

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MASA ÁCIDA DE CHÍA (*SALVIA HISPANICA L.*)

Evaluation of rheological properties, phenolic compounds and antioxidant activity of sourdough chia (*Salvia hispanica L.*)

Ana Yanina Bustos ^{a,b,*}, Lina Mothar ^a, Carla Luciana Gerez ^c, Verónica Paz Zanini ^{a,d}, Mónica Nazareno, Laura B Iturriaga ^{a,d}, María Pía Taranto ^c.

^a Centro de Investigaciones y Transferencia de Santiago del Estero (CITSE –CONICET). ^b Universidad de San Pablo Tucumán. ^c Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). Argentina.

^d Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina. Email: abustos@uspt.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se aislaron y seleccionaron bacterias lácticas autóctonas (BAL) de masa ácida de chía (*Salvia hispanica L.*). La selección se realizó en base a su cinética de acidificación y actividad proteolítica. La cepa C8 fue seleccionada e identificada como *Lactobacillus (L.) plantarum* C8 y posteriormente utilizada como cultivo iniciador para obtener masa madre de chía. Se observó que la fermentación láctica incrementó las concentraciones de ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético y ácido fenil-láctico) y el contenido de compuestos fenólicos (2080 mg AG/100 g peso seco de masa), en tanto que la actividad antioxidante aumentó 33-40% en comparación con la masa de harina de chía sin fermentar. Además, la composición de los compuestos fenólicos fue significativamente modificada después de 24 h de fermentación por *L. plantarum* C8; el ácido clorogénico sólo se encontró en la masa fermentada ($2,52 \times 10^3$ mg/kg), mientras que el ácido ferúlico se detectó desde el principio de la fermentación, siendo 32% más alto en masa madre de chía ($5,55 \times 10^2$ mg/kg). El uso de masa fermentada de chía mejoró las características generales del pan blanco, incluyendo propiedades físicas (reducción de la dureza y masticabilidad de la miga) y propiedades antioxidantes (incremento del 25% en promedio), en comparación con el agregado de harina de chía no fermentada. Estos resultados indican que el uso de masa madre de chía podría ser una alternativa prometedora para mejorar el perfil tecnológico y antioxidante de los panes de trigo. Además, este trabajo demuestra por primera vez que la fermentación láctica de masa de chía contribuye a mejorar sus características lo que representa una potencial aplicación en la industria de los alimentos funcionales.

Palabras claves: Masa ácida de chía; *Lactobacillus plantarum*; Actividad antioxidante; Compuestos fenólicos.

SUMMARY

In this work, autochthonous lactic acid bacteria (LAB) were isolated from chia (*Salvia hispanica L.*) dough and selected on the basis of the kinetics of acidification and proteolytic activity. Strain C8 was selected, identified as *Lactobacillus plantarum* C8, and used as starter to obtain a chia sourdough. Lactic fermentation increased the organic acid concentrations (12.30, 1.02 and 23.8 g kg⁻¹ dough of lactic, acetic and phenyl lactic acid, respectively), phenolic compound content (2080 mg AG 100 g-1dw), and antioxidant activities, which increased by ca. 33–40 % compared to unfermented chia flour dough. In addition, the composition of phenolic compounds was strongly modified after 24 h fermentation by *L. plantarum* C8. Chlorogenic acid was only found in fermented dough (2.52×10^3 mg Kg⁻¹), while ferulic acid was detected from the beginning of fermentation, being 32 % higher in chia sourdough (5.55×10^2 mg Kg⁻¹). The use of formulated chia sourdough improved the overall characteristics of white bread, including physical (e.g. reduced hardness and chewiness of the crumb) and antioxidant properties (25 % on average), compared with unfermented chia flour addition. These results indicate that the use of chia sourdough could be a promising alternative to improve the technological and antioxidant status of wheat breads. In addition, this work shows, for the first time, that lactic acid bacterium is able to ferment chia dough improving its characteristics with potential application in the functional food industry.

Keywords: Chia sourdough; *Lactobacillus plantarum*; Physical properties; Antioxidant activity; Phenolics compounds

INTRODUCCIÓN

Chía es una planta anual perteneciente a la familia de las *Lamiaceae*, nativa del sur de México y Norte de Guatemala (Álvarez-Chávez, Valdivia-López, Aburto-Juarez, & Tecante, 2008). Actualmente, debido a sus destacadas propiedades nutricionales y funcionales, los científicos han recuperado el interés por esta semilla. En efecto, la semilla de chía contiene una gran cantidad de antioxidantes, minerales, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácidos grasos omega-3 y omega-6, importantes constituyentes del sistema nervioso central (Reyes-Caudillo, Tecante, & Valdivia-López, 2008). Por lo tanto, la incorporación de chía en diferentes alimentos tales como *pound cakes* (Pizarro, Almeida, Sammán, & Chang, 2013), pan de trigo (Coelho & de las Mercedes Salas-Mellado, 2015) y pan libre de gluten (Moreira, Chenlo, & Torres, 2013) fue recientemente reportado. Sin embargo, a pesar de sus valiosas características nutricionales y funcionales, la incorporación de chía en productos de panadería afecta negativamente la formación de la red de gluten y la retención de gas en la masa panaria generando productos de baja calidad tecnológica (Coelho & de las Mercedes Salas-Mellado, 2015; Steffolani, Martínez, León, & Gómez, 2015). En consecuencia, la obtención de una masa estable y adecuada para panificación representa un importante reto tecnológico. Para superar estas limitaciones se han desarrollado diferentes estrategias tales como adición de hidrocoloides, emulsionantes, proteínas y masas ácidas (“*sourdough*”).

La masa ácida consiste en una mezcla de harina y agua fermentada con bacterias lácticas (BAL) principalmente cepas heterofermentativas que generan ácidos láctico, acético y CO₂. Numerosos estudios han reportado efectos positivos de la adición de *sourdough* en diferentes parámetros de calidad del pan (estructura de la miga, volumen de la masa, sabor) así como incremento en la vida de estante del producto (Clarke, Schober, Dockery, O'Sullivan, & Arendt, 2004; Gerez, Torino, Obregozo, & Font de Valdez, 2010; Mamhoud et al., 2016; Thiele, Gänzle, & Vogel, 2002). Adicionalmente, el metabolismo de las BAL durante la fermentación facilita la hidrólisis de macromoléculas, por lo tanto, mejora la digestibilidad y la calidad nutricional de los panes (Bartkiene, Juodeikiene, & Vidmantiene, 2012; Rizzello, Lorusso, Montemurro, & Gobbetti, 2016). Sin embargo, los procesos de

fermentación dependen de numerosos factores específicos que deben ser estrictamente controlados para obtener un producto de la calidad deseada. Entre estos determinantes, el tipo de harina y el cultivo iniciador son los más importantes. La harina seleccionada afecta a las características tecnológicas y el valor nutricional de los productos horneados (Coda, Di Cagno, Gobbetti, & Rizzello, 2014). Por otra parte, el éxito en la aplicación de masa ácida en panificación radica principalmente en la selección de las BAL que van a ser usadas como iniciadores. Se ha demostrado que los cultivos comerciales diseñados para masas ácidas de cereales que contienen gluten no son adecuados para la fermentación de harinas libres de gluten y por ello resulta imprescindible la selección cuidadosa de nuevos microorganismos iniciadores (Rizzello et al., 2016). En este sentido, a nuestro entender, no hay datos sobre la selección de cepas lácticas adecuadas para la preparación de masas madres de harina de chía. De lo expuesto hasta aquí surgió el objetivo general de este trabajo que fue la selección de cepas de BAL autóctonas a partir de masa de chía fermentada. Posteriormente se preparó y caracterizó una masa madre de chía elaborada con el cultivo iniciador seleccionado en términos de su comportamiento reológico, producción de ácidos orgánicos, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Esta masa madre se utilizó como ingrediente para la producción de panes de trigo. Por último se evaluó el perfil tecnológico y funcional de los panes elaborados con el fin de poner en evidencia las ventajas del uso de masa madre respecto del uso de harina de chía sin fermentar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La harina de trigo y otros ingredientes se obtuvieron del mercado local, mientras que la harina de chía se obtuvo mediante la molienda de semillas comerciales de chía (A. Sturla, Buenos Aires, Argentina) en un molino de escala de laboratorio (molino de martillo, Antofagasta, Chile). El 1,1-difenil-2-picrilo-hidracilo (DPPH); 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ); ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxílico (Trolox) y ácido ascórbico (AA) se adquirieron de Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Análisis de harinas

Las muestras de harina comerciales fueron analizadas a fin de conocer el contenido de: grasa (método 920.39), cenizas (método 923.03), nitrógeno total (método 954.01) y humedad (método 925.09). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las normativas AOAC (1990).

Análisis microbiológico y aislamiento de BAL

BAL fueron aisladas a partir de masa fermentada de harina de chíá, las cuales fueron preparadas para obtener un rendimiento de masa (RM: peso de la masa/peso de harina x 100) de 300 y fermentadas a 30 o 37 ° C durante 24 h. La fermentación de masa de chíá se realizó aplicando el protocolo tradicional utilizada para la fermentación de harina de trigo, sin el agregado de cultivos iniciadores ni levadura de panadería (Rizzello et al., 2016).

Después de esta primera fermentación, se llevaron a cabo 5 refrescos sucesivos mezclando 25% de la masa previamente fermentada con harina y agua (RM de 300), e incubando durante 24 horas a 30 ° C o 37 ° C. Para la medición del pH se tomaron muestras a diferentes tiempos tal como se indica a continuación: 10 g de cada muestra se mezclaron con 90 ml de agua destilada y se agitaron y luego se centrifugaron a 9000 g durante 15 min. La medición de pH se realizó en el sobrenadante utilizando un peachímetro (pH 209; Hanna Instruments, Amorim-Póvoa de Varzim, Portugal)). Después de cinco refrescos la tasa de acidificación fue estable y la masa de chíá fermentada se utilizó para el aislamiento de LAB de la siguiente manera: 10 g de masa fermentada de chíá se homogeneizaron con 90 ml de solución salina estéril (0,85% NaCl) y se cultivaron en agar MRS Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con cicloheximida (0,1 g/L). Las placas se incubaron a 30 ° C o 37 ° C durante 48 h. Las bacterias autóctonas, fueron seleccionados al azar de las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. Los cultivos puros se cultivaron en agar MRS a 30 ° C o 37 ° C durante 24 h, y después las cepas purificadas se almacenaron a -70 ° C en caldo MRS con 15% (v/v) de glicerol hasta su utilización. Cincuenta cepas (Gram positiva, catalasa-negativa y capaces de acidificar el medio de cultivo) fueron seleccionados y cultivadas durante 24 h en caldo MRS a 30 ° C o 37 ° C (dependiendo de la temperatura de aislamiento). Las células fueron recolectadas por centrifugación (4000 g durante 10 min) y se lavaron dos veces con solución salina. 100 gramos de harina de chíá y 200 ml de agua

corriente conteniendo la suspensión celular anterior (densidad de células en la masa de 7 ufc / g de masa), se utilizaron para dar obtener un RM de 300. La mezcla se realizó manualmente durante 5 min. Las masas se fermentaron a 30 ° C o 37 ° C por 24 h, de acuerdo con la temperatura óptima de crecimiento de las cepas lácticas. El crecimiento LAB se determinó por el método de dilución en placa con agar MRS; las placas se incubaron a 37 ° C durante 48 h y los resultados se expresaron como log UFC/g. Se determinó el pH de masas como se describió anteriormente y las concentraciones totales de aminoácidos libres en masas se determinaron utilizando el método de o-ftalaldehído (OPA) (Iglesia, Porter, Catignani, y Swaisgood, 1985)

Identificación genotípica de BAL seleccionada

La identificación del genotipo de la cepa seleccionada se determinó sobre la base de la secuenciación de la región variable (V1) del rDNA 16S. Los oligonucleótidos para las reacciones de PCR fueron: PLB16, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; y MLB16, 5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3'. La amplificación por PCR consistió en 30 ciclos de 30 s / 94° C, 30 s / 50 ° C y 1 min / 72 ° C. Los productos finales de PCR se purificaron usando un kit comercial (AccuPrep® PCR kit de purificación; Bioneer Corporation, Genbiotech, Bs As, Arg) y se sometieron a secuenciación (Servicio de Secuenciación, Centro Científico Tecnológico CONICET Tucumán, Argentina). Las secuencias resultantes se analizaron en línea utilizando los algoritmos BLAST del NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el Proyecto de Base de Datos ribosomal (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

Preparación y caracterización de masa madre de chíá preparada con la cepa seleccionada C8

Se preparó masa madre de chíá utilizando como cultivo iniciador la cepa *L. plantarum* C8 (cepa seleccionada). El pH de la masa se determinó de igual manera a la descrita en el párrafo anterior, excepto que la temperatura de incubación fue de 37 ° C (temperatura óptima de crecimiento de la cepa seleccionada). El crecimiento de las BAL se determinó por el método de dilución en placa con agar MRS; las placas se incubaron a 37 ° C durante 48 h. La cuantificación de ácido láctico se realizó por amperometría usando un sistema electroquímico de tres electrodos optimizados previamente para

la detección de ácido láctico (Zanini, de Mishima, y Solís, 2011). Los ácidos acético y fenil-láctico se midieron como fuera descrito previamente (Gerez et al., 2010) por HPLC (CIUO 2350 modelo) usando una columna de exclusión iónica HPX-87H Aminex (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA). Las concentraciones de ácidos orgánicos se expresaron como g o μ g por Kg de masa.

Caracterización reológica de masa de chía fermentada

Las medidas reológicas se llevaron a cabo utilizando un reómetro de tensión controlada (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE) con un software para reología (Programa de Análisis de Datos Reología Advantage). Para las mediciones, las muestras de masa (0 y 24 h de fermentación) se fijaron entre las placas (D = 40 mm con una separación de 1,500 μ m) y las mediciones se iniciaron después de un tiempo de relajación de 10 min. Las pruebas se llevaron a cabo a temperatura constante (25 °C) usando un sistema de placa Peltier acoplado a una unidad de circulación de agua. Los barridos de frecuencia se realizaron en la región viscoelasticidad lineal y en rango de frecuencias de 0,1 a 10 Hz. Los parámetros reológicos medidos fueron: módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), módulo complejo (G*) y la tangente del ángulo de pérdida (tan δ).

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la masa de chía fermentada

Preparación del extracto

Se secaron diez gramos de masas de chía (0 y 24 h de fermentación) y muestras de panes a 50 ° C durante 12 h y luego fueron triturados manualmente en un mortero de piedra tradicional hasta polvo. Para la extracción, 1 g de cada muestra se mezcló con 10 ml de una solución metanólica 80% (v/v) durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente las muestras se centrifugaron (9000 g durante 15 min). Los sobrenadantes (extractos) se almacenaron a -20 ° C hasta su uso.

Compuestos fenólicos y su identificación mediante electroforesis capilar de zona

El contenido de polifenoles totales se determinaron colorimétricamente usando el método de Folin-Ciocalteu como se ha descrito previamente (Ezequiel, Singh, Sharma, y Kaur, 2013). La absorbancia se determinó a 725 nm con el espectrofotómetro Jasco V-630 (Medson, Paczkowo, Polonia). La curva de calibración utilizada, a fin de determinar la concentración

de compuestos fenólicos, fue realizada con ácido gálico entre 15 ppm a 200.

La identificación de los polifenoles presente en masas (0 y 24 h de fermentación) se realizó mediante electroforesis capilar de zona en el instrumento Agilent CE equipado con un detector UV ajustado a 206 nm. La separación y el análisis se llevaron a cabo en un tubo capilar de sílice fundida (50 μ m de diámetro interno y 56 cm de longitud total) a 25 ° C. Se utilizaron como estándares el kaempferol, galangina, quercetina y ácidos: benzoico, caféico, ferúlico, clorogénico, 3,4 dihidroxibenzoico y cumárico.

Actividad antioxidante

Capacidad captadora del radical DPPH \circ (1,1 difenil-2-picrilhidrazilo)

Se determinó la actividad antioxidante en masas y panes. Diferentes alícuotas de cada uno de los extractos (preparados como se ha descrito anteriormente) se añadieron a una solución metanólica de DPPH (absorbancia inicial a 515 nm de 1,20). La disminución de la absorbancia a 515 nm se determinó durante 30 min usando un espectrofotómetro. La actividad antioxidante se expresó como ARA%/ g de peso seco (ps); donde el porcentaje de la desaparición DPPH por los extractos se calculó según la siguiente ecuación: $ARA\% = (1 - ASS/A0) \times 100$ donde ASS es la absorbancia de la solución en un estado de equilibrio y A0 es la absorbancia de la solución de DPPH antes de añadir el antioxidante. La absorbancia del sistema en el estado estacionario se estimó mediante un ajuste matemático de curvas cinéticas realizadas con software Origen 7.0. Los valores de CI50 calculados denotan la concentración de la muestra requerida para disminuir la absorbancia a 515 nm en un 50%.

Método de FRAP (ferric reducing/antioxidant power)

El ensayo de FRAP se llevó a cabo de acuerdo con Benzie y Strain, (1996). La mezcla de reacción consistió en una solución de cloruro férrico solución (20 mmol/L), TPTZ, (10 mmol/L TPTZ en 40 mmol/L de HCl) y tampón de acetato (pH = 3,5) en una proporción de 1: 1: 10, respectivamente. Para cada reacción 0,05 ml del extracto, preparado como se describe anteriormente, se añadieron a 0,95 ml de la mezcla de reactivos, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Posteriormente, se midió la absorbancia y los resultados finales se expresaron como μ g Trolox g/ps.

Fabricación de pan de trigo utilizando masa fermentada de chíá

Masa de chíá preparada a partir de *L. plantarum* C8 se utilizó para la producción de pan de trigo (CS-WB). Las diferentes formulaciones se muestran en la Tabla 1. Pan tradicional de harina de trigo (WB) y pan de trigo con agregado de harina de chíá sin fermentar (CF-WB) fueron fabricados y utilizados como controles. La levadura comercial *S. cerevisiae* (Calsa, levadura Company Argentina S.A.) se utilizó como agente de fermentación para todas las masas (7 log ufc/ g de masa). Se probó el siguiente programa de cocción: mezcla de los ingredientes durante 10 minutos (primero 2 minutos a velocidad lenta y 8 min a mayor velocidad). Las masas se colocaron individualmente en bandejas de aluminio y fermentaron a 30 ± 1 °C y 85 % de humedad relativa durante 60 min. Después de la fermentación, las masas se cocieron en horno eléctrico (180 °C durante 20 min), y las piezas de pan se enfriaron a temperatura ambiente durante 120 min para luego ser envasados en bolsas de polietileno y almacenados a 30 °C.

Evaluación de los parámetros de calidad tecnológica

En los panificados elaborados se evaluaron los siguientes parámetros tecnológicos:

a) Volumen específico Se efectuó el análisis de volumen específico siguiendo la técnica 10-05 de la AACC (2000); de desplazamiento de semillas de colza; la cual consiste en colocar una cantidad medida de semillas en un recipiente cilíndrico; medir la altura inicial, luego introducir la pieza de pan, agregar nuevamente las semillas de colza y medir nuevamente la altura final. El volumen específico se calculó con la siguiente fórmula:

$V_{sp} = (\pi \times r^2 \times D) / P$, (donde; D: diferencia de altura, r: radio de recipiente, P: peso del pan).

c) Análisis instrumental de textura

Se realizó análisis de perfil instrumental de textura (TPA) empleando el texturómetro TAXT Plus (Stable Micro Systems, UK) aplicando compresión uniaxial en dos ciclos con 5 segundos de intervalo hasta un 50% de deformación con la sonda SMS P/20 a una velocidad de 5 mm/s. Las mediciones de realizaron de acuerdo con el método 74-10 de la AACC (2000), con algunas modificaciones; para ello se cortó una rebanada del centro de cada pan de 2 cm de espesor en la que se

determinaron los siguientes parámetros: dureza, masticabilidad y cohesividad.

Análisis de los datos

Todas las mediciones se llevaron a cabo por lo menos en tres ensayos independientes y los resultados obtenidos se informaron como valores medios con sus respectivas desviaciones estándar. El análisis de la varianza (ANOVA) y post pruebas de LSD de Fisher se realizaron con InfoStat 2014, InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> URL. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal de harina de chíá y trigo

Con el fin de caracterizar la materia prima utilizada en este trabajo, se determinó la composición proximal de la harina de chíá y trigo. El contenido de proteínas ($25,08 \pm 2,1$ %), cenizas ($6,75 \pm 0,22$ %) y grasas ($19,41 \pm 1,5$ %) registrados en harina de chíá fueron más elevados que los obtenidos en harina de trigo ($14,59 \pm 1,11$; $0,73 \pm 0,32$ y $1,63 \pm 0,12$ %, respectivamente). Estos resultados son coincidentes con lo reportado en la literatura (Pizarro et al, 2013). El alto porcentaje de lípidos se debe a que las semillas de chíá poseen un 60-70% de ácido linolénico (Ixtaina, Nolasco, y Tomás, 2008), cuyo consumo es benéfico para salud humana (Reyes-Caudillo et al., 2008). Estos datos indican que la adición de harina de chíá a panes de trigo podría mejorar su contenido de proteínas y grasas. Además, el alto contenido de cenizas en la harina de chíá podría complementar la harina de trigo (con bajo contenido de minerales) para satisfacer las necesidades diarias de los distintos elementos.

Aislamiento y selección de bacterias lácticas de masas fermentadas de chíá

A partir de masas fermentadas de harina de chíá se aislaron cepas autóctonas, de las cuales 50 cepas (33 cocos y 17 lactobacilos) fueron capaces de acidificar el caldo MRS, gram-positivos, catalasa-negativa y no móviles. Frecuentemente, los lactobacilos son seleccionados como cultivos iniciadores para masas fermentadas (sourdough) principalmente por sus propiedades de competitividad y adaptación a este entorno particular. Así, se continuaron los estudios en masa madre de chíá inoculadas individualmente con los 17 lactobacilos. Las 17 cepas fueron capaces de disminuir el pH (pH inicial= $6,30 \pm 0,10$),

observándose valores de ΔpH (diferencia entre el pH antes y después de la fermentación) entre $1,5 \pm 0,05$ a $2,0 \pm 0,1$. Luego de la fermentación también se observó un incremento (2-3 veces) en la concentración de aminoácidos libres totales dependiendo de la cepa láctica inoculada. Los mejores resultados ($\Delta\text{pH} = 2.0$ y concentración total de aminoácidos libres 28.3 ± 1.1 $\mu\text{M/g}$ de masa) se obtuvieron en masas fermentadas por la cepa C8, por lo tanto, posteriormente esta cepa fue identificada genotípicamente como *Lactobacillus* (*L. plantarum* C8).

Producción de masa madre de chía inoculada con L. plantarum C8

La harina de chía fue fermentada por *L. plantarum* C8 para obtener una masa madre. Después de 24 h de fermentación, se observó un incremento en el recuento celular (9,25 cfu/g) y un descenso del pH de las masas (4,30). Esta disminución del pH se debió a la producción de ácidos orgánicos, observándose un aumento gradual de ácido láctico durante la fermentación hasta alcanzar un valor de 12,30 g/kg de masa después de 24 h (Fig. 1). Además, se detectó ácido acético (1,02 g/kg de masa) y PLA (23,8 g/Kg de masa) en las masas fermentadas de chía. El PLA es un ácido orgánico producido por algunas cepas de BAL y es un agente antimicrobiano capaz de prevenir el deterioro fúngico (Gerez et al., 2010). Al final de la fermentación el valor del coeficiente de fermentación, dado por la relación ácido láctico / ácido acético ácidos, fue 12.06. Este valor está en el rango de los reportados previamente en masas fermentadas de quinua y centeno (Banu y Aprodu, 2012; Rizzello et al, 2016).

Pruebas oscilatorias de masas madre de chía C8

Las características viscoelásticas de las masas madre de chía fermentadas con la cepa C8 fueron evaluadas. La figura 2 muestra los barridos de frecuencia de la masa madre chía al principio y al final de la fermentación. Las pruebas de barrido de frecuencia oscilatoria en el dominio viscoelástico lineal indicaron que los módulos de almacenamiento, pérdida y complejo tuvieron una tendencia creciente durante todo el dominio de frecuencia observándose un comportamiento similar al sólido ($G' > G''$) en ambas muestras estudiadas. G'' mostró diferencias entre las muestras; la masa madre sin fermentar mostró los valores más altos a 1 Hz de frecuencia (9149 ± 819 Pa), mientras que después de 24 h de fermentación alcanzó un valor de 6902 ± 420 Pa. El análisis

del espectro permitió inferir que la fermentación láctica de chía produjo una pérdida de consistencia y un aumento en el carácter viscoso. Además, una disminución en el módulo complejo y en la elasticidad se reportó en masas de amaranto y trigo sarraceno fermentadas con diferentes cepas lácticas (*L. plantarum*, *L. paralimentarius* o *L. brevis*) (Houben, Götz, Mitzscherling, y Becker, 2010; Moroni, Dal Bello, Zannini, y Arendt, 2011). Estos cambios reológicos podrían atribuirse en parte a la actividad proteolítica observada en la masa de chía después de la fermentación por el lactobacilo C8. En otros estudios, la actividad proteolítica de cepas lácticas fue reportada como la causante de cambios reológicos en masas de trigo y centeno (Clarke et al, 2004; Thiele et al, 2002). Por otro lado, acidificación de las masas también puede producir cambios en el comportamiento reológico. Sin embargo, algunos autores mostraron que masas acidificadas químicamente (trigo, amaranto, entre otros) tuvieron un comportamiento opuesto (masas más elásticas) probablemente porque la acidificación fue instantánea y no progresiva como en la fermentación de masa madre (Houben et al, 2010; Katina, 2005).

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de masas madre de chía C8

La presencia de compuestos fenólicos (CF) en la dieta es beneficioso para la salud, principalmente debido a su actividad antioxidante (Hoyo et al, 2012; Reyes-Caudillo et al., 2008). El contenido de CF total de las masas madre de chía C8 se muestran en la Tabla 2. Luego de 24 h de fermentación de las masas de chía, el contenido de CF incrementó significativamente (1490-2080 mg AG/100g de masa). Posteriormente, se identificó el perfil de CF mediante electroforesis capilar en las masas de chía fermentadas y no fermentadas (Fig. 3). La fermentación láctica modificó el contenido y el perfil de CF de las masas madre de chía (tiempo 0 y 24 h de fermentación) como se observó en los electroferogramas. Catorce picos del electroferograma se modificaron durante la fermentación láctica, nueve de ellos aumentaron su concentración y cinco mostraron el comportamiento opuesto. Todos los CF reportados anteriormente en productos de chía (Capitani, Ixtaina, Nolasco, y Tomás, 2013; Reyes-Caudillo et al, 2008) fueron usados como estándares para la identificación (ver Materiales y métodos 2.7.2.). Sin embargo, solamente los ácidos ferúlico y clorogénico se identificaron en los extractos metanólicos de masa de chía (Fig. 3). El ácido clorogénico solamente se evidenció

después de la fermentación láctica ($2,52 \times 10^3$ mg/ kg), mientras que el ácido ferúlico fue detectado desde el principio de la fermentación, siendo un 32% superior en masa fermentada 24 h.

Algunos autores reportaron que la fermentación láctica de centeno, cebada, avena y otros vegetales (por ejemplo, los pepinos, repollos, aceitunas, zanahorias, judías verdes, calabacines, alcachofas, alcaparras y berenjenas) incrementó el contenido de CF (Hoyo et al., 2012; Katina y otros, 2007). Cepas de *L. plantarum* se aíslan con mayor frecuencia en vegetales fermentados, y su capacidad para metabolizar el CF ha sido ampliamente reportada (Curiel, Rodríguez, Landete, de las Rivas, y Muñoz, 2010; Rodríguez et al, 2009). Durante la fermentación de harinas de cereales, enzimas microbianas tales como decarboxilasas, reductasas, estererasas y/o glicosidasas y enzimas endógenas de la harina (que se activan por el descenso de pH) incrementan el contenido total de compuestos fenólicos (Nionelli et al, 2014; Rodríguez et al, 2009).

La actividad antioxidante de masas madre de chía también fue evaluada mediante dos métodos complementarios, DPPH y FRAP (Tabla 2). Así, se observa que la actividad antioxidante aumenta 33,33- 39,60 % después de 24 h de fermentación. La actividad de la masa madre de chía, determinada por la eliminación de radicales DPPH (ARA y IC50), alcanzó un valor de 2,863% /g al final del proceso de fermentación (IC50: 1,98 mg/ml), mientras que en masas sin fermentar el valor fue de 1732 %/g (IC50: 3,08 mg/ml). Por método de FRAP se observó una tendencia similar. Otros autores también reportaron un aumento en la actividad antioxidante en masas madre preparadas a partir de diferentes harinas tales como centeno, trigo integral, entre otros respecto a las masas no fermentadas y, además, demostraron la capacidad de BAL para liberar péptidos antioxidantes a través de la proteólisis de las proteínas de cereales nativas (Banu y Aprodu, 2012; Coda et al, 2014).

Evaluación de los panificados

Se utilizó masa fermentada de chía preparada a partir de *L. plantarum* C8 para la producción de pan de trigo (CS-WB). Panificados con y sin el agregado de harina de chía sin fermentar (CF-WB y WB, respectivamente) se utilizaron como controles. De acuerdo con los resultados

anteriores, se encontró que el contenido de CF fue mayor (113,38 mg AG/100 g ps), en los panes CS-WB (Tabla 2). En coincidencia, la actividad antioxidante fue 1,3 veces mayor que la encontrada en los panes con harina sin fermentar y 7 veces mayor que los panes de trigo. Por lo tanto, la adición de masa madre fue eficaz para mejorar la concentración de CF y el estado antioxidante de los panes tradicionales.

Los volúmenes específicos de los diferentes tipos de panes se muestran en la Tabla 3. La adición de harina o masa madre de chía reduce ligeramente el volumen específico de los panes respecto al pan de trigo. Coelho y de las Mercedes Salas-Mellado (2015), y Steffolani et al. (2015) han informado comportamientos similares en panes enriquecidos con 5-11% (p/p) de harina de chía. Como se ha informado, el agregado de chía disminuye la cantidad de gluten presente en la formulación y por lo tanto reduce la retención de burbujas de aire en la masa (Steffolani et al., 2015). Por otra parte, numerosos autores han reportado que el uso de masa madre de trigo es capaz tanto de reducir como incrementar el volumen de panes de trigo (Revisión Katina, 2005). Se ha propuesto que la influencia de masa fermentada en el volumen del pan se debe principalmente a reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la fermentación. Con la disminución gradual del pH disminuye se produce la activación de enzimas amilolíticas y proteolíticas (entre otras) que conducen a modificaciones de componentes de la masa.

En el caso de firmeza de la miga y la masticabilidad, nuestros estudios indican que la adición tanto de harina como masa madre de chía redujo estos parámetros en comparación con los observados en panes de trigo. La disminución de la firmeza podría explicarse a partir del comportamiento reológico descrito anteriormente (Fig. 1). En este sentido, Moroni et al. (2011) observaron una disminución en la masticabilidad y firmeza con bajos niveles de adición de masa fermentada en panes de alforfón.

La cohesión es un parámetro que está vinculado a la integración de los componentes de una muestra cuando se somete a una deformación. En ambos tipos de panes (CS-WB y CF-WB) se observó un significativo incremento en la cohesión respecto de los panes de trigo, sin diferencias significativas entre ellos.

Tabla 1. Formulaciones de los diferentes panificados

Ingredientes (% base seca)	WB	CF-WB	CS-WB
Harina de trigo	100	80	80
Harina de chia	-	20	0
Masa ácida de chía		-	40
NaCl	8	8	8
<i>S. cerevisiae</i>	3	3	3
Agua	55	55	35

WB: Pan de trigo; CF-WB: Pan de trigo con harina de trigo sin fermentar; CS-WB: Pan de trigo con masa de chía fermentada. La relación trigo:chía fue 4:1 en ambas formulaciones.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de masas y panes

Muestras	Contenido de fenoles totales (mg AG 100 g/ps)	Actividad antioxidante		
		DPPH IC ₅₀ (mg/ml)	DPPH ARA (% g/ps)	FRAP mg Trolox/g ps)
Masa ácida de chía 0 h	1490 ± 50 ^a	3.08 ± 3.7 ^a	1732 ± 85 ^a	14.11 ± 1.82 ^a
24 h	2080 ± 90 ^b	1.98 ± 5.5 ^b	2863 ± 99 ^b	21.13 ± 3.30 ^b
WB	n.d.	72.11 ± 10.5 ^c	58.33 ± 1.3 ^c	0.47 ± 0.05 ^c
CF-WB	63.47 ± 3.5 ^c	16.27 ± 0.99 ^d	277.77 ± 15 ^d	2.84 ± 0.08 ^d
CS-WB	113.38 ± 8.2 ^d	12.07 ± 0.58 ^c	366 ± 17 ^e	3.75 ± 0.11 ^e

WB: Pan de trigo; CF-WD: Pan de trigo con harina de trigo sin fermentar; CS-WD: Pan de trigo con masa de chía fermentada; n.d.: no detectado; GA: ácido gálico; DPPH: 1,1-Dipfenil-2-picril-hidrazilo; TPTZ: 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina; Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2- ácido carboxílico; FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma; ps: peso seco. Variables con el mismo super índice en la misma columna no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

Tabla 3. Efecto de la adición de harina de chía y de masa fermentada de chía en parámetros de calidad panaria

Muestras	Volumen específico (mL/g)	Análisis de perfil de textura		
		Firmeza (g)	Masticabilidad (g)	Cohesividad
WB	3.33 ± 0.23 ^a	1815 ± 66 ^a	1150 ± 139 ^a	0.84 ± 0.03 ^a
CF-WB	2.69 ± 0.30 ^b	1324 ± 225 ^b	1050 ± 280 ^a	1.31 ± 0.07 ^b
CS-WB	2.85 ± 0.19 ^b	966 ± 147 ^c	605 ± 80 ^b	1.25 ± 0.05 ^b

WB: Pan de trigo; CF-WD: Pan de trigo con harina de trigo sin fermentar; CS-WD: Pan de trigo con masa de chía fermentada. Variables con el mismo super índice en la misma columna no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

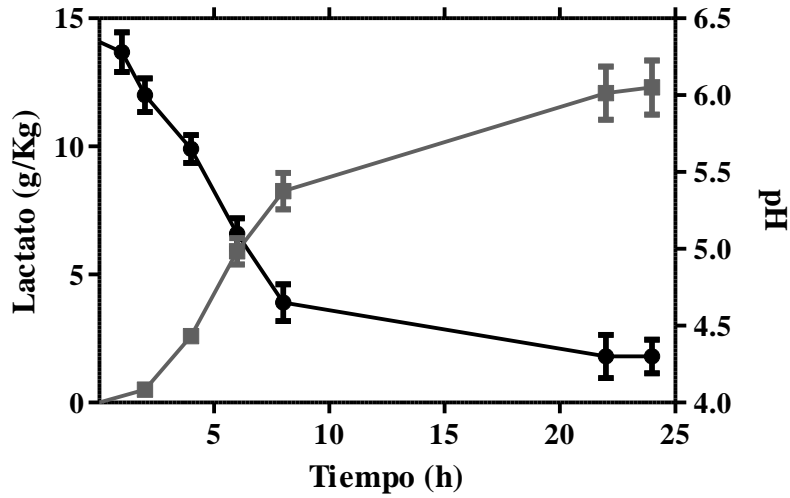


Figura 1. Concentración de ácido láctico (■) y valores de pH (●) en masa de chíá inoculada con la cepa *L. plantarum* C8.

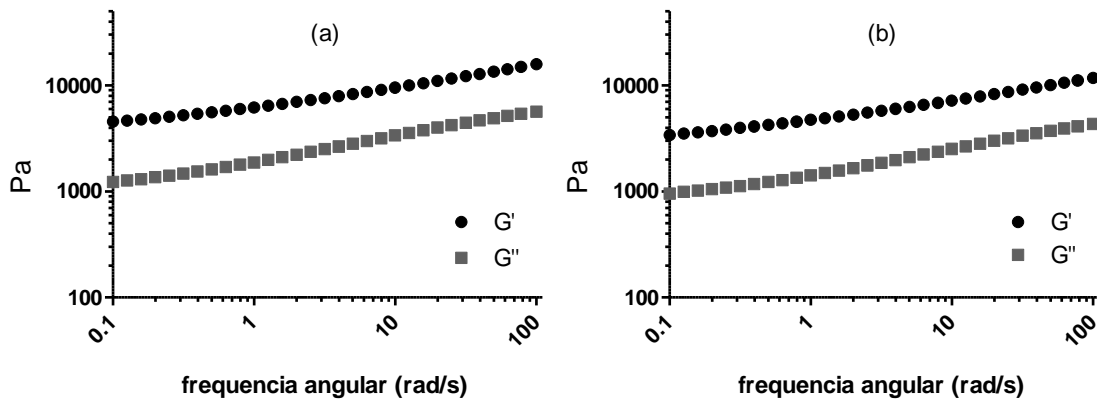


Figura 2. Módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'') en función de frecuencia angular para masa madre de chíá al principio (a) y final (b) de la fermentación.

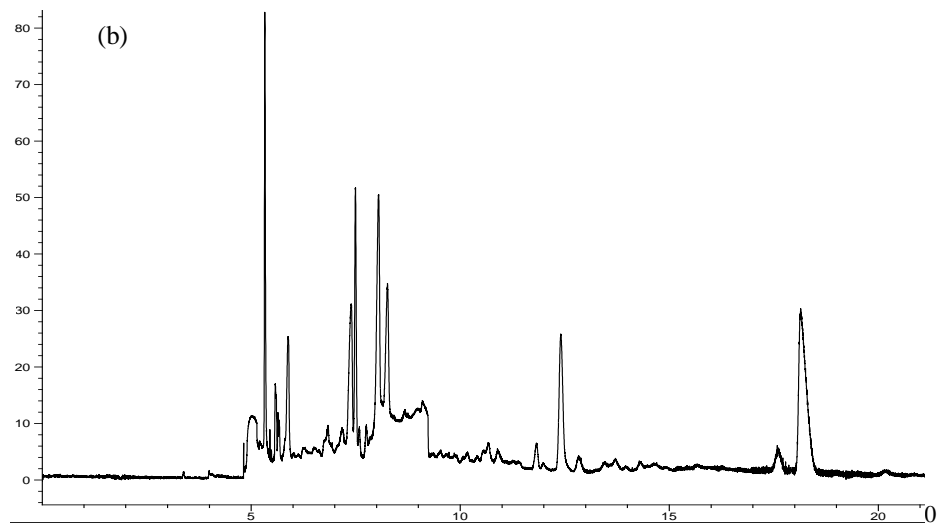
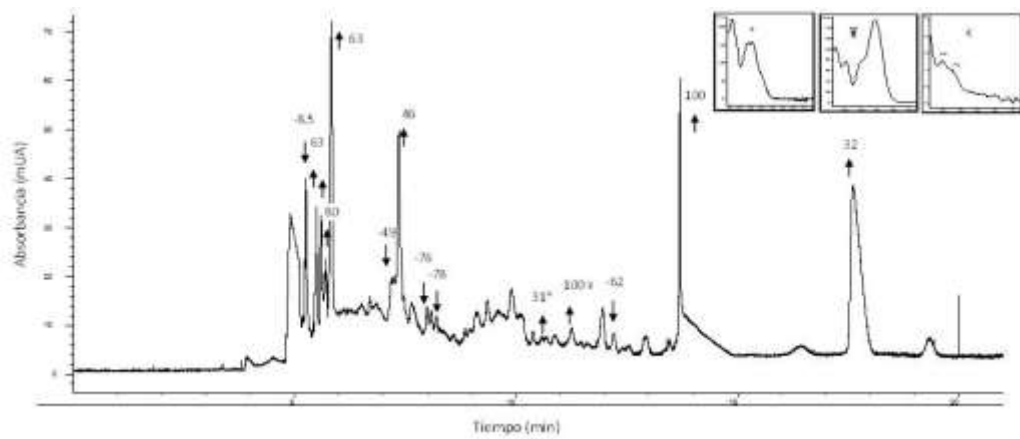


Figura 3. Electroferogramas de masa fermentada (a) y sin fermentar de chía (b). Cada flecha corresponde a los picos cuyas áreas fueron modificadas por efecto de la fermentación. * corresponde a ácido ferúlico, ¥ corresponde a ácido clorogénico y € corresponde a compuestos no identificados que sólo fueron detectados luego de la fermentación.

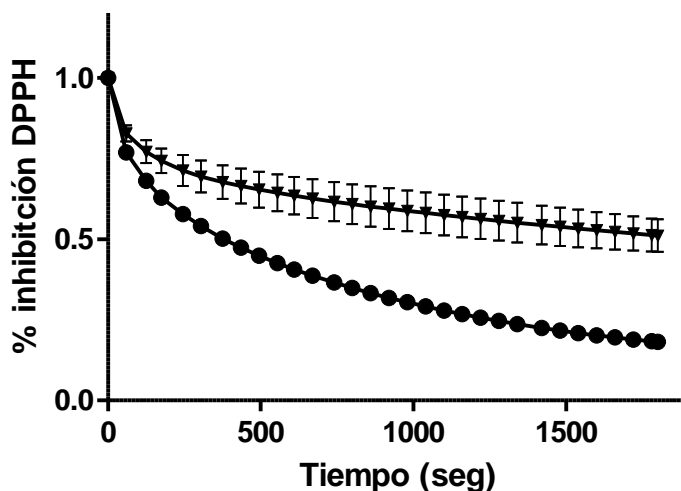


Figura 4. Ensayo de inhibición de DPPH para un extracto de masa ácida (3 mg/ml) a 0 h (círculos) y luego de 24 h de fermentación (triángulos).

CONCLUSIONES

En los últimos años, la harina de chía ha sido estudiada por sus características nutricionales y funcionales. En este estudio se caracterizó masa de chía fermentada por una cepa seleccionada de *L. plantarum*. Después de 24 h de fermentación se observó pérdida de consistencia y un aumento en el carácter viscoso. Además, la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante incrementaron mediante la fermentación láctica. Por último, el uso de esta masa madre chía mejoró características globales, incluidas las propiedades físicas y antioxidantes respecto del uso de harina de chía sin fermentar e incluso mejores que los observados en el pan tradicional de trigo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada con subsidios otorgados por la Universidad de San Pablo-T (IC-502), Universidad Nacional de Santiago del Estero y CONICET (PIO-CONICET 14520140100005CO) y Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT; PICT 393).

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. d. I. A., Aburto-Juarez, M. d. L., & Tecante, A. (2008). Chemical characterization of the lipid fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, 11(3), 687-697.

Banu, I., & Aprodu, I. (2012). Studies concerning the use of *Lactobacillus helveticus* and *Kluyveromyces marxianus* for rye sourdough fermentation. *European Food Research and Technology*, 234(5), 769-777.

Bartkiene, E., Juodeikiene, G., & Vidmantiene, D. (2012). Nutritional quality of fermented defatted soya and flaxseed flours and their effect on texture and sensory characteristics of wheat sourdough bread. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(6), 722-729.

Capitani, M. I., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2013). Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *Journal of Food and Agriculture*, 93(15), 3856-3862.

Clarke, C. I., Schober, T. J., Dockery, P., O'Sullivan, K., & Arendt, E. K. (2004). Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry*, 81(3), 409-417.

Coda, R., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2014). Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37, 51-58.

Coelho, M. S., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2015). Effects of substituting chia (*Salvia hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. *LWT-Food Science and technology*, 60(2), 729-736.

Curiel, J. A., Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2010). Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food

- phenolic acids. *Food Chemistry*, 120(1), 225-229.
- Church, F. C., Porter, D. H., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (1985). An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Analytical biochemistry*, 146(2), 343-348.
- Ezekiel, R., Singh, N., Sharma, S., & Kaur, A. (2013). Beneficial phytochemicals in potato—a review. *Food Research International*, 50(2), 487-496.
- Gerez, C., Torino, M., Obregozo, M., & Font de Valdez, G. (2010). A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. *Journal of Food Protection*, 73(4), 758-762.
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrøm, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(25), 6369-6375.
- Houben, A., Götz, H., Mitzscherling, M., & Becker, T. (2010). Modification of the rheological behavior of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) dough. *Journal of cereal science*, 51(3), 350-356.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 286-293.
- Katina, K. (2005). Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread: VTT.
- Katina, K., Liukkonen, K.-H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.-M., Lampi, A.-M., . . . Poutanen, K. (2007). Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of cereal science*, 46(3), 348-355.
- Mamhoud, A., Nionelli, L., Bouzaine, T., Hamdi, M., Gobbetti, M., & Rizzello, C. G. (2016). Selection of lactic acid bacteria isolated from Tunisian cereals and exploitation of the use as starters for sourdough fermentation. *International journal of food microbiology*.
- Moreira, R., Chenlo, F., & Torres, M. (2013). Effect of chia (*Sativa hispanica* L.) and hydrocolloids on the rheology of gluten-free doughs based on chestnut flour. *LWT-Food Science and technology*, 50(1), 160-166.
- Moroni, A. V., Dal Bello, F., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2011). Impact of sourdough on buckwheat flour, batter and bread: biochemical, rheological and textural insights. *Journal of cereal science*, 54(2), 195-202.
- Nionelli, L., Curri, N., Curiel, J. A., Di Cagno, R., Pontonio, E., Cavoski, I., . . . Rizzello, C. G. (2014). Exploitation of Albanian wheat cultivars: characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 44, 96-107.
- Pizarro, P. L., Almeida, E. L., Sammán, N. C., & Chang, Y. K. (2013). Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica* L.) flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. *LWT-Food Science and technology*, 54(1), 73-79.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656-663.
- Rizzello, C. G., Lorusso, A., Montemurro, M., & Gobbetti, M. (2016). Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology*, 56, 1-13.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., Gómez-Cordovés, C., . . . Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 132(2), 79-90.
- Steffolani, E., Martínez, M. M., León, A. E., & Gómez, M. (2015). Effect of pre-hydration of chia (*Salvia hispanica* L.), seeds and flour on the quality of wheat flour breads. *LWT-Food Science and technology*, 61(2), 401-406.
- Thiele, C., Gänzle, M., & Vogel, R. (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chemistry*, 79(1), 45-51.
- Zanini, V. P., de Mishima, B. L., & Solís, V. (2011). An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite-chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 155(1), 75-80.