado sin embargo, que concentraciones de ácido fítico mayores a 5 mg de fitato/g de alimento pueden tener un efecto en la absorción de hierro (Hurrell *et al.*, 2003), mientras que la presencia de 4 mg/g de alimento para cobre no tiene efecto significativo sobre el porcentaje de absorción de cobre (Egli *et al.*, 2004). La leche de soya obtenida tiene una concentración de fitato de alrededor de 2.2 mg/g por lo que de acuerdo a lo reportado no tendría un efecto significativo en la absorción de estos minerales. Por otra parte, Knox *et al.* (1991) reportaron que la ingesta de 25 g de pan con un contenido total de fitatos de 350 mg, interfiere con la retención de calcio en personas de la tercera edad, por lo cual para tener una concentración similar de fitato se tendrían que consumir alrededor de 150 g de leche de soya para obtener una dosis similar.

6.2 Queso de soya

6.2.1 Sobrevivencia de *L. plantarum*, *L. fermentum* y *P. freudenreichii* en queso de soya durante su maduración

En la Figura 6.8 se presenta el crecimiento celular de *L. fermentum* BAL-21-ITTG y *L. plantarum* BAL-03-ITTG en los quesos de soya durante 40 d de maduración. La población celular de *L. fermentum* en los quesos se mantuvo en 8.79-8.94-log UFC/g, para los quesos que fueron adicionados con *Propionibacterium freudenreichii* la población celular de *L. fermentum* se mantuvo entre 8.58 y 8.61 log UFC/g, mientras que la población celular de *P. freudenreichii* disminuyó de 8.57 a 8.05 log UFC/g (Cuadro 6.6).

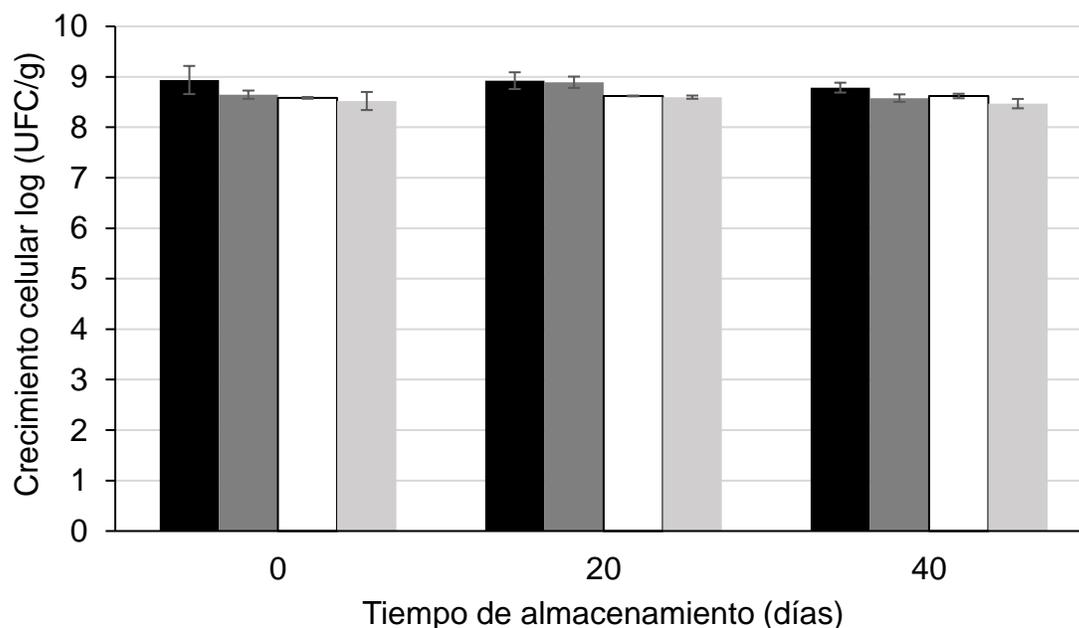


Figura 6.8 Crecimiento celular de *L. fermentum* y *L. plantarum* durante la maduración del queso de soya.

Queso de leche soya fermentada con *L. fermentum* (■), queso de leche de soya fermentada *L. fermentum* y adicionado con *P. freudenreichii* (■), queso de leche soya fermentada con *L. plantarum* (□) y queso de leche de soya fermentada *L. plantarum* y adicionado con *P. freudenreichii* (■).

Para *L. plantarum*, la población celular en los quesos se mantuvo entre 8.58 y 8.62 log UFC/g, mientras que en los quesos de soya que fueron adicionados con *P. freudenreichii* la población celular de *L. plantarum* se mantuvo en un rango de 8.52 a

8.47 log UFC/g y la población celular de *P. freudenreichii* disminuyó de 8.45 a 7.82 log UFC/g. A nuestro conocimiento no existen reportes previos del co-cultivo de *L. fermentum* y/o *L. plantarum* con *Propionibacterium* spp. para la elaboración de queso de soya, y su efecto sobre en el crecimiento de las BAL y las características fisicoquímicas del queso de soya.

Cuadro 6.6 Crecimiento celular de *P. freudenreichii* durante la maduración del queso de soya.

Tratamiento	Log UFC/g queso en base seca			DMS
	0	20	40	
3) <i>L. fermentum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	8.566 ^{aA}	8.082 ^{aB}	8.05 ^{aB}	0.197
5) <i>L. plantarum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	8.445 ^{aA}	8.16 ^{aAB}	7.815 ^{aB}	0.580
DMS	0.27	0.21	0.96	

Los resultados se expresan como el promedio de 2 replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

El presente estudio demostró que la adición de *P. freudenreichii* en los quesos de soya no tuvo un efecto estadístico significativo en la viabilidad de los *Lactobacillus* durante la maduración. Sin embargo, la viabilidad de este microorganismo disminuyó ligeramente después de 20 d de almacenamiento. Se ha reportado que cuando *Bifidobacterium* se cultiva en co-cultivo con *Propionibacterium* durante la fermentación de leche de soya, la presencia de *Propionibacterium* no tuvo efecto en la sobrevivencia de *Bifidobacterium* después de 96 h de fermentación a 36°C. Además, *Propionibacterium* no puede metabolizar sacarosa, rafinosa y estaquiosa, azúcares que se encuentran en mayor concentración en la leche de soya, por lo que tiene que fermentar otros azúcares como glucosa y fructosa, los cuales se encuentran en menor concentración (Wu *et al*, 2012). Por lo anterior, la disminución de la viabilidad de *P. freudenreichii* durante la maduración del queso de soya podría deberse a la concentración de estos carbohidratos (glucosa y fructosa).

De acuerdo a la FAO/OMS (2002), los probióticos en los alimentos deben estar a una concentración mínima de 6 log UFC/g, para que puedan ejercer su efecto benéfico. Por lo que, los resultados indican que los quesos de soya podrían ser un alimento funcional ya que *L. fermentum*, *L. plantarum* y *P. freudenreichii* pueden resistir al proceso de fabricación y maduración (por 40 d) del queso de soya a concentraciones superiores de 6 log UFC/g. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de resistencia a la simulación gastrointestinal para poder afirmarlo.

En cuanto a la actividad de agua (A_w) del queso, esta no cambió durante los 40 d de maduración manteniéndose en un rango de 0.95 a 0.94 en todos los quesos. Los quesos de soya tuvieron una masa inicial de aproximadamente 245 ± 21.17 g, sin embargo, después de 20 d de almacenamiento, los quesos perdieron aproximadamente 48 g de tal forma que el peso promedio de los quesos fue de 187.52 ± 23.26 g, masa que se conservó hasta los 40 d de almacenamiento. La disminución de la masa en los quesos de soya, podría atribuirse a la pérdida de agua por evaporación durante los primeros 5 d. La humedad relativa (HR) en la cámara de incubación (82-86%) pudo tener efecto en la pérdida de masa de los quesos, una humedad relativa demasiado pequeña puede llevar a una pérdida de peso elevada. El control de la HR es importante, pues para que no se formen grietas en la corteza y no se seque la superficie de los quesos, la humedad relativa del aire debe ser alta (>90%). Sin embargo, cuando la humedad relativa es muy alta el queso es más susceptible a contaminación microbiana (Plank, 1980).

Los quesos de soya de todos los tratamientos tuvieron un porcentaje de sólidos de entre 25.9 y 23.2 % (Cuadro 6.7), después de 20 d de maduración este porcentaje aumentó al 30.88-35.10 %. Walstra (1990) mencionó que en los quesos la cantidad de agua disponible está evaporándose de forma continua, lo que provoca el aumento del porcentaje de sólidos y la disminución de la hidratación de las proteínas, lo cual conduce a una mayor interacción de las mismas provocando el aumento de la firmeza de la matriz proteica.

Cuadro 6.7 Contenido de sólidos totales en los quesos de soya durante 40 días de maduración

Tratamiento/tiempo (d)	Contenido de sólidos totales (%)			
	0	20	40	DMS
1) Control	23.196 ^{cB}	32.674 ^{bA}	32.361 ^{bA}	0.715
2) <i>L. fermentum</i>	24.225 ^{bB}	30.883 ^{cA}	30.536 ^{cA}	0.586
3) <i>L. fermentum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	24.184 ^{bB}	31.957 ^{bcA}	31.247 ^{cA}	1.664
4) <i>L. plantarum</i>	25.932 ^{aB}	34.828 ^{aA}	35.598 ^{aA}	0.861
5) <i>L. plantarum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	25.786 ^{aB}	35.102 ^{aA}	34.103 ^{abA}	3.259
DMS	0.490	1.462	1.868	

Los resultados se expresan como medias, cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúscula son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

En los quesos obtenidos mediante fermentación, la cuenta en placa de levaduras, hongos y coliformes se mantuvieron debajo del límite de detección (1 log UFC/g), durante los 40 d de maduración. Mientras que en los quesos de soya control se detectaron microorganismos en las muestras con 40 d de almacenamiento.

Se ha reportado que la vida de anaquel máxima de quesos de soya es 7 a 15 d, incluso bajo condiciones normales de refrigeración (No y Meyers, 2004; Lee *et al.*, 2014). Lo anterior debido a que el queso de soya es un alimento perecedero por su alto contenido de nutrientes y alto contenido de humedad, lo cual lo hace susceptible al desarrollo de microorganismos (No y Meyers, 2004). Aunque se tomaron medidas de higiene se presentó la presencia de microorganismos en las muestras del tiempo 40 de los quesos obtenidos con acidificación directa con ácido láctico. La presencia de microorganismos podría atribuirse a que los quesos de soya se empacaron al vacío después de 5 días de incubación, por lo cual los quesos quedaron expuestos durante ese tiempo en la cámara de incubación. No obstante, el tiempo de vida de anaquel de

estos quesos de soya fue superior a lo reportado por otros autores como Lee *et al.* (2014) quienes reportan una vida de anaquel de 9 d en quesos de soya empacados al vacío.

La mayor vida de anaquel de los quesos de soya obtenidos mediante fermentación, podría atribuirse a la presencia en los quesos fermentados de compuestos con actividad antimicrobiana como alcoholes y ácidos orgánicos, los cuales podrían ayudar a aumentar la vida de anaquel de estos alimentos. Se ha reportado que la utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH debido a la producción de ácidos orgánicos, es el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las BAL en los alimentos fermentados (Vásquez *et al.*, 2009).

6.2.2 Concentración de ácido láctico y ácido acético en el queso de soya durante su maduración

En el Cuadro 6.8 se presentan los resultados de la producción de ácido láctico durante el proceso de maduración de los quesos de soya. La concentración inicial de ácido láctico en los quesos de soya fue de 8.794-10.592 mg/g de queso (base seca). Después de 20 d de maduración en los quesos obtenidos mediante fermentación se observó un incremento en la concentración de ácido láctico (entre 23.19 y 26.98 mg/g), dichos valores se mantuvieron hasta los 40 d de maduración. Concentraciones similares de ácido láctico han sido reportadas en queso de soya obtenidos mediante fermentación (3.5 mg a 27 mg/g) (Kumar *et al.*, 2018 y Adepehin *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente, la presencia de ácidos orgánicos como el acético y láctico, al ser antimicrobianos, pudo contribuir a que en los quesos de soya obtenidos mediante fermentación no se detectaran la presencia de microorganismos contaminantes. El ácido láctico (uno de los principales metabolitos finales de la fermentación) es utilizado como un bioconservador por su capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos humanos más comunes y evitar el deterioro de los alimentos (El-Ghaish *et al.*, 2011). El ácido láctico puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado interfieren con funciones celulares (producción de enzimas) y por otro lado, la

disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular, lo que provoca el descenso del pH interno, causando a su vez la desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad de los microorganismos patógenos

Cuadro 6.8 Contenido de ácido láctico de los quesos de soya durante la maduración

Tratamiento/tiempo (d)	Contenido de ácido láctico (mg /g queso seco)			
	0	20	40	DMS
1) Control	8.794 ^{bA}	8.308 ^{bA}	NC	1.582
2) <i>L. fermentum</i>	10.592 ^{aB}	26.981 ^{aA}	25.974 ^{aA}	2.731
3) <i>L. fermentum</i> + <i>Propionibacterium</i>	10.439 ^{aB}	23.189 ^{aA}	25.104 ^{aA}	2.238
4) <i>L. plantarum</i>	9.644 ^{abB}	23.865 ^{aA}	24.870 ^{aA}	5.427
5) <i>L. plantarum</i> + <i>Propionibacterium</i>	9.442 ^{abB}	25.122 ^{aA}	24.908 ^{aA}	2.424
DMS	1.582	3.863	1.540	

NC: no cuantificado. El contenido de ácido láctico presente en el queso de soya se expresa en miligramos por gramo de queso (base seca). Los resultados se expresan como medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

En la Figura 6.9 se presentan los resultados de la producción de ácido acético durante el proceso de maduración de los quesos de soya. Durante los 40 d de almacenamiento, en los quesos del tratamiento control no se detectó la presencia de ácido acético, mientras que después de 20 d la concentración de ácido acético fue 1.093-2.107 mg/g en los quesos obtenidos mediante fermentación, dichos valores se mantuvieron después de 40 d de maduración.

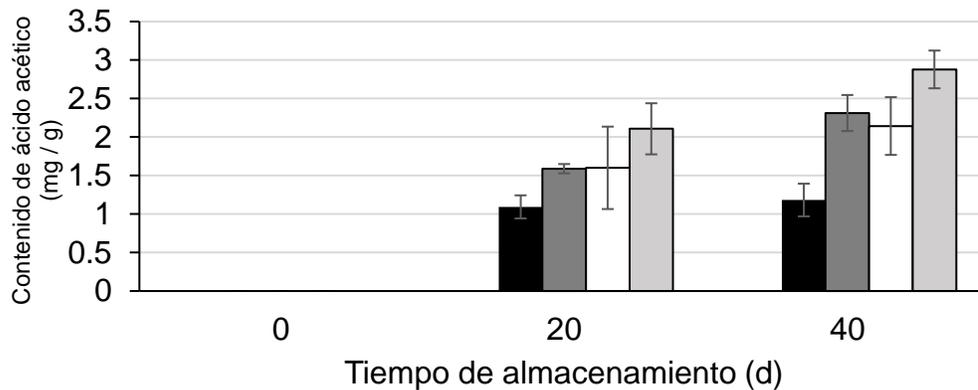


Figura 6.9 Concentración de ácido acético durante la maduración del queso de soya. Queso de leche soya fermentada con *L. fermentum* (■), queso de leche de soya fermentada *L. fermentum* y adicionado con *Propionibacterium* (■), queso de leche soya fermentada con *L. plantarum* (□) y queso de leche de soya fermentada *L. plantarum* y adicionado con *Propionibacterium* (■).

Estos ácidos orgánicos probablemente contribuyeron en la disminución del pH, ya que después de 40 d de maduración el pH de los quesos de soya obtenidos mediante fermentación descendió de 5.2 a entre 4.1 y 4.4 (Figura 6.10). Un comportamiento similar en el descenso de pH durante el almacenamiento de queso de soya fermentado con *L. rhamnosus* fue reportado por Liu *et al.* (2006), quienes observaron la disminución del pH del queso de 4.8 a 4.4 después de 20 d de almacenamiento a 10°C, lo cual provocó la disminución de la población celular de *L. rhamnosus*.

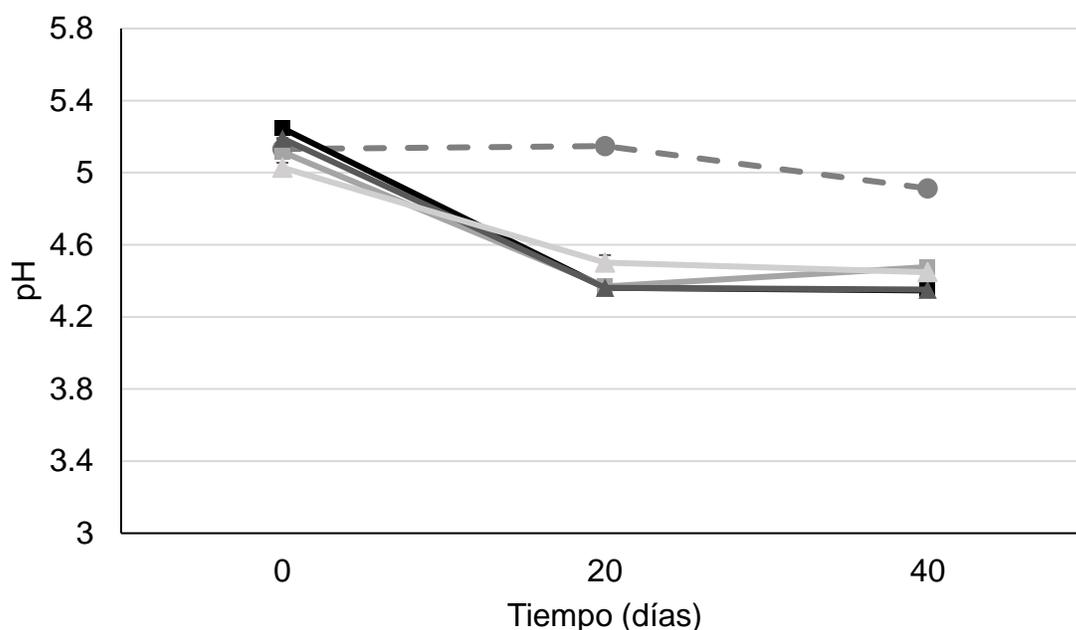


Figura 6.10 Cambios en el pH durante la maduración de queso de soya.

Queso control (-●-), queso de leche soja fermentada con *L. fermentum* (-■-), queso de leche de soja fermentada *L. fermentum* y adicionado con *Propionibacterium* (-◆-), queso de leche soja fermentada con *L. plantarum* (-▲-), queso de leche de soja fermentada *L. fermentum* y adicionado con *Propionibacterium* (-△-).

6.2.3 Contenido de fitato durante la maduración de queso de soya.

En el Cuadro 6.9 se presenta el contenido de fitatos presente en los quesos de soya durante su maduración. El contenido inicial de fitato en los quesos de soya del tratamiento control fue de 1.38 g/100 g de queso en base seca. Sin embargo, este valor fue significativamente menor en los quesos obtenidos mediante fermentación de leche de soya con *L. fermentum* o *L. plantarum* (Cuadro 6.9). La adición de *Propionibacterium freudenreichii* no disminuyó significativamente la concentración de fitato durante la maduración de los quesos de soya. Concentraciones similares de fitatos han sido indicados por otros autores, Schlemmer *et al.* (2009) quienes reportaron valores entre 0.5 y 2.90 g/100g en los quesos de soya.

En los quesos obtenidos mediante fermentación no existió diferencia estadística significativa en el contenido de fitatos en las muestras del tiempo 0 y el tiempo 40. Greiner y Konietzny (2006) reportaron que la temperatura óptima para la actividad de la enzima fitasa varía de 35-80°C. Por otra parte, Wemmenhove *et al.* (2016) reportan

que el cambio en la actividad de agua puede contribuir en la inhibición de la actividad metabólica de los microorganismos.

Cuadro 6.9 Contenido de fitato en quesos de soya durante su maduración

Tratamiento	Contenido de fitato (g/100 g queso, base seca)			DMS
	días			
	0	20	40	
1) Control	1.386 ^{Aa}	1.338 ^{Aa}	NC	0.103
2) <i>L. fermentum</i>	1.092 ^{Ba}	1.192 ^{Ba}	1.153 ^{Aa}	0.120
3) <i>L. fermentum</i> + <i>Propionibacterium</i>	1.141 ^{Ba}	1.171 ^{BCa}	1.164 ^{Aa}	0.063
4) <i>L. plantarum</i>	1.101 ^{Ba}	1.140 ^{Ba}	1.172 ^{Aa}	0.094
5) <i>L. plantarum</i> + <i>Propionibacterium</i>	1.170 ^{Ba}	1.181 ^{Ba}	1.169 ^{Aa}	0.123
DMS	0.110	0.053	0.119	

NC: No cuantificado. El contenido de fitatos en los quesos de soya se expresa como gramos de fitato por cada 100 g de queso de soya en peso seco. Los resultados se expresan como medias; cada punto de los datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

6.2.4 Contenido de isoflavonas durante la maduración de queso de soya

En el Cuadro 6.10 se presenta el contenido de 6 isoflavonas en los quesos de soya al inicio de la maduración. En los quesos del tratamiento control las isoflavonas más abundantes fueron los β -glucósidos daidzina y genistina con 1.557 y 1.171 $\mu\text{moles/g}$ de queso seco respectivamente, mientras que la concentración de las agliconas daidzeína y genisteína fueron 0.375 y 0.05 $\mu\text{moles/g}$ de queso seco respectivamente. Se ha reportado que las concentraciones de daidzina, genistina, daidzeína y genisteína oscilan en un rango de 2.35-49.7 $\mu\text{moles/g}$, 0.197-18.9 $\mu\text{moles/g}$, 0.25-28.6 $\mu\text{moles/g}$, 0.315-5.1 $\mu\text{moles/g}$ respectivamente, en queso de soya obtenidos por métodos tradicionales (adición de MgCl_2) (Riciputi *et al.*, 2016 y Lee *et al.*, 2018). El amplio

rango de concentraciones reportado podría deberse a las características de la semilla, condiciones de cultivo, factores ambientales en el desarrollo de las semillas, temporada de siembra, así como condiciones de almacenamiento, entre otros (Teekachunhatean *et al.*, 2013) y las tecnologías empleadas en la elaboración de los quesos (Zhang *et al.*, 2012).

Cuadro 6.10 Contenido de isoflavonas en los quesos de soya al inicio de la maduración

Tratamiento	Contenido de isoflavonas ($\mu\text{moles/g}$ de queso seco)					
	β -glucósidos			Agliconas		
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
1	1.557 \pm 0.064 ^a	0.402 \pm 0.017 ^a	1.171 \pm 0.123 ^a	0.375 \pm 0.087 ^b	0.00 \pm 0.00 ^c	0.050 \pm 0.027 ^c
2	0.673 \pm 0.015 ^c	0.282 \pm 0.016 ^b	0.437 \pm 0.051 ^c	1.002 \pm 0.064 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c	0.400 \pm 0.109 ^b
3	0.614 \pm 0.075 ^c	0.309 \pm 0.003 ^b	0.370 \pm 0.017 ^c	1.208 \pm 0.046 ^a	0.028 \pm 0.006 ^a	0.611 \pm 0.033 ^a
4	0.912 \pm 0.016 ^b	0.396 \pm 0.008 ^a	0.882 \pm 0.058 ^b	1.201 \pm 0.155 ^a	0.011 \pm 0.001 ^b	0.468 \pm 0.004 ^{ab}
5	0.843 \pm 0.015 ^b	0.403 \pm 0.020 ^a	0.796 \pm 0.068 ^b	1.202 \pm 0.094 ^a	0.019 \pm 0.005 ^{ab}	0.488 \pm 0.047 ^{ab}
DMS	0.118	0.037	0.186	0.247	0.009	0.146

1: control; 2: *Lactobacillus fermentum*; 3: *L. fermentum* + *P. freudenreichii*; 4: *L. plantarum*; 5: *L. plantarum* + *P. freudenreichii*. El contenido de isoflavonas presentes en el queso de soya se expresa en $\mu\text{m/g}$ (base seca). Los resultados se expresan como medias \pm es el error estándar de las medias; cada punto de los datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

En general, el contenido de isoflavonas β -glucósidos fue menor en los quesos obtenidos mediante fermentación. En los quesos de soya obtenidos mediante fermentación de la leche de soya con *L. fermentum* y *L. plantarum*, la concentración de daidzeína, gliciteína y genisteína fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$), que en los quesos de soya del tratamiento control obtenido por acidificación, con un incremento de alrededor del 220 y 876% de daidzeína y genisteína respectivamente con respecto al tratamiento control, es decir, el queso obtenido por acidificación con ácido láctico. El incremento en la concentración de estas agliconas podría atribuirse a que, durante la fermentación de la leche de soya, *L. plantarum* y *L. fermentum* tienen la capacidad de

producir la enzima β -glucosidasa, la cual realizó la conversión de β -glucósidos en agliconas, logrando un incremento alrededor del 420-490% comparado con la leche de soya sin fermentar (Ver sección 6.1.4). Resultados similares fueron reportados por Riciputi *et al.* (2016), quienes mencionan que el contenido de daidzeína y genisteína incrementa alrededor del 292 y 684% respectivamente; mientras que el contenido de β -glucósidos disminuye en quesos de soya obtenidos mediante fermentación con *L. casei* y *L. acidophilus*, comparado con el queso control.

En la Figura 6.11 se presenta el contenido de β -glucósidos y agliconas durante la maduración. Después de 20 d de maduración, el contenido de isoflavonas agliconas aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) en los quesos obtenidos mediante fermentación con *L. fermentum* y *L. plantarum*, con o sin adición de *Propionibacterium*. Mientras que el contenido de β -glucósidos disminuyó con respecto a las muestras del tiempo 0.

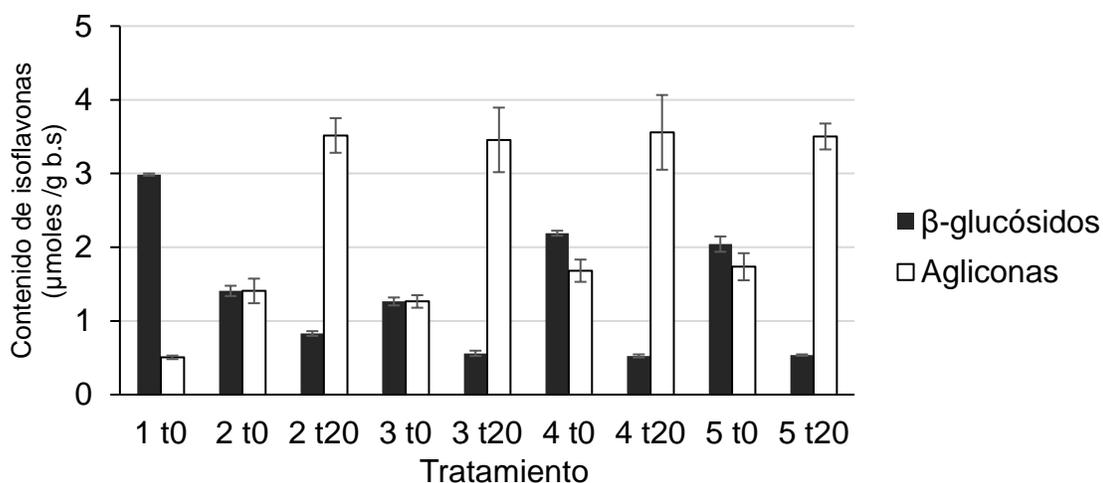


Figura 6.11 Evolución del contenido de β -glucósidos y agliconas durante 20 d de maduración.

1: tratamiento control; 2: *L. fermentum*; 3: *L. fermentum* + *P. freudenreichii*; 4: *L. plantarum*; 5: *L. plantarum* BAL-03-ITTG + *P. freudenreichii*; t0: día 0 de maduración; t20: día 20 de maduración.

La actividad de las enzimas está influenciada por factores como la temperatura, la cual puede afectar la estructura tridimensional específica o la conformación espacial de la proteína, resultando en una disminución de su actividad (Jurado *et al.*, 2004). La mayoría de las β -glucosidasas producidas por BAL tienen una temperatura óptima de

30-40°C (Donkor *et al.*, 2008; Mahajan *et al.*, 2010). Los resultados sugieren que, durante la maduración de los quesos de soya a 15±2°C, las bacterias continúan su metabolismo, aunque muy probablemente disminuido, produciendo la enzima β -glucosidasa, realizando la hidrólisis de β -glucósidos a sus correspondientes agliconas. A nuestro conocimiento, esta es la primera investigación donde se reporta la concentración de isoflavonas durante el proceso de maduración de queso de soya, bajo las condiciones descritas anteriormente.

El contenido de β -glucósidos y agliconas en los quesos de soya después de 20 d de maduración se presenta en el Cuadro 6.11. En los quesos de soya obtenidos mediante fermentación con *L. plantarum*, *L. fermentum* con y sin adición de *P. freudenreichii*, no existió diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en la concentración de daidzeína y genisteína. Por lo que estos resultados indican que la adición de *Propionibacterium* no tuvo efecto en la concentración de las agliconas durante la maduración. Lo anterior sugiere que *Propionibacterium freudenreichii* no tiene la capacidad de producir la enzima β -glucosidasa bajo las condiciones de maduración empleadas. Yuksekdogan *et al.* (2018) realizaron la evaluación de la actividad de la enzima β -glucosidasa de diversas cepas de *Propionibacterium* y *Lactobacillus*, cultivadas en medio MRS. En general, las cepas de *Propionibacterium* tuvieron una actividad enzimática alrededor del 90% menos que las cepas de *Lactobacillus* evaluadas. Sin embargo, se ha reportado que el comportamiento de los microorganismos, así como la producción de las enzimas puede estar influenciado por diversos factores, como el medio de cultivo empleado, pH, concentración de azúcares y temperatura (Jurado *et al.*, 2004), por lo cual sería importante realizar la evaluación de estos factores sobre la producción enzimática de *Propionibacterium* durante la fermentación de leche de soya, para poder evidenciar si estos microorganismos presentan la actividad enzimática β -glucosidasa.

Cuadro 6.11 Concentración de isoflavonas en los quesos de soya después de 20 d de maduración

Tratamiento	Contenido de isoflavonas (μ moles/g de queso seco)					
	β -glucósidos			Agliconas		
	Daidzina	Glicitina	Genistina	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
2	0.132 \pm 0.0 ^a	0.374 \pm 0.020 ^a	0.323 \pm 0.012 ^a	2.233 \pm 0.160 ^a	0.066 \pm 0.002 ^b	1.217 \pm 0.073 ^a
3	0.075 \pm 0.013 ^b	0.247 \pm 0.020 ^c	0.238 \pm 0.002 ^c	2.044 \pm 0.143 ^a	0.096 \pm 0.005 ^a	1.316 \pm 0.290 ^a
4	0.068 \pm 0.003 ^b	0.330 \pm 0.007 ^b	0.126 \pm 0.011 ^b	2.112 \pm 0.168 ^a	0.054 \pm 0.006 ^c	1.393 \pm 0.333 ^a
5	0.075 \pm 0.002 ^b	0.212 \pm 0.002 ^c	0.249 \pm 0.014 ^c	2.116 \pm 0.164 ^a	0.106 \pm 0.004 ^a	1.279 \pm 0.007 ^a
DMS	0.020	0.041	0.030	0.441	0.013	0.622

2: *L. fermentum*; 3: *L. fermentum* + *Propionibacterium*; 4: *L. plantarum*; 5: *L. plantarum* + *Propionibacterium*. El contenido de isoflavonas presentes en el queso de soya se expresa en micro moles/g (base seca). Los resultados se expresan como medias \pm es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

6.2.5 Fenoles totales y actividad antioxidante en queso de soya durante la maduración

En el Cuadro 6.12 se muestra el contenido de fenoles totales durante la maduración de los quesos de soya. En los quesos del tratamiento control, la concentración de fenoles totales fue de 1.929 mg EAG por cada gramo de queso (b.s.) y esta se mantuvo constante durante el almacenamiento. En los quesos obtenidos mediante fermentación, el contenido de fenoles totales fue de 1.8 mg y 1.6 EAG por cada gramo de queso respectivamente, después de 20 d de maduración no existió diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de fenoles totales, con respecto a las muestras del tiempo 0. Sin embargo, después de 40 d de maduración se observó un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en el contenido de fenoles totales en los quesos de soya que fueron adicionados con *Propionibacterium*. A nuestro conocimiento no existen reportes que indiquen la producción o liberación de compuestos fenólicos durante la fermentación de alimentos a base de soya por bacterias propionicas. Sin embargo, se ha reportado que mediante los procesos de fermentación se pueden liberar péptidos bioactivos de las proteínas, causando un incremento el contenido de

fenoles “libres” totales comparado con los alimentos sin fermentar (Fengru *et al.*, 2017; Zhao y Shah, 2014). Durante los procesos de maduración, los microorganismos presentes en los quesos pueden hidrolizar las proteínas presentes en los quesos en péptidos y aminoácidos, por medio de la producción de proteasas y peptidasa (El Soda y Awad, 2011; Engels *et al.*, 2017), con lo cual se puede incrementar el contenido péptidos bioactivos (Engels *et al.*, 2017) y compuestos fenólicos “libres” (Huang *et al.*, 2011).

Diversos autores reportaron que el contenido de fenoles totales en queso de soya oscila en el rango de 0.4 y 1.8 mg EAG/g de queso de soya (Lee *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018).

Cuadro 6.12 Contenido fenoles totales en los quesos de soya durante la maduración

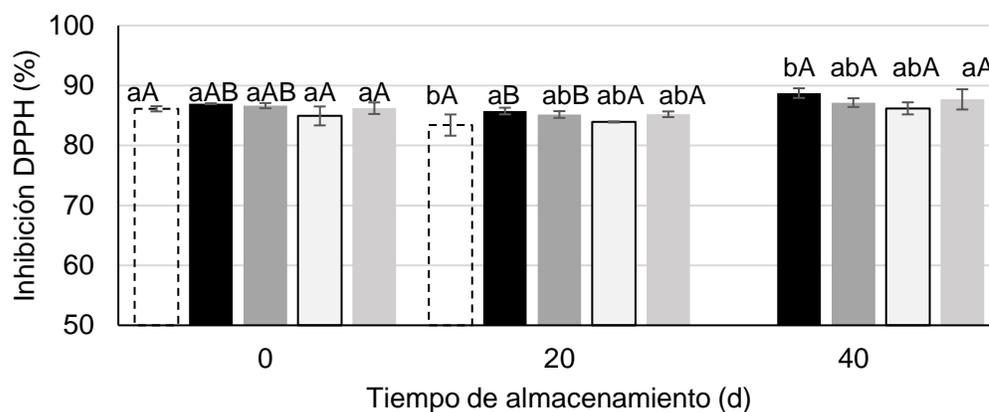
Tratamiento/Días	Contenido fenoles totales (mg EAG/g queso seco)			
	0	20	40	DMS
Control	1.929 ^{aA}	1.843 ^{aA}	ND	0.101
<i>L. fermentum</i>	1.804 ^{bA}	1.756 ^{abA}	1.809 ^{aA}	0.056
<i>L. fermentum</i> + <i>Propionibacterium</i>	1.822 ^{bAB}	1.777 ^{aB}	1.850 ^{aA}	0.053
<i>L. plantarum</i>	1.658 ^{cA}	1.673 ^{bcA}	1.734 ^{bA}	0.134
<i>L. plantarum</i> + <i>Propionibacterium</i>	1.664 ^{cB}	1.636 ^{cB}	1.756 ^{bA}	0.054
DMS	0.0376	0.096	0.0429	

El contenido de fenoles totales presente en el queso de soya se expresa en miligramos de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de queso de soya en base seca. Los resultados se expresan como medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

En la Figura 6.12 se presentan los resultados de la actividad antioxidante durante la maduración de los quesos de soya. En las muestras del tiempo cero, la actividad antioxidante osciló en el rango de 85-86% (expresado como porcentaje de inhibición

del radical DPPH). Estos valores son similares a los reportados por Lee *et al.* (2018), quienes mostraron que en queso de soya el porcentaje de inhibición del radical DPPH osciló en un rango del 38 al 85%. En nuestro caso, el contenido de fenoles fue mayor en los quesos control que en los quesos obtenidos por fermentación, sin embargo, no existió diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en la actividad antioxidante. Esto podría deberse al aumento de agliconas durante la fermentación como se vio anteriormente. Sin embargo, no existió diferencia estadística significativa en la actividad antioxidante entre los quesos obtenidos por los diferentes tratamientos. Por otra parte, no existió diferencia estadística significativa en la actividad antioxidante en las muestras de queso de soya del tiempo cero y las muestras después de 40 d de maduración,

Figura 6.12 Actividad antioxidante durante la maduración del queso de soya.



Queso de soya control (□), queso de leche soya fermentada con *L. fermentum* (■), queso de leche de soya fermentada *L. fermentum* y adicionado con *Propionibacterium* (■), queso de leche soya fermentada con *L. plantarum* (□) y queso de leche de soya fermentada *L. plantarum* y adicionado con *Propionibacterium* (■). Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos en el mismo tiempo de maduración, letras mayúsculas indican diferencia estadística significativa entre el mismo tratamiento en diferentes tiempos de maduración.

Zhao y Shah (2014) reportaron que aunque las isoflavonas constituyen más de la mitad de los compuestos fenólicos en la soya, no son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante en la soya. Para que un compuesto presente una capacidad antioxidante óptima, el compuesto debe presentar una estructura que facilite la

donación de átomos hidrógeno a los radicales, factores como la posición del grupo donante de hidrógeno y el efecto estérico de los sustituyentes en la estructura determinan la actividad antioxidante. Lee *et al.* (2005) reportaron que los β -glucósidos (genistina, daidzeína y glicetina) poseen actividades antioxidantes similares a sus correspondientes agliconas y en general todas las isoflavonas de soya evaluadas fueron menos efectivas para eliminar los radicales libre DPPH que el control positivo (tocoferol), una concentración de 12 μ M de genistina, daidzina, genisteína o daidzeína presentó una actividad antioxidante del 20%, mientras que el tocoferol a la misma concentración presentó una actividad del 60 %.

6.2.6 Evolución de compuestos volátiles en queso de soya durante la maduración

El análisis de compuestos volátiles en el queso de soya recién elaborado permitió la identificación de 26 moléculas en las que se encuentran 15 aldehídos, 2 ácidos, 4 cetonas, 2 furanos y 2 alcoholes. Perfiles similares de compuestos volátiles han sido descritos por diversos autores. Serrazanetti *et al.* (2013) reportaron la presencia de 50 compuestos diferentes en queso de soya obtenido mediante fermentación con *L. acidophilus* y *L. casei*, mientras que Lee *et al.* (2018) reportaron entre 35 y 42 compuestos diferentes en quesos de soya comercial. Por lo que la diferencia entre los compuestos volátiles encontrados podría deberse a las características de la semilla (edad, condiciones de almacenamiento, condiciones de cultivo, etc.) y el método empleado para la elaboración de los quesos de soya. Los aldehídos fueron la clase más abundante de compuestos volátiles durante la maduración, tanto en el queso control y los quesos obtenidos mediante fermentación. Estos aldehídos pueden ser producto de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la soya (Figura 6.13), como lo mencionaron Serrazanetti *et al.* (2014).

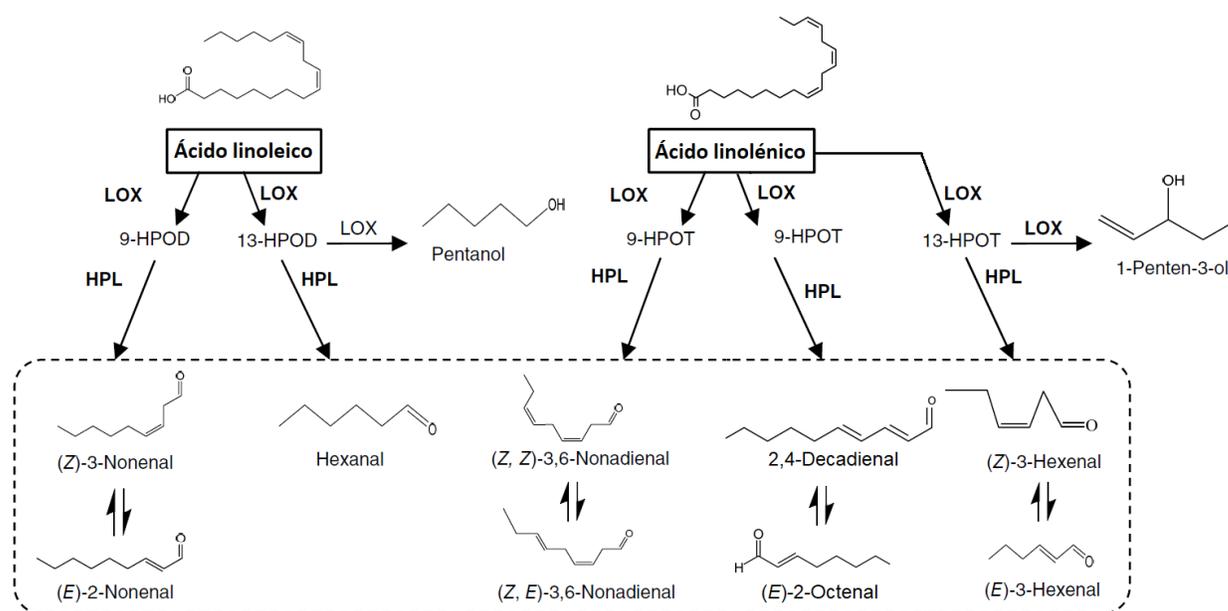


Figura 6.13 Reacciones enzimáticas que conducen a la formación de aldehídos en soya. LOX: lipoxigenasa; HPL: hidropéroxido liasa; HPOD: ácido hidroperoxi octadecadienoico; HPOT: ácido hidroperoxi octadecatrienoico (Adaptado de Vong y Liu, 2016).

En el Cuadro 6.13 se presentan los compuestos volátiles detectados en los quesos obtenidos por los diferentes tratamientos al inicio de la maduración. El queso de soya obtenido mediante acidificación con ácido láctico, se caracterizó por tener mayor contenido de aldehídos comparado con los quesos de soya obtenidos mediante fermentación, además, no se detectó la presencia de alcoholes.

Las muestras de queso obtenido por fermentación de leche de soya con *L. fermentum* y *L. plantarum*, mostraron una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de hexanal, nonanal, 2-pentenal, 2-hexenal, 2,4 nonadienal y decanal con respecto al queso control (Cuadro 6.13). Estos aldehídos son considerados marcadores químicos cuya presencia indica la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Serrazanetti *et al.*, 2013). Estos aldehídos se han reportado como compuestos que proporcionan características organolépticas diversas. El hexanal es uno de los principales compuestos volátiles del queso de soya y es responsable de impartir el sabor a hierba verde (nota indeseable) en los productos a base de soya (Lee *et al.*, 2014). En las muestras de queso elaborados con leche de soya fermentada, el contenido de hexanal

disminuyó alrededor del 83-92% comparado con el queso control. Es decir, fermentar la leche de soya con *L. fermentum* o *L. plantarum*, disminuye el contenido de hexanal. Lo anterior sugiere que el sabor del queso se mejorará al eliminar uno de los compuestos que imparte un sabor desagradable.

En todos los tratamientos se detectó la presencia de benzaldehído y 2,4-decadienal, los cuales se encuentran relacionados con olores favorables como cereza o almendra y papa frita, respectivamente (Smit *et al.*, 2005). Al inicio de la maduración estos compuestos se encontraban en mayor concentración en los quesos obtenidos mediante fermentación. El 2-pentil furano se encontraba en menor concentración en los quesos obtenidos por fermentación con *L. plantarum*, este compuesto ha sido reportado por tener un aroma a hierba o frijoles verdes. Los furanos son producto de la reacción de Maillard (Lee *et al.*, 2014). Así mismo, se identificaron cuatro cetonas: 2-heptanona (olor afrutado, canela), 3-octen-2-ona, 2,3-octanediona y 3,5-octadien-2-ona.

En los quesos elaborados mediante fermentación se observó la presencia de 1-hexanol, el cual no fue detectado en los quesos del tratamiento control (Cuadro 6.13). Se ha reportado que las BAL pueden reducir la concentración de aldehídos como hexanal, mediante la producción de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual puede realizar la conversión de aldehídos a sus correspondientes alcoholes (Gänzle *et al.*, 2007; Vong y Liu, 2018). Lo anterior podría explicar la disminución de aldehídos y la producción de alcoholes en los quesos obtenidos mediante fermentación. La enzima alcohol-deshidrogenasa puede transformar el hexanal a 1-hexanol. La alcohol-deshidrogenasa lleva a cabo la interconversión entre aldehídos y alcoholes con la oxidación de NADH a NAD⁺ (Gänzle *et al.*, 2007). El mecanismo catalítico involucra a los aminoácidos Ser, Tyr y Lys. Entre estos residuos, la cadena lateral de tirosina transfiere un protón al oxígeno del grupo carbonilo del sustrato, mientras que una treonina se encuentra unida al cofactor NADPH, el cual se oxida y se transfiere el hidruro al carbocatión formando el alcohol (Kavanagh *et al.*, 2008).

Cuadro 6.13 Compuestos volátiles en los quesos obtenidos por los diferentes tratamientos al inicio del almacenamiento

Compuesto	Contenido (mg/kg queso)					DMS
	Control	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	
Aldehídos						
Pentanal	0.324 ^a	ND	ND	0.254 ^a	0.289 ^a	0.179
2-pentenal	1.190 ^a	0.272 ^c	ND	0.544 ^b	ND	0.233
Hexanal	11.957 ^a	0.907 ^c	1.034 ^c	1.995 ^b	1.971 ^b	0.425
(E)-2-hexanal	0.414	ND	ND	ND	ND	
2-heptenal	1.150 ^c	1.152 ^c	1.522 ^b	2.424 ^a	2.507 ^a	0.305
Octanal	0.526 ^a	ND	ND	0.170 ^b	0.137 ^b	0.193
(E)-2-octenal	1.399 ^a	1.377 ^b	1.548 ^b	2.113 ^a	2.255 ^a	0.514
Nonanal	1.957 ^a	ND	ND	0.373 ^b	ND	0.630
2,4-heptadienal	ND	ND	ND	1.053 ^a	0.981 ^a	0.278
Benzaldehído	1.187 ^b	1.492 ^a	1.609 ^a	1.042 ^b	1.210 ^b	0.241
2-nonenal	0.592 ^{ab}	0.272 ^c	0.365 ^{bc}	0.451 ^{abc}	0.611 ^a	0.229
2,4-decadienal	5.750 ^b	5.169 ^b	6.411 ^b	8.940 ^a	9.009 ^a	1.719
2,4-nonadienal	0.307 ^{ab}	0.193 ^b	0.370 ^{ab}	0.427 ^a	0.419 ^a	0.202
Decanal	0.514	ND	ND	ND	ND	
2-decenal	0.252 ^a	0.295 ^a	0.355 ^a	0.373 ^a	0.299 ^a	0.223
Alcoholes						
1-hexanol	ND	6.538 ^{bc}	6.053 ^c	7.045 ^{ab}	7.494 ^a	0.854
1,6-octadien-3-ol	ND	0.534 ^c	0.662 ^{bc}	0.938 ^a	0.796 ^{ab}	0.204
Cetonas						
2-heptanona	0.749 ^b	0.829 ^{ab}	0.794 ^b	0.747 ^b	0.899 ^a	0.084
3-octen-2-ona	0.255 ^b	ND	0.365 ^a	0.402 ^a	0.260 ^b	0.085
2-3-octanediona	0.268 ^{ab}	0.219 ^b	0.170 ^b	0.364 ^a	0.359 ^a	0.106
3-5-octadien-2-ona	0.903 ^b	0.820 ^b	1.021 ^a	1.291 ^a	1.287 ^a	0.198
Furanos						
2-pentil-furano	10.536 ^b	6.407 ^c	7.081 ^b	11.860 ^a	10.877 ^{ab}	1.260
2,3-dihidrofurano	0.257	ND	ND	ND	ND	
Ácidos						
Ácido hexanoico	0.470 ^b	1.361 ^a	1.214 ^a	0.798 ^b	0.759 ^b	0.354
Ácido heptanoico	ND	0.632 ^a	0.167 ^a	ND	ND	0.924
Otros						
Limoneno	0.643 ^{ab}	0.631 ^{ab}	0.521 ^b	0.859 ^a	0.836 ^a	0.247

ND: No detectado. El contenido de aldehídos en los quesos de soya se expresa mg/kg de queso de soya. Los resultados se expresan como medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

Algunos metabolitos como ácido heptanoico y ácido hexanoico estuvieron presentes en mayor concentración en los quesos obtenidos mediante fermentación (Cuadro 6.13). Éstos ácidos son derivados de la oxidación de hexanal. Se ha reportado que estos ácidos grasos de cadena media son agentes antimicrobianos que pueden contribuir a mejorar la vida de anaquel en los quesos de soya (Ryan *et al.*, 2011; Serrazanetti *et al.*, 2013).

En la Figura 6.14 se resume la evolución de aldehídos, alcoholes y ácidos durante la maduración (0, 20 y 40 d) en los diferentes tratamientos. Cabe destacar que no se presentan los resultados del tiempo 40 del tratamiento control, ya que el análisis microbiológico mostró una cuenta microbiana en agar papa dextrosa superior a 500 UFC/g de queso, por lo cual de acuerdo la NOM-121, estos quesos ya no son aptos para su consumo. Las muestras del tratamiento control se caracterizaron por tener mayor contenido de aldehídos. En los quesos obtenidos mediante fermentación, durante el proceso de maduración independientemente de la cepa empleada, el contenido de aldehídos disminuyó dando lugar probablemente a la formación de alcoholes y ácidos. No obstante, la producción de ácidos fue mayor en los quesos adicionados con el cultivo de *Propionibacterium freudenreichii*.

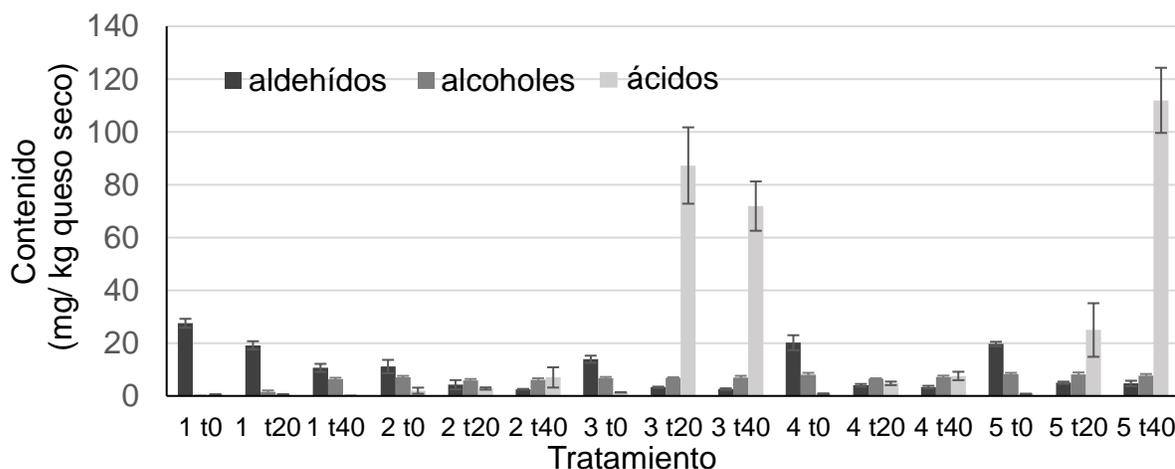


Figura 6.14 Evolución de aldehídos, alcoholes y ácidos durante la maduración.

1: tratamiento control; 2: *L. fermentum* BAL-21-ITTG; 3: *L. fermentum* BAL-21-ITTG + *P. freudenreichii*; 4: *L. plantarum* BAL-03-ITTG; 5: *L. plantarum* BAL-03-ITTG + *P. freudenreichii*; t0: tiempo 0; t20: tiempo 20; t40: tiempo 40. Los resultados se expresan como medias \pm es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente.

El ácido hexanoico se ha reportado en diversos tipos de queso como Cheddar, Camembert, Gruyere y queso azul, dicho compuesto está relacionado con características organolépticas positivas (olor a queso, cabra) (Frank *et al.*, 2004). *Propionibacterium* es un microorganismo que se emplea ampliamente como cultivo secundario en la elaboración de queso Emmenthal, debido a la capacidad de estos microorganismos de producir diversos metabolitos como vitaminas del grupo B y compuestos que mejoran el sabor y aroma de los quesos, además de ser microorganismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros) que son utilizados como probióticos. Se ha demostrado que el uso de *Propionibacterium* en combinación con BAL puede aumentar la velocidad de los procesos de fermentación y protege a los productos finales contra contaminación microbiana (Piwowarek *et al.*, 2018). Sin embargo, durante el proceso de maduración del queso de soya se evidenció que la presencia de *Propionibacterium* no mejora el crecimiento de las BAL, por lo cual, los resultados indican que este microorganismo podría estar sintetizando la enzima aldehído deshidrogenasa, realizando la conversión de aldehídos en sus correspondientes alcoholes (ácido hexanoico y ácido 3-hexenoico).

La concentración de aldehídos principalmente hexanal continuó disminuyendo conforme avanzaba el tiempo de maduración de los quesos de soya (Figura 6.14), hasta tener una concentración final alrededor de 0.5 ppm. Dicha concentración es menor a lo reportado por otros autores como Serrazanetti *et al.* (2013) quienes evaluaron las características sensoriales del queso de soya sin fermentar y del queso de soya obtenido por fermentación de leche de soya con *Lactobacillus casei* (LbCD2) y *Lactobacillus acidophilus* (LA1), cuando la leche de soya se fermentó con las BAL, el contenido de hexanal disminuyó a niveles menores de 15 ppm. El menor contenido de hexanal en los quesos de soya madurado es importante ya que el sabor de los productos a base de soya es uno de los principales obstáculos que limita la aceptación de estos alimentos, al disminuir el contenido de hexanal podría eliminarse o reducir el sabor a hierba verde de los quesos de soya, lo cual podría tener un efecto positivo en el nivel de aceptación de los quesos de soya.

Después de 40 d de maduración el contenido de hexanal (Figura 6.15) continuó disminuyendo en las muestras de queso de soya obtenidas mediante fermentación (0.499-0.646 ppm), mientras que se observó el incremento de ácido hexanoico (Figura 6.16).

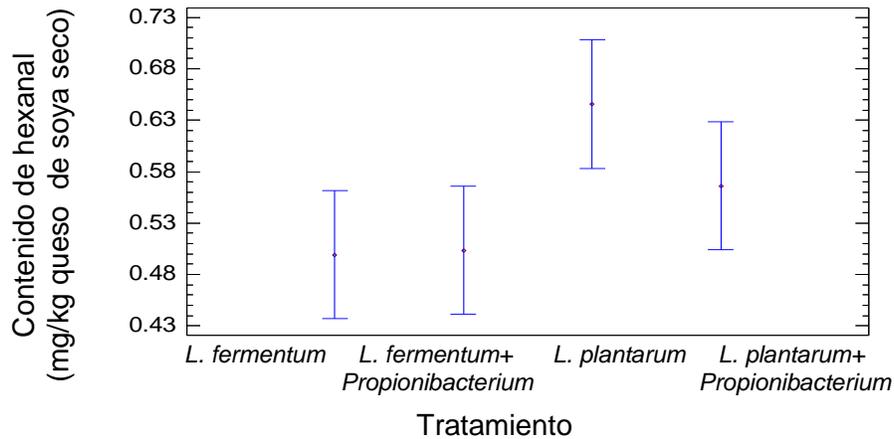


Figura 6.15 Contenido de hexanal en los quesos de soya después de 40 d de maduración.

El ácido hexanoico es reconocido por ser un agente antimicrobiano y que puede contribuir a mejorar la vida de anaquel de los alimentos (Ryan *et al.*, 2011). Lo que sugiere que este compuesto pudo contribuir a que después de 40 d de maduración los quesos no presentaran contaminación microbiana, caso contrario a las muestras control en donde se detectó la presencia de contaminantes.

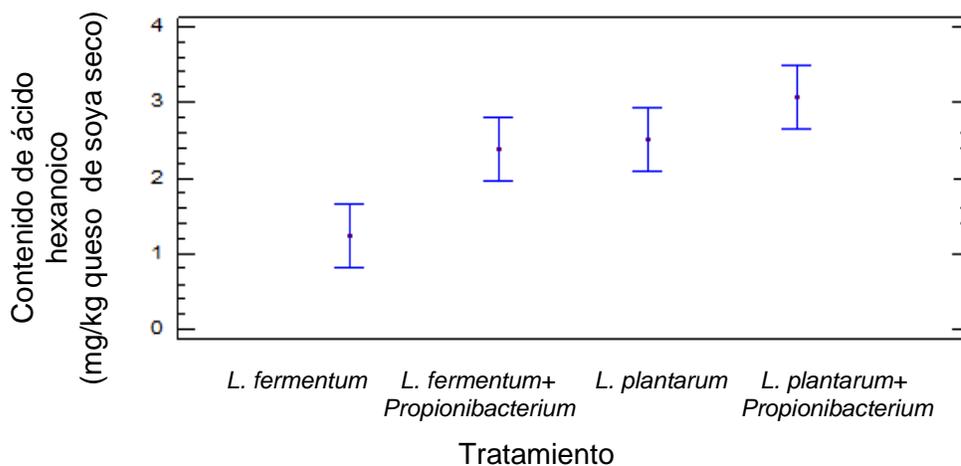


Figura 6.16 Contenido de ácido hexanoico en los quesos de soya después de 40 d de maduración.

Vong y Lui (2018) reportaron que los aldehídos como el hexanal pueden ser convertidos a sus correspondientes ácidos por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa. Se ha reportado que este ácido tiene un olor similar a queso (picante, agrio, sudor, grasa) (Lee *et al.*, 2014).

En la Figura 6.17 se presenta el contenido de ácido 3-hexenoico en las muestras de queso de soya obtenidas mediante fermentación. La presencia de ácido 3-hexenoico en los queso de soya obtenidos mediante fermentación es importante, ya que se ha reportado que este compuesto está relacionado con olores a ácido, afrutado, miel, lo cual podría tener un efecto en las características sensoriales de los quesos. La producción de ácido 3-hexenoico en quesos de leche de cabra, después de 60 d de maduración fue reportado por Delgado *et al.* (2011).

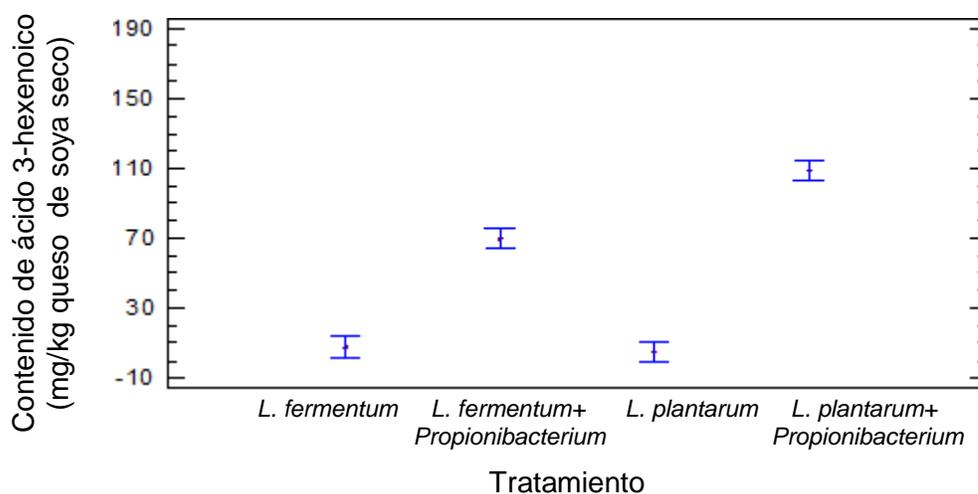


Figura 6.17 Contenido de ácido 3-hexenoico en los quesos de soya después de 40 d de maduración.

El ácido 3-hexenoico se puede formar a partir de la oxidación de ácido linolénico al aldehído 3-hexenal y posteriormente, por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa, llevar a cabo la formación del ácido 3-hexanoico (Figura 6.18).

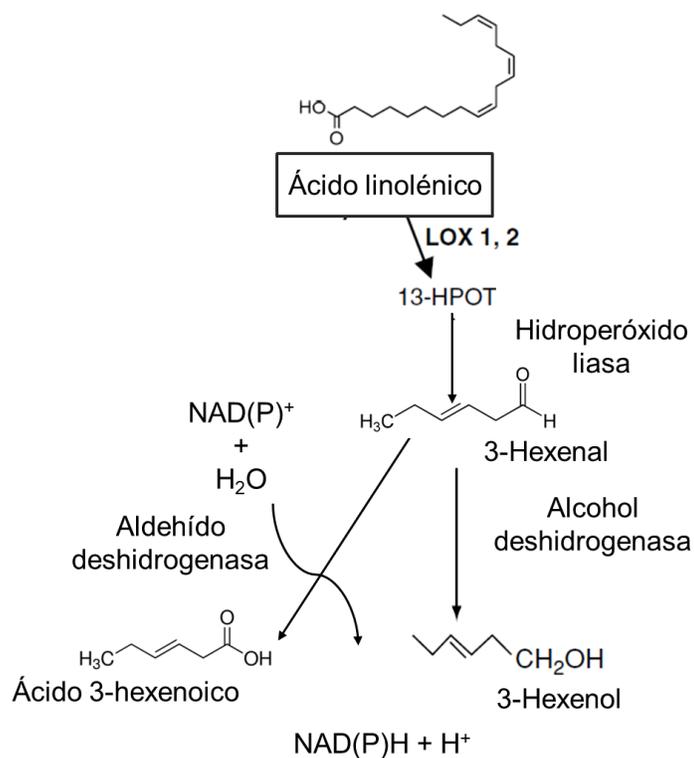


Figura 6.18 Reacciones enzimáticas que conducen a la formación de ácido 3-hexenoico. Adaptado de Vong y Liu (2016).

Se puede observar una mayor producción de ácido 3-hexanoico en los quesos de soya que fueron adicionados con *Propionibacterium freudenreichii*. A nuestro conocimiento no existen reportes que evidencien la producción de este ácido por medio de bacterias propionicas. Los resultados del presente trabajo indican que *Propionibacterium freudenreichii* podría estar sintetizando la enzima aldehído deshidrogenasa, realizando la conversión de ácido linolénico a ácido 3-hexenoico, ya que los resultados indicaron que la presencia de *Propionibacterium* no mejora el crecimiento de las BAL. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones donde se evalué el efecto individual de *Propionibacterium* durante la maduración de queso de soya y la actividad metabólica de estos microorganismos. Lo anterior con la finalidad de evidenciar si *Propionibacterium* tiene la capacidad de producir las enzimas implicadas en la formación de estos compuestos volátiles y/o se trata de un efecto sinérgico (BAL y bacterias propiónicas).

6.2.7 Evaluación sensorial

Los resultados de la aceptación sensorial de los quesos de soya madurados (40 días) y de los quesos del tratamiento control se muestran en el Cuadro 6.14. En general todas las muestras tenían un valor promedio entre 6 y 7, lo cual, de acuerdo a la escala hedónica la aceptación de las muestras estuvo en un rango de: me gusta ligeramente y me gusta moderadamente. Los resultados del ANOVA indicaron que no existió diferencia estadística entre los tratamientos para todos los atributos evaluados en el análisis sensorial (apariciencia, color, aroma, textura, sabor y aceptación global).

Cuadro 6.14 Análisis sensorial del queso de soya

Tratamiento/ Atributo	Apariencia	Color	Aroma	Textura	Sabor	Aceptación global
Control	7.235 ^a	7.176 ^a	6.941 ^a	7.294 ^a	6.471 ^a	6.765 ^a
<i>L. fermentum</i>	7.118 ^a	7.412 ^a	7.118 ^a	7.353 ^a	7.176 ^a	7.235 ^a
<i>L. fermentum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	7.412 ^a	7.294 ^a	7.118 ^a	7.471 ^a	7.589 ^a	7.706 ^a
<i>L. plantarum</i>	7.294 ^a	7.412 ^a	6.765 ^a	7.412 ^a	7.118 ^a	7.236 ^a
<i>L. plantarum</i> + <i>P. freudenreichii</i>	7.823 ^a	7.942 ^a	7.059 ^a	7.882 ^a	7.588 ^a	7.706 ^a
DMS	0.938	0.833	1.143	0.951	1.149	1.00

NC: no cuantificado. El contenido de ácido láctico presente en el queso de soya se expresa en miligramos por gramo de queso (base seca). Los resultados se expresan como medias; cada punto de datos es el promedio de dos replicas medidas de manera independiente. Las medias en la misma columna seguidas por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS. Las medias en la misma fila seguidas por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) de acuerdo a la prueba DMS.

Serrazanetti *et al.* (2013) reportaron que los quesos de soya obtenidos mediante la fermentación de la leche de soya con *L. casei* y *L. acidophilus*, tuvieron una mayor aceptación (me gusta mucho) comparado con los quesos de soya del tratamiento control (me disgusta moderadamente). Sin embargo, en dicho estudio se realizó únicamente el análisis sensorial únicamente con 10 voluntarios pertenecientes a una universidad de Ciencias de los Alimentos y empleados de una empresa productora de

tofu, por lo cual es probable que los jueces estuvieran familiarizados con los sabores y características de los quesos de soya. Por otra parte, los resultados de la evaluación sensorial podrían atribuirse en parte al umbral sensorial del hexanal, es decir, la concentración mínima que debe estar presente para dar lugar a la aparición de una sensación (sabor a hierba verde). La concentración de hexanal en las muestras obtenidas mediante fermentación (0.5 ppm) fue mayor al valor reportado para el umbral sensorial del hexanal. Mizutani y Hashimoto (2014), reportaron el valor del umbral sensorial del hexanal en leche de soya es de 0.0045 ppm. Además, la presencia de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido hexanoico y ácido 3-hexenoico) también pudo tener un efecto en las características sensoriales de los quesos de soya. Otra posible causa es por lo reportado por Pedero y Pangborn (1989) quienes mencionaron que una de las desventajas en el uso de la escala hedónica para evaluar preferencias es el uso confuso de la escala y la intensidad del atributo a evaluar, además no proporciona información sobre la naturaleza de la diferencia detectada entre las muestras y por lo tanto, no puede servir de ayuda para identificar la causa de una mayor o menor aceptación en el alimento evaluado.

Sin embargo, las muestras del tratamiento control presentaron una menor aceptación en sabor y aceptación global (6.471 y 6.765 respectivamente) comparado con las muestras obtenidas mediante fermentación. El aumento en el nivel de aceptación en los quesos de soya obtenidos mediante fermentación con *L. fermentum* y *L. plantarum* podría estar relacionado con el menor contenido de aldehídos principalmente hexanal, el cual se ha reportado que ocasiona características sensoriales poco atractivas (sabor a hierba verde). La mayor aceptación en el sabor de las muestras obtenidas mediante fermentación podría atribuirse también a la presencia de ácido hexanoico y ácido 3-hexenoico (sabor a queso de cabra, producto lácteo). Las muestras que fueron adicionadas con el cultivo de *P. freudenreichii* fueron las que presentaron mayor aceptación en sabor y aceptación global, lo cual podría estar relacionado con el contenido de ácidos orgánicos, ya que en estas muestras se detectó el mayor contenido de ácido hexanoico y ácido 3-hexenoico.

7. CONCLUSIONES

La fermentación de leche de soya con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG redujo el contenido de factores antinutricionales e incrementó la formación de compuestos bioactivos, en comparación de la leche de soya sin fermentar.

El queso de soya elaborado mediante la fermentación de leche de soya con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG y *Propionibacterium freudenreichii* como co-cultivo, es un medio propicio para el mantenimiento de estos microorganismos benéficos y tiene mayor concentración de compuestos bioactivos, lo que sugiere que podría ser un alimento funcional.

La maduración de queso de soya con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG y *Propionibacterium freudenreichii* puede utilizarse como una estrategia para aumentar la vida de anaquel, mejorar el perfil de compuestos volátiles y el nivel de aceptación de los quesos de soya.

8. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

Caracterizar el crecimiento y la actividad metabólica de *P. freudenreichii* durante la fermentación de la leche de soya, con la finalidad de tener una mejor comprensión de la cinética de crecimiento y las características metabólicas de *P. freudenreichii*.

Cuantificar el contenido de glucosa, sacarosa, galactosa, rafinosa y estaquiosa durante la fermentación de la leche de soya y durante la maduración del queso de soya para una mejor comprensión del crecimiento microbiano.

Evaluar el efecto individual de la adición de *P. freudenreichii* en las características del queso de soya, para tener un mayor conocimiento de la actividad metabólica de *P. freudenreichii* y su contribución en el desarrollo de las características sensoriales del queso de soya.

Evaluar el efecto de las condiciones de maduración (temperatura, tiempo y humedad) sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del queso de soya, para evidenciar si existen otros factores del proceso que puedan influir en las propiedades fisicoquímicas de los quesos de soya.

Cuantificar los ácidos grasos de cadena corta y larga presentes en los quesos de soya, con la finalidad de tener una mayor comprensión de la actividad metabólica de los microorganismos y la formación de los compuestos volátiles durante el proceso de maduración.

Realizar la evaluación sensorial de los quesos de soya con un panel de jueces semi-entrenados y entrenados, con la finalidad de determinar el perfil sensorial de las muestras.

9. BIBLIOGRAFÍA

Adeyemo SM y Onilude AA. 2013. Enzymatic reduction of anti-nutritional factors in fermenting soybeans by *Lactobacillus plantarum* isolates from fermenting cereals. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 84-90.

Adepehin JO. 2018. Safety assessment and microbiological quality of homemade soy-cheese in Nigeria. *Journal of Food Safety*, 38, 1-9.

Ahmadi N, Khosravi-Darani K, Zarean-Shahraki S, Mortazavian M y Mashayekh SM. 2015. Fed-batch fermentation for propionic, acetic and lactic acid production. *Oriental Journal of Chemistry*, 8(2), 581-590.

Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ y Decker EA. 2009. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57, 2969-2976.

Alcántara-Hernández RJ, Rodríguez-Álvarez JA, Valenzuela-Encinas C, Gutiérrez-Miceli FA, Castanón-González H, Marsch R, Ayora-Talavera T y Dendooven L. 2010. The bacterial community in 'taberna' a traditional beverage of Southern Mexico. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 558-563.

Alegría-Mundo H. 2012. Evaluación de la dinámica poblacional de levaduras, bacteria ácido lácticas y ácido acéticas durante la fermentación de la taberna. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Al-Wahsh A, Horner HT, Palmer RG, Reddy MB y Massey LK. 2005. Oxalate and phytate of soy foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 5670-5674.

An J, Tzagarakis-Foster J, Scharschmidt TC, Lomri N y Leitman DC. 2001. Estrogen receptor β -selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (21), 17808-17814.

Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Iburguren C y Apella MC. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*, 166, 1-13.

Ayeni FA, Sánchez B, Adeniyi BA, de Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A y Ruas-Madiedo P. 2011. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 97-104.

Badieya S, Bevan DR y Zhang C. 2012. Probing the active site chemistry of β -glucosidases along the hydrolysis reaction pathway. *Biochemistry*, 51, 8907-8918.

Baú TR, Garcia S e Ida EI. 2015. Changes in soymilk during fermentation with kéfir culture: oligosaccharides hydrolysis and isoflavone aglycone production. *International Journal of Food Science Nutrition*, 66 (8), 845-850.

Bedani E, Rossi EA y Saad SMI. 2013. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 34, 382-389.

Belleville J. 2002. Hypocholesterolemic effect of soy protein. *Nutrition*, 18, 684-686.

Cao FH, Li XJ, Luo SZ, Mu DD, Zhong XY, Jiang ST, Zheng Z y Zhao YY. 2017. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 58-65.

Cavin JF, Barthelmebs L y Divies C. 1997. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1939-1944.

Champagne CP y Gardner NJ. 2008. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539-543.

Chen CC, Cheng KJ, Ko TP y Guo RT. 2015. Current progresses in phytase research: Three-dimensional structure and protein engineering. *ChemBioEng Reviews*, 2(2), 76-86.

Chen KI, Erh MH, Su NW, Liu WH y Chou CC. 2012. Soy foods and soy beans products: from traditional use to modern applications. *Applied microbiology and Biotechnology*, 96, 9-22.

Chien HL, Huang HY y Chou CC. 2006. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23, 772-778.

Chiou YS, Wu JC, Huang Q, Shahidi F, Wang YJ, Ho CT y Pan MH. 2014. Metabolic and colonic microbiota transformation may enhance the bioactivities of dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 7, 3-25.

Coscueta ER, Pintado ME, Picó GA, Knobel G, Boschetti CE, Malpiedi LP y Nerli BB. 2016. Continuous method to determine the trypsin inhibitor activity in soybean flour. *Food Chemistry*, 214, 156-161.

Delgado FJ, González-Crespo J, Cava R y Ramírez R. 2011. Formation of the aroma a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 129, 1156-1163.

Day L. 2013. Proteins from land plants-Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25-42.

Donkor ON y Shah NP. 2008. Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Journal of Food Science*, 73, M15-M20.

Dragičević VD, Perić VA, Srebrić MB, Silić SM y Mladenović DSD. 2010. Some nutritional and anti-nutritional factor of ZP soya bean varieties. *Journal of Agricultural Sciences*, 55(2), 141-146.

Dusterhoft EM, Engels W y Huppertz T. 2017. Cheese ripening: Technological aspects. *Reference Module in Food Science*, 1-4.

Egli I, Davidsson L, Zeder C, Walczyk T y Hurrell R. 2004. Dephytinization of a complementary food based on wheat and soy increases zinc, but not copper, apparent absorption in adults. *The Journal of Nutrition*, 134, 1077-1080.

El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfax I, El Mecherfi KE, Bazukyan I, Choiset Y, Rabesona H, Sitohy M, Popov YG, Kuliev AA, Mozzi F, Chobert JM y Haertlé T. 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 509-516.

El Soda M y Awad S. 2011. Accelerated cheese ripening. En: Fuquay J.W., Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds): *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Vol. 1. London, Elsevier Academic Press. 795-798.

Enciso-Sáenz S, Borrás-Enriquez AJ, Ventura-Canseco LMC, Gutiérrez-Miceli F, Dendooven L, Grajales-Lagunes A, Ruiz-Cabrera MA, Ruíz-Valdiviezo V y Abud Archila M. 2018. Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) essential oil encapsulation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(2), 407-420.

Engels W, Dusterhoft EM y Huppertz T. 2017. Starter cultures for cheese manufacture. *Reference Module in Food Science*, 1-4.

Engels WJM y Wouters JA. 2013. New developments for selection of starters for flavour formation in cheese. In: Randazzo, C.L., Caggia, C., Neviani, E. (Eds.), *Cheese Ripening: Quality, Safety and Health Aspects*. Nova, NY, 97-114.

Egounlety M y Aworh OC. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and

groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*, 56 (2), 249-254.

FAO/OMS. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Canada.

Fei Y, Liu L, Liu D, Chen L, Tan B, Fu L, Li L. 2017. Investigación on the safety of *Lactobacillus amylolyticus* L6 and its fermentation properties of tofu whey. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 314-322.

Feng Y, Chen Z, Liu N, Zhao H, Cui Z y Zhao M. 2014. Changes in fatty acid composition and lipid profile during *koji* fermentation and their relationships with soy sauce flavour. *Food Chemistry*, 158, 438-444.

Fischer MM, Egli IM, Aeberli I, Hurrell RF y Meile L. 2014. Phytic acid degrading lactic acid bacteria in tef-injera fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 54-60.

Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S y Gil A. 2013. Source, isolation, characterisation and evaluation. *British Journal of Nutrition*, 109, S35-S50.

Food Processing. 2009. Modest growth for global probiotic market, 2009. Available from: <http://www.foodprocessing.com/articles/2008/383.html>. Acceso Noviembre, 2018.

Frank DC, Owen CM y Patterson J. 2004. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, 37, 139-154.

Friedman M y Brandon DL. 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1069-1086.

Frölich W y Asp NG. 1985. Minerals and phytate in the analysis of dietary fiber on cereals. III, *Cereal Chemistry*, 62(4), 238-42.

Frühbeck G, Alonso R, Marzo F y Santidrian S. 1995. A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate in foodstuffs. *Analytical Biochemistry*, 225(2), 206–212.

Gänzle MG, Vermeulen N y Vogel RF. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, 24, 128-138.

Gao YL, Wang CS, Zhu QH y Qian GY. 2013. Optimization of solid-state fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for trypsin Inhibitor degradation in soybean meal. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5), 869-76.

García-Mantrana I, Monedero V y Haros M. 2015. Reduction of phytate in soy drink by fermentation with *Lactobacillus casei* expressing phytases from bifidobacteria. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 269-274.

Gemedede HF y Ratta N. 2014. Antinutritional factors in plants foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(4), 284-289.

Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, Danguleva A, Ivanova G, Karapetkov N, Rumyan N y Karaivanova E. 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as started and probiotic cultures. *Food Biotechnology*, 29 (1), 84-91.

Gibson RS, Bailey KB, Gibbs M y Ferguson EL. 2010. A review of phytate, iron, zinc, and calcium concentrations in plant-based complementary foods used in low-income countries and implications for bioavailability. *Food and Nutrition Bulletin*, 31(2), S134-S146.

González-Escobar JL. 2013. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Granato D, Branco GF, Nazzarro F, Cruz AG y Faria JA. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food-development: trends, concepts and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292-302.

Graef G, La Vallee BJ, Tenopir P, Tat M, Schweiger B, Kinney AJ, Van Gerpen JH y Clemente TE. 2009. A high-oleic-acid and low-palmitic-acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. *Plant Biotechnology Journal*, 7, 411-421.

Grechkin A. 2002. Hydroperoxide lyasa and divinyl ether synthase. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68, 457-470.

Greiner R y Konietzny U. 2006. Phytases for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 125-140.

Gupta V y Gard R. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3), 202-209

Hati S, Vij S, Mandal S, Malik RK, Kumari V y Khetra Y. 2014. α -galactosidase activity and oligosaccharides utilization by Lactobacilli during fermentation of soy milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1065-1071.

Hurrell RF. 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral Bioavailability. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2973S-2977S.

IMSS. Instituto Mexicano del Seguro Social. 2014. Diagnóstico y tratamiento de la intolerancia a la lactosa en niños. Guía de referencia rápida. *Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica*, IMSS-733-14.

Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M y Kataoka S. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*, 130(7), 1695-1699.

Jurado E, Camacho F, Luzon G y Vicaria JM. 2004. Kinetic models of activity for β -glucosidase: Influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme Microbiology and Technology*, 34, 33-40.

Kale-Pradhan PB, Jassal HK y Wilhelm SM. 2010. Role of *Lactobacillus* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: A Meta-analysis. *Annals of Pharmacoth*, 30(2), 119-26.

Kamizake NKK, Silva LCP y Prudencio SH. 2018. Impact of soybean aging conditions on tofu sensory characteristics and acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(3), 1132-1139.

Kaneko D, Igarashi T y Aoyama K. 2014. Reduction of the off-flavor volatile generated by yogurt starter culture including *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in soymilk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1658-1663.

Kavanagh KL, Jörnvall H, Persson B y Oppermann U. 2008. The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 3895-3906.

Kawaguchi T, Kita R, Shinyashiki N, Yagihara S y Fukuzaki M. 2018. Physical properties of tofu gel probed by water translational/rotational dynamics. *Food Hydrocolloids*, 77, 474-481.

Kumar GS, Kumar TM y Kotwaliwale N. 2018. Effect on composition and storage time on some physico-chemical and rheological properties of probiotic soy-cheese spread. *Journal of Food Science and Technology*, 55 (5), 1667-1674.

- Knox, T. 1991. Calcium absorption in elderly subjects on high and low fiber diets: affect of gastric acidity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 1480-1492.
- Krishna A, Singh G, Kumar D y Agrawal. 2003. Physico-chemical characteristics of some new varieties of soybean. *Journal of Food Science Technology*. 40, 490-492.
- Krishnan HB. 2001. Biochemistry and molecular biology of soybean seed storage proteins. *Journal of New Seeds*, 2, 1-25.
- Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J y Olivares M. 2009. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Journal of Dairy Research*, 76, 216-221.
- Larkin TA, Astheimer LB y Price WE. 2007. Dietary combination of soy with probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 238-245.
- Lee CH, Yang L, Xu JZ, Yeung SYV, Huang Y y Chen ZY. 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chemistry*, 90(4), 735-741.
- Lee S, Cho H y Lee KG. 2014. Volatile compounds as markers of tofu (soybean curd) freshness during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 772-779.
- Lee M-K, Kim J-K y Lee S-Y. 2018. Effects of fermentation on SDS-PAGE patterns, total peptide, isoflavone contents and antioxidant activity of freeze-thawed tofu fermented with *Bacillus subtilis*. *Food Chemistry*, 249, 60-65.
- Li Ce, Rui X, Zhang Y, Cai F, Chen X y Jiang M. 2017. Production of tofu by lactic acid bacteria isolated from naturally fermented soy whey and evaluation of its quality. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 227-234.
- Liu DM, Li L, Yang XQ, Liang SZ y W JS. 2006. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 417-422.
- Lobo DSS, Souza RP, Tong RP, Casey DM, Hodgins DC, Smith GJ, Williams RJ y Schopflocher DP. 2010. Association of functional variants in the dopamine D2-like receptors with risk for gambling behaviour in healthy Caucasian subjects. *Biological Psychology*, 85, 33-37.
- MacDonald A, Evans S, Cochrane B y Wildgoose J. 2012. Wearing infants with phenylketonuria: A review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 25, 103-110.

- Mahajan PM, Desai KM y Lele SS. 2010. Production of Cell Membrane-Bound α - and β -Glucosidase by *Lactobacillus acidophilus*. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 706-718.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C y Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Marazza JA, Nazareno MA, Sovoy de Giori G y Garro MS. 2012. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Functional Food*, 4, 594-601.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín L, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG y Rodríguez JM. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 965-969.
- Martínez C, Ros G, Periago MJ, López G, Ortuño J y Rincón F. 1996. Phytic acid in human nutrition. *Food Science and Technology International*, 2, 201-209.
- McFarland LV 2006. Meta-Analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* Disease. *American Journal of Gastroenterology*, 101, 812-822.
- Medic J, Atkinson C y Hurburgh JCR. 2014. Current knowledge in soybean composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 363-384.
- Meisenberg G y Simmons WH. 2018. Principios de química médica, 4° edición, Elsevier España.
- Mendoza-Avedaño C. 2015. Efecto de factores químicos sobre las características probióticas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Messina y Mark J. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 439-450.
- Messina M y Messina V. 2000. Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: A brief overview. *Journal of Renal Nutrition*, 10(2), 63-68.

Mishra PS y Mishra HN. 2013. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. *Food Bioprocess Technology*, 6(11), 3166-3176.

Mishra PS y Mishra HN. 2015. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yogurt using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 458-67.

Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR y Duthie GG. 1998. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives Biochemistry Biophysics*, 360(1), 142-148.

Mizutani T y Hashimoto H. 2014. Effect of grinding temperature on hydroperoxide and off-flavor contents during soymilk manufacturing process. *Journal of Food and Science*, 69, 112-116.

Mohammadi R y Mortazavian AM. 2011. Review Article: Technological aspects of prebiotics. *Food Reviews International*, 27, 192-212.

Molamma PP, Conrad OP y Suresh V. 2006. Effect of different coagulants on the isoflavones levels and physical properties of prepared firm tofu. *Food Chemistry*, 99, 492-499.

Morales-de la Peña M, Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA y Martín-Belloso O. 2010. Impact of high intensity pulsed electric field on antioxidant properties and quality parameters of a fruit juice soymilk beverage in chilled storage. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 872-881.

Narayan SS, Jalgaonkar S, Shahani S y Kulkarni VN. 2010. Probiotics: Current trends in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Medical Journal*, 16(3), 213-218.

Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X y Xu J. 2011. Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan. *African Journal of Microbiology Research*, 5(12), 1428-1436.

Nolan KB, Duflin PA y McWeeney DJ. 1987. Effects of phytate on mineral bioavailability *in vitro* studies on Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, (also Cd) solubilities in the presence of phytate. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 40, 79-85.

No HK y Meyers SP. 2004. Preparation of tofu using chitosan as a coagulant for improved shelf-life. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 133-141.

Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SAA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

Obadina AO, Akinola OJ, Shittu TA y Bakere HA. 2013. Effect of natural fermentation on the chemical and nutritional composition of fermented soymilk Nono. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 91-7.

Ogueke CC, Owuamanam CI, Ihediohanma NC y Iwouno JO. 2010. Probiotics and prebiotics. Unfolding prospects for better human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9), 833-843.

Ogura K y Sankawa U. 1997. Dynamic aspects of natural products chemistry. *Molecular Biological Approach*. Kodansha, Tokio, 110-112.

Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M y Ścibisz I. 2018. *Propionibacterium* spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 515-538.

Pedero D y Pangbom R. 1989. Evaluación sensorial de los alimentos métodos analíticos, Alambra, 251.

Plank R. 1980. El empleo del frío en la industria de la alimentación. Springer, Berlín, 425.

Plessas S, Nousja C, Karapetsas A, Kazakos S, Alexopoulos A, Mantzourani I, Chondrou P, Fournomiti M, Galanis A y Beitzoglou E. 2017. Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 226, 102.108.

Raghavendra P y Halami PM. 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *International of Food Microbiology*, 133, 129-134.

Ramírez-Torres A. 2015. Evaluación *in vivo* de las características probióticas de *Lactobacillus plantarum* aislada de una bebida autóctona. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

Ray B. 1996. Probiotics of lactic acid bacteria: Science or myth?. En: *Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetic and applications*. (T. F. Bozoglu y B. Ray, eds). Pp. 100-135, Springer, Germany.

Rekha CR y Vijayalakshmi G. 2011. Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and nutrition*, 61, 111-120.

- Riciputi Y, Serrazanetti DI, Verardo V, Vannini L, Caboni MF y Lanciotti R. 2016. Effect of fermentation on the content of bioactive compounds in tofu-type products. *Journal of Functional Foods*, 27, 131-139.
- Rivera-Espinoza Y y Gallardo-Navarro Y. 2010. Non-dairyprobiotic products. *Food Microbiology*, 27, 1-11.
- Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, Rivas B, López F, Gómez-Cordovés C, Mancheño JM y Muñoz R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79-90.
- Rodríguez-Álvarez JA. 2008. La taberna como probiótico. Tesis Profesional para la licenciatura de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Rodriguez LM, Ritvanen T, Joutsjoki V, Rekonen J y Alatosava T. 2011. The role of copper in the manufacture of Finnish Emmental cheese. *American Dairy Science Association*, 94, 4831-4842.
- Rodríguez-Roque MJ, Rojas-Graü MA, Elez-Martínez P y Martín-Belloso O. 2013. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136, 206-212.
- Ryan KA, Jayaraman T, Daly P, Canchaya C, Curran S, Fang F, Quigley EM y O'Toole PW. 2008. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Letters in applied microbiology*, 47(4), 269-274.
- Ryan LAM, Zannini E, Dal Bello F, Pawlowska A, Koehler P y Arendt EK. 2011. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 276-283.
- Peñalvo LJ, Castilho MC, Silveira MIN, Cruz MM y Esperanza TM. 2004. Fatty acid profile of traditional soymilk. *European Food Research and Technology*, 219, 251-253.
- Sanches de Lima F e Ida EI. 2014. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT-Food Science and Technology*, 56, 232-239.
- Saraniya A y Jeevaratnam. 2015. In vitro probiotic evaluation of phytase producing *Lactobacillus* species isolated from Uttapam batter and their application in soy milk fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5631-40.
- Serrazanetti DI, Ndagijimana M, Miserocchi C, Perillo L y Guerzoni ME. 2013. Fermented tofu: Enhancement of keeping quality and sensorial properties. *Food Control*, 34, 336-346.

Scalabrini P, Rossi M, Spettoli P y Matteuzzi D. 1998. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 213-219.

Schlemmer U, Frølich W, Prieto RM y Grases F. 2009. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S330-S375.

SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018.

Smit G, Smit BA y Engels WJM. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591-610.

Solomons NW. 2002. Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(4), 50-55.

Suárez C y Gudiol F. 2009. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129.

Sudarmadji, S. y Markakis, P. 1977. The phytate and phytase of soybean tempeh. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28, 381-383.

Shun-Tang G, Ono T y Mikami M. 1997. Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4601-4605.

Tang AL, Wilcox G, Walker KZ, Shah NP, Ashton JF y Stojanovska L. 2010. Phytase activity from *Lactobacillus* spp. in calcium-fortified soymilk. *Journal of Food Science*, 75(6), M373-M376.

Teekachunhatean S, Hanprasertpong N y Thawatchi T. 2013. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds grown in Thailand. *International Journal of Agronomy*, 6, 1-11.

Tiwari SK y Srivastava S. 2008. Characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14. *Food Biotechnology*, 22, 247-261.

Vásquez SM, Suárez HM y Zapata SB. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (1), 64-71.

- Verardo V, Riciputi Y, Garrido-Frenich A y Caboni MF. 2015. Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. *Food Chemistry*, 185, 239-244.
- Veeramani S, Lee MS y Lin MF. 2009. Revisiting histidine-dependent acid phosphatases: a distinct group of tyrosine phosphatases. *Trends in Biochemistry Science*, 34(6), 273-278.
- Villares A, Rostagno MA, García-Lafuente A, Guillamón E y Martínez JA. 2011. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 27-38.
- Virtanen T, Pinhlanto A, Akkanen S y Korhonen H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115.
- Vong WC y Liu SQ. 2016. Changes in volatiles profile of soybean residue (okara) upon solid-state fermentation by yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 135-143.
- Vong WC y Liu SQ. 2018. Bioconversion of green volatiles in okara (soybean residue) into esters by coupling enzyme catalysis and yeast (*Lindnera saturnus*) fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 10017-10026.
- Wang T, He F y Chen G. 2014. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7, 101-111.
- Walstra P. 1990. On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73, 1965-1979.
- Wemmenhove E, Wells-Bennik MHJ, Stara A, Hooijdonk ACM y Zwietering MH. 2016. How NaCl and water content determine water activity during ripening of Gouda cheese, and the predicted effect on inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5192-5201.
- Wyk JV, Morkel RA y Dolley L. 2018. Metabolites of *Propionibacterium*: Techno- and biofunctional ingredients. *Alternative and Replacement Foods*, 205-260.
- Wu QQ, You HJ, A HJ, Kwon B y Ji GE. 2012. Changes in growth and survival of *Bifidobacterium* by coculture with *Propionibacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 65-72.

Xiao Y, Wang L, Rui X, Li W, Chen X, Jiang M y Dong M. 2015. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *Journal of Functional Foods*, 12, 33-44.

Yoon MY y Hwang HJ. 2008. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -D- galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiology*, 25, 815-823.

Yuksekdag Z, Cinar AB, Aslim B y Tukenmez U. 2018. β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones by potential probiotic bacteria. *International Journal of Food Properties*, 20(S3), S2878-S2886.

Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J y Giraffa G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033-1040.

Zhang A, Sun J, Wang Z, Yang ST y Zhou H. 2015. Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresource Technology*, 175, 374-381.

Zhang Y, Guo S, Liu Z y Chang S. 2012. Off-flavor related volatiles in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7457-7462.

Zhan Q y Qin W. 2018. Tofu and soy products: The effect of structure on their physicochemical properties. *Reference Module in Food Science*, 1-9.

Zhao D y Shah NP. 2014. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 58, 454-462.