

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**



**“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE ECOTIPOS DE TARWI  
(*Lupinus mutabilis* Sweet) PARA SU INCLUSIÓN  
EN UNA BEBIDA PROBIÓTICA”**

**Presentada por:**

**PAOLA MARLENE CORTÉS AVENDAÑO**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**Lima - Perú  
2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE ECOTIPOS DE TARWI  
(*Lupinus mutabilis* Sweet) PARA SU INCLUSIÓN  
EN UNA BEBIDA PROBIÓTICA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*Doctoris Philosophiae***

**Presentada por:**

**PAOLA MARLENE CORTÉS AVENDAÑO**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

-----  
Dr. Marcial Silva Jaimes  
**PRESIDENTE**

Ph.D. Ritva Repo Carrasco  
**ASESOR**

-----  
Ph.D. Patricia Glorio Paulet  
**CO- ASESOR**

-----  
Dra. Bettit Salvá Ruiz  
**MIEMBRO**

-----  
Dr. Milber Ureña Peralta  
**MIEMBRO**

-----  
Ph.D. Emilio Yabar Villanueva  
**MIEMBRO EXTERNO**

## AGRADECIMIENTOS

A la Ph.D. Ritva Repo de Carrasco por asesorar la presente investigación y las oportunidades brindadas para poder realizar este trabajo.

A la Ph.D. Patricia Glorio por co-asesorar la presente investigación y por su apoyo incondicional.

Al Ministerio de Educación (MINEDU) y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por otorgarme la beca integral para realizar los estudios de doctorado, bajo el convenio 000179-2015-FONDECYT.

Al proyecto Protein2Food (Horizonte 2020) por financiar parte de la investigación.

Al Proyecto PNIA de Investigación biotecnológica de la cadena productiva del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) del programa de Leguminosas de la UNALM, por financiar parte de la investigación.

A los profesores de la Universidad de Turku y de la UNALM: Jukka-Pekka, Baoru Yang, Ye Tiam, Marko Tarvainen y Victor Delgado por su apoyo para el desarrollo de la parte experimental de la caracterización de la materia prima.

Al Dr. Felix Camarena y a la Mg.Sc. Elvia mostaceros por su apoyo en la obtención de la materia prima.

Al Dr. Gabriel Vinderola por su apoyo en el desarrollo de la bebida probiótica

Al Dr. Luis Condezo Hoyos por la revisión crítica del documento y su orientación científica.

A los miembros del jurado, Dr. Marcial Silva, Dr. Milber Ureña, Dra. Bettit Salvá, Ph.D. Emilio Yavar, por sus sugerencias y comentarios a la presente investigación.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
	2.1. LUPINO.....	3
	2.1.1. <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	4
	a. Composición química proximal.....	5
	b. Metabolitos secundarios.....	6
	2.2. LECHE DE VEGETAL.....	7
	2.3. PRODUCTOS FERMENTADOS NO PROBIÓTICOS.....	8
	2.4. BEBIDAS PROBIÓTICAS NO LÁCTEAS.....	8
	2.5. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).....	10
	2.6. PROBIÓTICOS.....	11
	2.6.1. Mecanismo de acción de los probióticos.....	14
	2.6.2. Bacterias probióticas.....	16
	a. <i>Lactobacillus Plantarum</i> 299v (Lp 299v).....	17
	b. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG).....	19
	2.6.3. Factores que afectan la viabilidad de los probióticos.....	19
	2.7. PREBIÓTICOS.....	20
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
	3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	23
	3.2. MATERIA PRIMA.....	23
	3.3. MATERIALES, EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS.....	24
	3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	26
	3.4.1. Caracterización físico-química de las semillas de lupino.....	26
	a. Composición químico proximal.....	26
	b. Determinación del tamaño de las semillas de lupino.....	26
	c. Determinación de pH y acidez titulable.....	26
	d. Determinación de metabolitos secundarios.....	27
	3.4.2. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	30
	3.4.3. Recuento de células viables.....	30
	3.4.4. Análisis reológico.....	31
	3.4.5. Evaluación sensorial de la bebida.....	31
	3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	31
	3.5.1. Tratamiento de las semillas sin desamargar.....	31
	3.5.2. Desamargado de las semillas de lupino.....	32
	3.5.3. Elaboración de la bebida.....	33
	a. Preparación del cultivo iniciador y propagación.....	33
	b. Procedimiento para la obtención de la bebida probiótica.....	34
	3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
	3.6.1. Diseño experimental.....	37
	a. Caracterización físico-química de las semillas de lupino: Etapa I....	37

b.	Optimizar los factores de formulación de la bebida probiótica :	
Etapa II.....		37
c.	Caracterización y estabilidad de la bebida probiótica.....	40
3.6.2.	Análisis estadístico.....	42
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
4.1.	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS SEMILLAS DE LUPINO.....	43
4.1.1.	Caracterización fisicoquímica de la materia prima.....	43
4.1.2.	Metabolitos secundarios.....	47
a.	Identificación y cuantificación de alcaloides en semillas sin desamargar y desamargadas.....	47
b.	Identificación y cuantificación de isoflavonas y flavonas en semillas sin desamargar y desamargadas.....	55
4.2.	SELECCIÓN DEL ECOTIPO PARA LA ELABORACIÓN DE LA BEBIDA.....	64
4.3.	IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES SIGNIFICATIVOS EN LA ELABORACIÓN DE LA BEBIDA.....	65
4.4.	DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE LA BEBIDA EN FUNCIÓN DEL pH.....	68
4.5.	DETERMINACIÓN DEL FATOR DE DILUCIÓN PARA <i>L. plantarum</i> 299v.....	70
4.6.	OPTIMIZACIÓN DE LOS FACTORES DE FORMULACIÓN DE LA BEBIDA PROBIÓTICA.....	72
4.6.1.	Efecto de los factores sobre la tasa de crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v.....	73
4.6.2.	Efecto de los factores sobre el pH.....	76
4.6.3.	Validación del modelo.....	78
4.7.	CARACTERÍSTICAS DE LA BEBIDA PROBIÓTICA ÓPTIMA.....	79
4.7.1.	Evaluación sensorial de la bebida.....	81
4.7.2.	Estabilidad durante el almacenamiento de la bebida probiótica.....	82
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b>	Clasificación taxonómica del tarwi.....	4
<b>Cuadro 2:</b>	Comparación de la composición del lupino ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) y soya (g/100 g).....	5
<b>Cuadro 3:</b>	Descripciones y definiciones de probióticos comúnmente citadas a lo largo de los años.....	12
<b>Cuadro 4:</b>	Bacterias probióticas.....	16
<b>Cuadro 5:</b>	Especies de <i>Lactobacillus</i> seleccionados por el modo de fermentación de azúcares.....	17
<b>Cuadro 6:</b>	Factores y niveles en el diseño Taguchi $L_8(2^7)$ .....	37
<b>Cuadro 7:</b>	Tratamientos generados por la metodología Taguchi.....	38
<b>Cuadro 8:</b>	Niveles mínimos y máximos de los factores para la optimización de la bebida .....	40
<b>Cuadro 9:</b>	Diseño empleado para la optimización por el método de Superficie Respuesta.....	40
<b>Cuadro 10:</b>	Composición químico proximal de 10 ecotipos de lupinos ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) sin desamargar (100 % b.s).....	44
<b>Cuadro 11:</b>	Análisis de proteína de 10 ecotipos de lupinos ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) desamargados (100 % b.s.).....	45
<b>Cuadro 12:</b>	Perfil de alcaloides en los ecotipos y parámetro de lipofilia (Log P) .....	48
<b>Cuadro 13:</b>	Alcaloides en semillas de lupino ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) sin desamargar y desamargadas, determinadas por CG- FID (g/100 g b.s).....	50
<b>Cuadro 14:</b>	Efecto del método de extracción y el tipo de solvente en el contenido de compuestos fenólicos totales EAG (mg/100 g) de semillas sin desamargar .....	57
<b>Cuadro 15:</b>	Identificación de isoflavonas y flavonas en 10 ecotipos de lupino ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet), por UPLC-DAD-MS <sup>2</sup> .....	61
<b>Cuadro 16:</b>	Longitud de onda y rectas de calibración para la cuantificación de flavonas e isoflavonas .....	62
<b>Cuadro 17:</b>	Isoflavonas y flavonas en los ecotipos de lupino ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) sin desamargar y desamargados.....	63
<b>Cuadro 18:</b>	Tratamientos según diseño experimental Taguchi $L_8 (2^7)$ y tasa de crecimiento de bacterias probióticas.....	66
<b>Cuadro 19:</b>	Niveles con mayor crecimiento de bacterias probióticas con descenso de pH (4.5) en la bebida fermentada según Taguchi.....	68
<b>Cuadro 20:</b>	Valores experimentales y predichos de la tasa de crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v.....	72
<b>Cuadro 21:</b>	Análisis de varianza y análisis de regresión para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v.....	73
<b>Cuadro 22:</b>	Análisis de varianza y regresión para el pH .....	77
<b>Cuadro 23:</b>	Condición óptima recomendado por el modelo de segundo orden, respuesta estimada y experimental.....	78
<b>Cuadro 24:</b>	Características fisicoquímicas de la bebida fermentada y semillas de lupino.....	80
<b>Cuadro 25:</b>	Características físico-químicas y reológicas de la bebida fermentada.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Morfología del tarwi ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet).....	5
<b>Figura 2:</b>	Esquema generalizado para la fermentación de glucosa en bacterias ácido lácticas.....	11
<b>Figura 3:</b>	Efectos benéficos de los probióticos sobre la salud humana.....	13
<b>Figura 4:</b>	Mecanismos de acción de los probióticos.....	15
<b>Figura 5:</b>	Ruta de cambios metabólicos primarios en <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	18
<b>Figura 6:</b>	Factores que afectan la viabilidad de los probióticos en productos alimenticios (durante el procesamiento y almacenamiento), así como en el tracto gastrointestinal (GIT).....	20
<b>Figura 7:</b>	Prebiótico en alimentos .....	21
<b>Figura 8:</b>	Ecotipos de lupino ( <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet) de diferentes regiones del Perú.....	24
<b>Figura 9:</b>	Proceso de desamargado de las semillas de lupino.....	33
<b>Figura 10:</b>	Diagrama de flujo para la elaboración de la bebida.....	36
<b>Figura 11:</b>	Diseño experimental para la obtención de la bebida probiótica de lupino.....	41
<b>Figura 12:</b>	Semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> S. Ecotipo Altagracia: A) semillas sin desamargar hidratar, B) semillas desamargadas. ....	46
<b>Figura 13:</b>	Micrografía de la semilla sin desamargar: A) Cotiledón (34x), a: Hilum; B) Ampliación del cotiledón (1200x); C) Cáscara (34x); D) Ampliación de cáscara (280x). ....	47
<b>Figura 14:</b>	Alcaloides totales. (a) Antes del proceso de desamargado; (b) después del proceso de desamargado. Las barras representan la desviación estándar de tres réplicas independientes.....	52
<b>Figura 15:</b>	Proyección de ecotipos de lupino y cargas por alcaloides en el plano compuesto por componentes principales PC1 y PC2 que explican el 73,6% de la varianza total.....	54
<b>Figura 16:</b>	Cromatograma LC de isoflavonas y flavonas en ecotipos de lupino: a. Sin desamargar; b. Desamargado. El número de picos se detalla en el Cuadro 15.....	59
<b>Figura 17:</b>	Valores señal/ruido (ETA) de cada factor evaluado en la tasa de crecimiento de bacterias probióticas aplicando Taguchi $L_8 (2^7)$ .....	67
<b>Figura 18:</b>	Cinética de cambio de pH en la bebida fermentada: A) 18 horas de fermentación, B) 12 horas de fermentación.....	69
<b>Figura 19:</b>	Factor de dilución para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v .....	71
<b>Figura 20:</b>	Valores predichos y experimentales de la tasa de crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v.....	74
<b>Figura 21:</b>	Superficie de respuesta estimada para la tasa de crecimiento de <i>L. plantarum</i> 299v.....	75
<b>Figura 22:</b>	Superficie de respuesta estimada para pH del medio fermentación.....	78
<b>Figura 23:</b>	Evaluación de aceptabilidad general de la bebida fermentada, cada punto medido representa el promedio de 5 jueces evaluados.....	82
<b>Figura 24:</b>	Viabilidad de <i>L. plantarum</i> 299v durante el almacenamiento.....	84
<b>Figura 25:</b>	Micrografía de la bebida de lupino: A) Antes de fermentar (500x), B) Después de fermentar (250x) y C) Viabilidad de <i>L. plantarum</i> 299v después de fermentar (4000x) .....	86

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b>	Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales.....	112
<b>Anexo 2:</b>	Información del compuesto 20 (aglicona de isoflavona desconocida). a. Absorción UV, b. Espectro de masas (MS) a modo negativo, c. Espectro de masas (MS) a modo positivo, d. Scanner del producto de 301 ([M+H] <sup>+</sup> , m/z).....	113
<b>Anexo 3:</b>	Información del compuesto 21 (aglicona de flavona desconocida). a. Absorción UV, b. Espectro de masas (MS) a modo negativo, c. Espectro de masas (MS) a modo positivo, d. Scanner del producto de 301 ([M+H] <sup>+</sup> , m/z).....	114
<b>Anexo 4:</b>	Análisis de varianza del diseño experimental Taguchi L <sub>8</sub> (2 <sup>7</sup> ).....	115

## RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue realizar la caracterización funcional de ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) para su inclusión en una bebida probiótica. En la primera etapa se realizó la caracterización física y química de diez ecotipos de lupino sin desamargar y desamargados, eligiendo al mejor ecotipo para la elaboración de la bebida probiótica. En la segunda etapa, se optimizó la formulación de la bebida probiótica en función a la viabilidad de los probióticos y el pH. En la tercera etapa, se caracterizó y evaluó la estabilidad de la bebida probiótica óptima. En las semillas sin desamargar se identificaron 8 alcaloides, principalmente lupanina (2.5-5.2 g/100g) y esparteína (0.2-0.9g /100g), que constituyeron el 80% del total de alcaloides. En las semillas desamargadas se identificaron sólo lupanina (0.0012 g/100g) y esparteína (0.0014 g/100g). El contenido de isoflavonas y flavonas en las semillas sin desamargar fue 185.3 mg/100g y 40 mg/100g, respectivamente y en las semillas desamargadas 148 mg de genisteína /100 g y 17 mg de apigenina /100g, respectivamente. El ecotipo seleccionado para la elaboración de la bebida fue Altagracia por su contenido de proteínas, alcaloides, isoflavonas y flavonas, y el probiótico elegido fue *Lactobacillus plantarum* 299v, en función a la reducción de pH. La bebida probiótica óptima (8% de azúcar y 31.5% de lupino: agua, 2% de inulina, 0.8% de CMC, 1% de glucosa) fermentada durante 12 h con *L. plantarum* 299v mostró una tasa de crecimiento de 30.63% ( $13 \times 10^8$  UFC/ml) y buena aceptabilidad general ( $5.4 \pm 2.4$ ). Durante el almacenamiento, disminuyó la viabilidad del probiótico ( $57 \times 10^7$  UFC/ml), la viscosidad (534.4 cP) y el pH (3.85) y se incrementó de la acidez titulable. Las semillas de lupino, por sus características nutricionales, es una buena matriz vegetal para el crecimiento de las bacterias probióticas.

**Palabras claves:** Lupino, alcaloides, desamargado, fermentación, probiótico.

## ABSTRACT

The aim of the research work was to perform the functional characterization of tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) ecotypes for inclusion in a probiotic drink. In the first stage, the physical and chemical characterization of ten lupine ecotypes was carried out without debittering and debittering. Then the ecotype was selected for the preparation of the probiotic drink. In the second stage, the formulation of the probiotic drink was optimized based on the viability of the probiotics and the pH. In the third stage, the optimal probiotic drink was characterized and stability evaluated. In the seeds without debittering, 8 alkaloids were identified, mainly lupanine (2.5-5.2 g / 100 g) and sparteine (0.2-0.9 g / 100 g), which constituted 80% of the total alkaloids. Only lupanine (0.0012 g / 100 g) and sparteine (0.0014 g / 100 g) were identified in the debittered seeds. The content of isoflavones and flavones were: in the seeds without debittering 185.3 mg / 100 g and 40 mg / 100 g, respectively and in the debittering seeds 148 mg of genistein / 100 g and 17 mg of apigenin / 100 g, respectively. The ecotype selected for the preparation of the drink was Altagracia due to its content of proteins, alkaloids, isoflavones and flavones, and the probiotic chosen was *Lactobacillus plantarum* 299v, based on the reduction in pH. The optimal probiotic drink (8% sugar and 31.5% lupine: water, 2% inulin, 0.8% CMC, 1% glucose) fermented for 12 h with *Lactobacillus plantarum* 299v showed a growth rate of 30.63% ( $13 \times 10^8$  CFU / ml) and good general acceptability ( $5.4 \pm 2.4$ ). During storage, the viability of the probiotic ( $57 \times 10^7$  CFU / ml), the viscosity (534.4 cP) and the pH (3.85) decreased and the titratable acidity increased. Lupine seeds, due to their nutritional characteristics, are a good plant matrix for the growth of probiotic bacteria.

**Keywords:** Lupine, alkaloids, debittering, fermentation, probiotic.

## I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos probióticos representan uno de los sectores más grandes en los mercados de alimentos funcionales (Buruleanu *et al.* 2013). La creciente conciencia sobre la mejora de la salud intestinal y la eficiencia de las bacterias probióticas son responsables del desarrollo del mercado mundial de probióticos (Sayedboworn *et al.* 2017), que se espera que crezca de USD 243.9 millones en 2019 a USD 292.2 millones en el 2025 (MarketResearch.com). El consumo de bebidas y alimentos que contienen bacterias probióticas es una tendencia cada vez mayor en todo el mundo (Granato *et al.* 2010). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO y OMS 2002), los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios a la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas (Hill *et al.* 2014). La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Streptococcus lactis* (Yoon *et al.* 2004).

Diferentes investigaciones han demostrado que la adición de probióticos a los alimentos reducen el nivel de colesterol, mejoran la función gastrointestinal y el sistema inmune, y disminuyen el riesgo de cáncer de colon (Rafter 2003). Las bebidas lácteas se consideran una excelente forma de administrar probióticos, siendo los más comunes el yogurt, la leche fermentada y la leche fresca (Gürakan *et al.* 2009). Sin embargo, los principales inconvenientes para los productos lácteos son la tendencia actual del vegetarianismo, el nivel de colesterol y la creciente prevalencia de la intolerancia a la lactosa (Coda *et al.* 2012). Aproximadamente el 70% de la población mundial sufre de intolerancia a la lactosa, en países asiáticos es casi el 100%, en África y América del sur es aproximadamente 50%, en el Reino Unido el 5% y en Finlandia y el norte de Francia el 17% (Nazir *et al.* 2019). Este contexto ha llevado al desarrollo de productos probióticos en matrices alimentarias no lácteas, incluyendo frutas, cereales y leguminosas (Champagne *et al.* 2008). Según MarketResearch.com (2020), el mercado de alternativas lácteas crecerá de USD 12.6 mil millones en el 2020 a USD 18.8 mil millones en el 2025, a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 10.5% en el periodo pronosticado.

Esto se atribuye a los beneficios nutricionales que ofrecen las alternativas lácteas de origen vegetal, dentro de ellas las leguminosas son un componente importante en la dieta tradicional de muchas regiones del mundo y constituyen una excelente fuente de proteínas, así como de otros macro y micronutrientes (Feyza *et al.* 2020). Una de las leguminosas más representativas de los andes de América del sur es la especie *Lupinus mutabilis* Sweet, planta comúnmente conocida como ullush, talwish, tauri, tarwi, chocho, lupino o ccquilla (Jacobsen y Mujica 2006), reconocida como un grano altamente nutritivo que proporciona una cantidad relativamente alta de proteínas en comparación con las legumbres tradicionales, así como ácidos grasos esenciales y fibra dietética (Carvajal *et al.* 2016). Además, las semillas de lupino (tarwi) contienen metabolitos secundarios como polifenoles, carotenoides, alcaloides y fitoesteroles con posibles actividades antimutagénicas, anticancerígenas e hipocolesterolémicas (Ruiz-López *et al.* 2019).

La elección de la matriz alimentaria es una parte clave para mantener la viabilidad de los probióticos en el producto final (Oliveira *et al.* 2017 ). Las legumbres pueden constituir matrices desafiantes y sus efectos sobre la viabilidad de los probióticos merecen ser investigados, ya que compuestos bioactivos comúnmente presentes pueden exhibir propiedades antimicrobianas o prebióticas. En este contexto, el objetivo general del trabajo de investigación fue realizar la caracterización funcional de ecotipos de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) para su inclusión en una bebida probiótica, con el fin de mejorar el valor nutricional, las propiedades sensoriales y cualidades funcionales del lupino: Para ello se planteó los siguientes objetivos específicos:

- a. Caracterizar físico y química proximal en diez ecotipos de lupino sin desamargar y desamargados.
- b. Identificar y cuantificar el contenido de alcaloides y flavonoides (Isoflavonas y flavonas) en diez ecotipos de lupino sin desamargar y desamargados.
- c. Seleccionar el ecotipo apropiado para la bebida probiótica en base al contenido de alcaloides, proteína y flavonoides.
- d. Optimizar los factores de formulación de la bebida probiótica.
- e. Caracterizar y evaluar la estabilidad de la bebida probiótica óptima.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. LUPINO

El género *Lupinus* es miembro de la familia Fabácea. Entre las legumbres, los lupinos o altramuces, se caracterizan por su contenido de proteínas de alta calidad e idoneidad para una producción sostenible y posibles beneficios para la salud. Oceanía y Eurasia contribuyen con más del 90 % de la producción mundial de lupino con 1.3 toneladas métricas anuales, seguidos por los países de África (5-7 %), América del Sur, Norte y Centroamérica (3-5 %) (Lucas *et al.* 2015 ). Existen más de 450 especies de lupinos, de los cuales cuatro son de interés agrícola comercial: Lupino blanco (*Lupinus albus*), lupino amarillo (*Lupinus luteus*), lupino azul o de hojas estrechas (*Lupinus angustifolia*), y lupinos perla (*Lupinus mutabilis*) (Jappe y Vieths 2010). Las tres primeras son nativas de Europa y representan la mayoría de lupinos cultivados en el mundo, pertenecen a los lupinos dulces, se cultivan y usan como alimento y en la alimentación de animales. La cuarta especie mencionada, *L. mutabilis*, es una especie nativa de los Andes, y se cultiva sólo en algunas partes de América del Sur y aún no está disponible comercialmente en Europa (Lucas *et al.* 2015 ).

En el mercado de alimentos, los lupinos son cada vez más utilizados debido a su valor nutricional y propiedades tecnofuncionales y son considerados como posibles sustitutos de la soya genéticamente modificada. El consumo de lupino también se ha asociado con efectos beneficiosos para la salud, tales como la prevención de la obesidad, hipertensión, insulina resistente, colesterol elevado en la sangre y las enfermedades cardiovasculares (Güemes *et al.* 2008; Hodgson y Lee 2008; Jiménez-Martínez *et al.* 2003b). Así, se ha reportado que los lupinos se utilizan como ingredientes en diferentes alimentos tales como requesón, tofu, salsas, embutidos, escalope Vienés, untados, pasta, sucedáneos del café, mezclas sin gluten para hornear, y todo tipo de productos de panadería.

### 2.1.1. *Lupinus mutabilis* Sweet

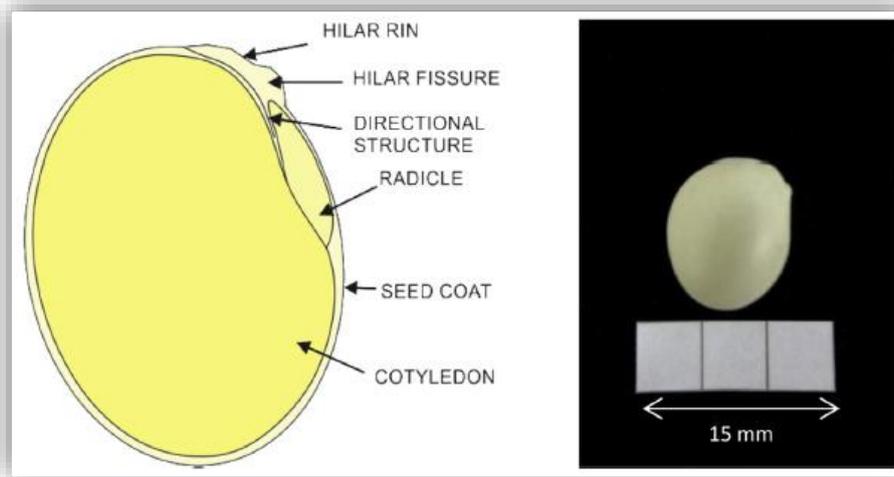
Lupino andino, más conocido como Chocho en el norte de Perú y Ecuador, tarwi en el centro del Perú y tauri en el sur del Perú y Bolivia (chuchus en Cochabamba, Bolivia) (Cuadro 1) (Jacobsen y Mujica 2006). En la actualidad el país con mayor producción es Chile con 45453 TM, seguido por Perú con 16481 TM y Ecuador con 1322 TM (FAOSTAT, 2020). El lupino andino se considera uno de los cultivos perdidos de los incas, es ampliamente usado por la población local como alimento y medicina natural (Jacobsen y Mujica 2006).

**Cuadro 1: Clasificación taxonómica del Tarwi**

Nombre Común	Tarwi, Chocho, tauri
Nombre Científico	<i>Lupinus mutabilis</i>
División	Espermatofitos
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Rosales
Familia	Fabaceae
Género	Lupinus
Especie	<i>Lupinus mutabilis</i>

**FUENTE:** Zamora (2002)

El fruto es de forma elíptica u oblonda, aguda en ambos extremos con cerca de 120 vainas por planta, en ellas se encuentran las semillas que pueden variar en número y pueden ser de forma redonda u ovalada, lenticulares, de 5-15 mm de largo y 6-8 mm de ancho, de color variable, (blancas, marrones o negras) y tienen un diámetro aproximado de 1 cm. El tegumento que cubre la semilla es de forma dura y debe permeabilizarse para permitir la salida de los alcaloides (Figura 1).



**Figura 1:** Morfología del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).

**FUENTE:** Miano *et al.* (2015).

**a. Composición química proximal**

Las semillas de *Lupinus mutabilis* es conocida por su gran valor nutritivo comparado a otras especies (Cuadro 2), presenta un alto contenido de proteína y grasa, que excede el de cualquier otra especie de lupino (Carvajal-Larenas *et al.* 2016). Además, las semillas de lupino están prácticamente desprovistas de almidón, los principales carbohidratos encontrados son oligosacáridos (principalmente estaquiosa y rafinosa) y polisacáridos de almacenamiento de la pared celular (Trugo *et al.* 2003 ).

**Cuadro 2: Comparación de la composición del lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) y soya (g/100 g)**

Componente	Lupino	Soya
Proteína	44,3	33,4
Grasa	16,5	16,4
Carbohidratos	28,2	35,5
Fibra	7,1	5,7
Ceniza	3,3	5,5
Humedad	7,7	9,2

**FUENTE:** Jacobsen y Mujica (2006).

## **b. Metabolitos secundarios**

### **• Alcaloides**

Los alcaloides de quinolizidina (AQ) como la esparteína, la lupanina o angustifolina son metabolitos secundarios presentes principalmente en la familia de las *Leguminosae* y pueden encontrarse también en el género *Lupinus* (Frick *et al.* 2018). Los AQ, son compuestos químicos de defensa contra los insectos y otros herbívoros, su ingesta en altas concentraciones produce intoxicaciones en mamíferos, convulsiones, temblores, y muerte por paro respiratorio y cardíaco. Los AQ modulan los receptores de acetil colina (nicotínico como muscarínico), algunos inhiben los canales de sodio y posiblemente pueden conducir a degeneraciones neuronales (Ganzera *et al.* 2010). Los estudios preliminares sobre su toxicidad sugieren que la dosis letal aguda tal como está presente en las semillas de lupino es de 10 mg/kg de peso corporal (p.c) para lactantes y 25 mg/kg de p.c en adultos (Carvajal-Larenas *et al.* 2016). Aunque los alcaloides pueden ser tóxicos cuando se ingieren a altas concentraciones, se han descrito varias propiedades biológicas, como antimutagénico, antibacteriano, antifúngico y anticancerígeno (Khan *et al.* 2015). El límite de seguridad establecido por las autoridades sanitarias de Reino Unido, Francia, Australia y Nueva Zelanda para la cantidad total de alcaloides en harinas de lupino y productos derivados es de 0,2 g/kg de materia seca (Magalhães *et al.* 2017). Los alcaloides se sintetizan en el estroma de los cloroplastos de las hojas, regulada por la luz. Luego se transportan a través del floema y se almacenan en las vacuolas de todos los órganos de la planta, preferentemente en los tejidos epidérmicos y subepidérmicos de tallos y hojas. Las semillas son especialmente ricas en alcaloides (5 % peso seco), representando alrededor del 8-10 % del nitrógeno (de Cortés *et al.* 2005).

### **• Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios bioactivos ampliamente distribuidos en todas las plantas superiores que se sintetizan principalmente por las vías de ácido shikímico, fosfato de pentosa y fenilpropanoide (Singh *et al.* 2017). Las semillas de lupino contienen cantidades significativas de fitoquímicos con potencial para promover la salud tales como los compuestos fenólicos, fitoesteroles, tocoferoles y escualeno. La mayoría de los compuestos fenólicos identificados en las especies de lupino pertenecen a las subclases de isoflavonas y flavonas (Khan *et al.* 2015). Las isoflavonas pertenecen al grupo de los flavonoides (Ranilla *et al.* 2009), se producen naturalmente en forma de glucósidos (como

daidzina, glicitina y genistina), estas formas naturales no se absorben fácilmente, pero se convierten en formas desconjugadas (por ejemplo, daidzeína, genisteína, gliciteína) por la acción de las enzimas hidrolíticas producidas por la microflora intestinal, mejorando en el tracto gastrointestinal (GIT) (Duru *et al.* 2019 ). Las isoflavonas se han asociado con efectos beneficiosos en los seres humanos, como la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síntomas menopáusicos, las isoflavonas son fitoestrógenos no esteroideos; sin embargo, debido a la presencia de anillos fenólicos, y particularmente el 4-hidroxilo, tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos, al igual que muchas sustancias, incluidos los anti estrógenos como el tamoxifeno que se usa con éxito para tratar el cáncer de mama (Ranilla *et al.* 2009). A pesar de los enormes beneficios para la salud asociados con la ingesta de isoflavonas, existen diferentes hallazgos contradictorios que han sido reportados por diferentes autores (Andrade *et al.* 2015). La dosis diaria ingerida no tóxica de isoflavonas en humanos sigue siendo un tema discutible, 39-47 mg/día se considera seguro entre la población japonesa (Duru *et al.* 2019 ). Por otro lado, las principales flavonas identificadas en los lupinos son agliconas y/o glucósidos de luteolin, apigenin y disometin (Khan *et al.* 2015), son considerados buenos antioxidantes porque tienen la habilidad de atrapar el oxígeno singlete.

## **2.2. LECHE VEGETAL**

### **2.2.1. Definición**

La leche vegetal es una alternativa a la leche animal y se prepara por extracción acuosa a partir de un material vegetal (cereales, pseudocereales, legumbres, semillas oleaginosas, nueces) previamente molido. El extracto acuoso es homogenizado para obtener distribuciones de tamaño de partícula en un rango de 5-20  $\mu\text{m}$  que imitan la apariencia y consistencia de la leche de vaca (Sethi *et al.* 2016).

### **2.2.2. Clasificación**

Sethi *et al.* (2016), clasifica las leches vegetales en cinco categorías:

- a. A base de cereales: Leche de avena, leche de arroz, leche de maíz, leche de espelta.
- b. A base de legumbres: Leche de soja, leche de maní, leche de altramuza/lupino, leche de caupí.

- c. A base de frutos secos: Leche de almendras, leche de coco, leche de avellanas, leche de pistacho, leche de nueces.
- d. A base de semillas: Leche de sésamo, leche de lino, leche de cáñamo, leche de girasol.
- e. A base de pseudocereales: Leche de quinua, leche de teff, leche de amaranto.

### **2.3. PRODUCTOS FERMENTADOS NO PROBIÓTICOS**

Son aquellos productos de fermentación alimentaria con cualquier microorganismo. Por lo tanto "Contiene cultivos vivos y activos", los términos "vivo" o "activo" no implican actividad probiótica. La prueba de viabilidad a un nivel mínimo que refleje los niveles típicos observados en los alimentos fermentados, se sugiere que sea  $1 \times 10^9$  UFC por porción (Bertazzoni *et al.* 2013). Los alimentos fermentados que contienen cultivos vivos también podrían calificar como 'probióticos' si cumplen los criterios para esa categoría, por ejemplo, la evidencia de que el yogur puede mejorar la digestión de lactosa en los maldigeridos de lactosa lo calificaría como 'probiótico' (Guarner *et al.* 2005).

### **2.4. BEBIDAS PROBIÓTICAS NO LÁCTEAS**

Estudios de la Organización Mundial de la Salud han demostrado que el estado de salud de las personas depende en gran medida de la nutrición (Lampart *et al.* 2003). En este contexto los alimentos funcionales son aquellos alimentos o componentes alimentarios que son científicamente reconocidos por tener beneficios fisiológicos más allá de los de la nutrición básica (Gibson y Williams 2000). Hoy en día, una amplia gama de productos probióticos está disponible en el mercado (Halliwell 2002; Jiménez-Martínez *et al.* 2003a; Hilliam 2004). Dentro de ellos las bebidas probióticas no lácteas son una gran alternativa para las bebidas lácteas. Estas bebidas están basadas en jugos de frutas, productos de cereales y leguminosas como por ejemplo semillas de lupino y soja. El consumo de estos productos se viene incrementado debido a que las bebidas fermentadas constituyen una parte importante de la dieta humana y a la vez mediante el proceso de fermentación incrementan su vida útil, mejoran su valor nutricional, y sus propiedades sensoriales (Barbaros y Huseyin 2010). Debido a ello los mercados de bebidas probióticas son cada vez más competitivos (Sorenson y Bogue 2005).

Anteriormente, los beneficios para la salud de los probióticos se lograban con la leche u otros productos lácteos; sin embargo, la intolerancia a la lactosa, el contenido de colesterol y las proteínas alergénicas de la leche son factores limitantes en el crecimiento del mercado de los probióticos lácteos (Yoon *et al.* 2004). La intolerancia a la lactosa es generada por la ausencia de producción por el cepillo intestinal de la enzima lactasa, las cuales hidrolizan la lactosa en azúcares absorbibles (glucosa y galactosa) proporcionando energía al organismo. La lactosa es el primer carbohidrato crucial en la promoción de la salud para promover la salud del recién nacido durante el período posnatal, la actividad de la lactasa intestinal es máxima entre la mayoría de los lactantes (Panghal *et al.* 2018). Los probióticos ayudan a liberar la  $\beta$ -galactosidasa en el intestino delgado que ayuda a la digestión y descomposición de la lactosa.

Por lo tanto, la ingesta de probióticos puede disminuir la intolerancia a la lactosa, pero la efectividad depende del número de células en el producto y la cantidad de lactosa presente. El aumento de los consumidores vegetarianos en los países desarrollados y en desarrollo, de los productos probióticos a base de plantas se ha incrementado significativamente. Los productos lácteos con alto contenido de colesterol, el número significativo de personas intolerantes a la lactosa lo sufre el 75% de la población mundial (Silanikove, Leitner y Merin 2015) y razones económicas de los países en desarrollo han generado la necesidad de buscar alternativas no lácteas nutritivos y que promuevan la salud, tales como frutas, verduras, cereales y legumbres (Panghal *et al.* 2017).

En particular, los cereales y las leguminosas son los sustratos más adecuados para el desarrollo de alimentos que contienen probióticos (Lamsal y Faubion 2009). Los cereales y las legumbres son una buena fuente de vitaminas, minerales, proteínas, carbohidratos, fibra y oligosacáridos. Los productos alimenticios probióticos a base de cereales y legumbres se pueden preparar usando sorgo, harina de mijo, maíz, malta de mijo, harina de trigo, mijo, soja, arroz y avena, ya sea solos o en diferentes combinaciones (Panghal *et al.* 2018). Por ejemplo, el primer alimento probiótico libre de leche o componentes de la leche fue formulado y fabricado en 1994 por Skane Dairy con la marca ProViva en Suecia. La papilla a base de harina de avena fue fermentada con las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* 299v/L y se añadió cebada malteada para mejorar la licuefacción. La papilla de avena fermentada se mezcló con diferentes bebidas de frutas, como grosella negra, fresa, arándano, escaramujo o cualquier fruta tropical en una concentración del 5% para

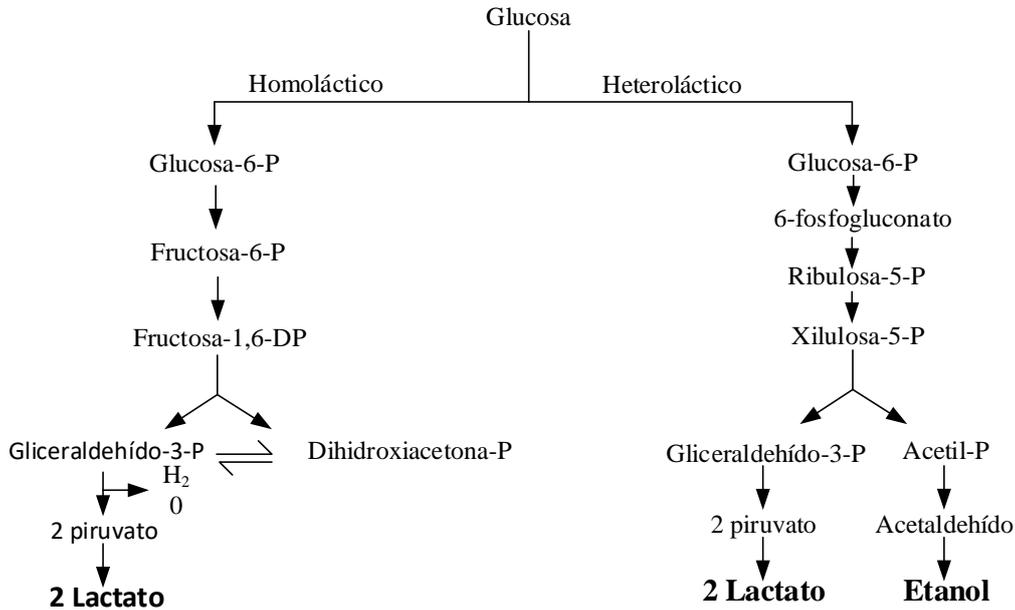
proporcionar un sabor afrutado. Las bacterias fueron resistentes a pH < 2.8–3.4 permaneciendo viables durante más de un mes en almacenamiento refrigerado ( $\sim 5 \times 10^{10}$  UFC/L) (Panghal *et al.* 2018). Por otro lado, se investigó la cuajada de frijol formada por varios extractos de proteínas de legumbres, incluyendo lentejas, frijol mungo, garbanzos, guisantes lisos, guisantes y frijoles alados (Cai *et al.* 2001). Además, las bebidas probióticas no lácteas desarrolladas a partir de trigo germinado, cebada y mijo perla tienen un número de células viables de *L. acidophilus* NCD14 en el rango de 10.36–11.51 log UFC/ml y 10.36–11.17 log UFC/ml (Mridula y Sharma 2015). Así mismo, Santos *et al.* (2014) desarrollaron una bebida de leche de cacahuete como nuevo sustrato para cepas probióticas *L. acidophilus* (LACA 4) y *Pediococcus acidilactici* (UFLA BFFCX 27.1) con una población celular superior a 8 log UFC/ml.

## 2.5. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Bacterias ácido lácticas son gram-positivas, no forman esporas y son catalasa negativa, no presentan citocromo (Holzapfel *et al.* 2001). Estas bacterias prefieren la anaerobiosis, pero son aerotolerantes, son tolerantes al ácido y estrictamente fermentativas. Las BAL generalmente incluyen a varias especies con características bioquímicas y ecológicas en común (*Lactobacillus*, y *Bifidobacterium*) y tiene poco o ningún potencial patógeno, excepto algunas especies de *Streptococcus* y posiblemente algunas cepas de *Enterococcus* (Donohue y Salminen 1996). El consumo de BAL viables incluidas en los alimentos fermentados en base a verduras, frutas, pescado, carne y leche data desde algunos años. Las BAL permiten mejorar la textura y el sabor de los alimentos fermentados e incrementan su vida útil (Elagöz *et al.* 1996).

Las vías por las cuales se metabolizan las hexosas dividen las BAL en dos grupos, homoláctico y heteroláctico (Figura 2). Los homolácticos como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos lactobacilos producen ácido láctico como el principal o único producto final de la fermentación de glucosa. Sin embargo, en condiciones de crecimiento alteradas y cuando el sustrato inicial es una pentosa, esto puede cambiar. Los homolácticos utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para generar dos moles de lactato por mol de glucosa y derivan aproximadamente el doble de energía por mol de glucosa que los heterolácticos. Los heterolácticos como *Weisella* y *Leuconostoc* y algunos lactobacilos

producen cantidades equimolares de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol a partir de glucosa a través de la ruta de hexosa monofosfato o pentosa (Caplice y Fitzgerald 1999)



**Figura 2:** Esquema generalizado para la fermentación de glucosa en bacterias ácido lácticas.  
**FUENTE:** Adaptado de Caplice y Fitzgerald (1999).

## 2.6. PROBIÓTICOS

La palabra “probióticos” se utilizó inicialmente como un antónimo de la palabra “antibiótico”. Deriva de las palabras griegas pro y biotos, traducido como “de por vida” (Hamilton *et al.* 2003). El origen del primer uso fue para la restauración de la salud de pacientes desnutridos por diferentes suplementos orgánicos e inorgánicos (Kollath 1953). Un año más tarde, Vergin (1954), propuso que el desequilibrio microbiano en el cuerpo causado por el tratamiento con antibióticos podría ser restaurado por una dieta rica en probióticos. Algún tiempo después, en 1965, Lilly y Stillwell describieron los probióticos como microorganismos que estimulan el crecimiento de otros microorganismos. La definición de probióticos se ha modificado y cambiado muchas veces (Cuadro 3). A la actualidad el término "probiótico", está definido por las Naciones Unidas y el Panel de Expertos de la Organización Mundial de Salud como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud en el huésped" (FAO/OMS 2002).

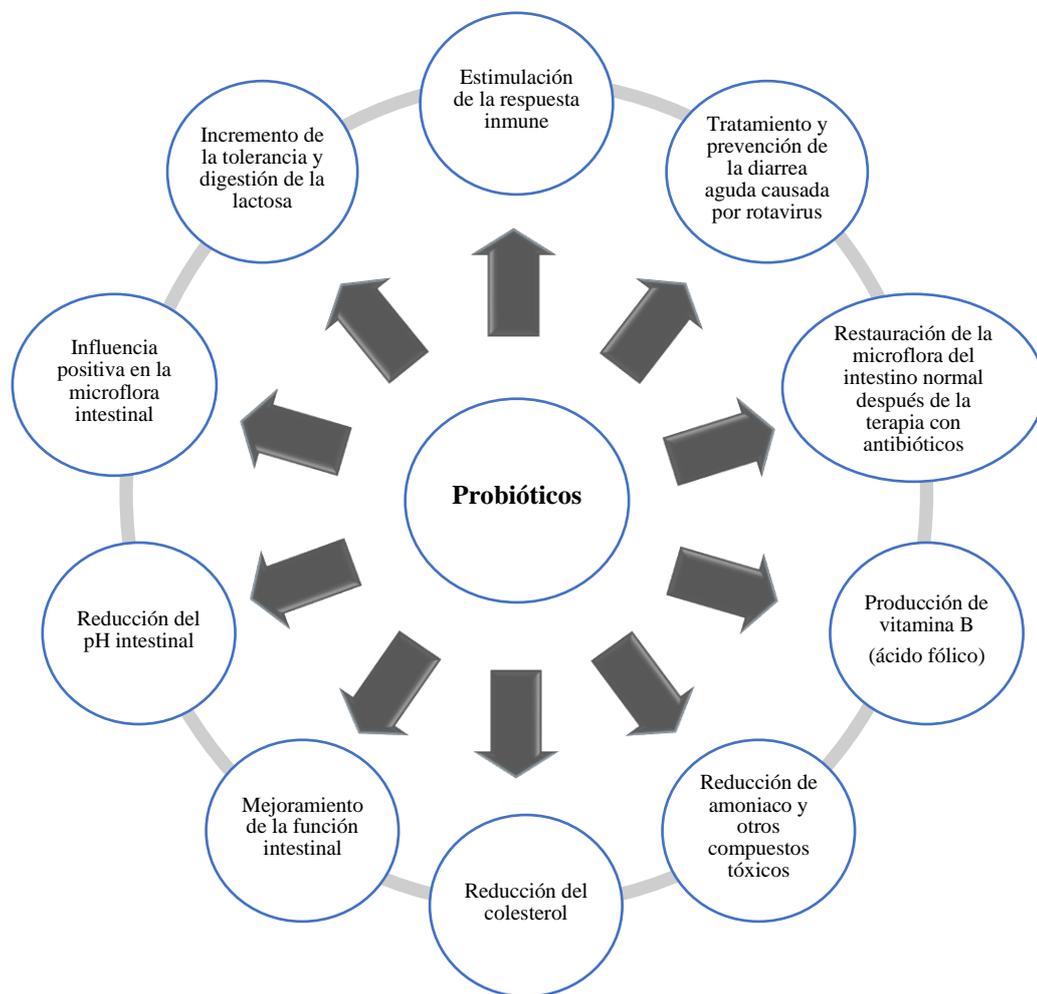
**Cuadro 3: Descripciones y definiciones de probióticos comúnmente citadas a lo largo de los años.**

Año	Descripción	Fuente
1953	Los probióticos son comunes en los alimentos vegetales como vitaminas, sustancias aromáticas, enzimas y posiblemente otras sustancias relacionadas con procesos vitales.	Kollath
1954	Los probióticos son opuestos a los antibióticos.	Vergin
1955	Los efectos nocivos de los antibióticos se pueden prevenir mediante la terapia con probióticos	Kolb
1965	Una sustancia secretada por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro.	Lilly y Stillwell
1971	Extractos de tejidos que estimulan el crecimiento microbiano.	Sperti
1973	Compuestos que crean resistencia a la infección en el huésped pero que no inhiben el crecimiento de microorganismos in vitro.	Fujii y Cook
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal.	Parker
1992	Suplemento de alimentación microbiana en vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped al mejorar el equilibrio microbiano	Batán
1992	Cultivo mono o mixto viable de microorganismos vivos que, aplicados a animales o al hombre, tienen un efecto beneficioso sobre el huésped al mejorar las propiedades de la microflora indígena.	Havenaar y Huis int'Veld
1996	Cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado que influye beneficiosamente en la salud y nutrición del huésped.	Salminen
1996	Microorganismos vivos que, tras la ingestión en ciertos números, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica inherente	Schaafsma
1999	Preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso sobre la salud y el bienestar del huésped.	Salminen, Ouwehand, Benno y Lee
2001	Una preparación o un producto que contiene microorganismos viables y definidos en cantidades suficientes, que alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimento del huésped y que ejercen un efecto beneficioso para la salud en este huésped.	Schrezenmeir y de Vrese
2002	Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidad adecuada confieren un beneficio para la salud del huésped	FAO / OMS

**FUENTE:** Vasiljevic *et al.* (2008)

Los criterios a considerar para que los microorganismos sean considerados probióticos son: Ser de origen humano, resistencia al ácido y la bilis, poder adherirse al epitelio intestinal, la colonización en el intestino humano, la producción de sustancias antimicrobianas, llamadas bacteriocinas; buenas características de crecimiento y los efectos beneficiosos sobre la salud humana (Figura 3). Una de las características más importantes de una cepa probiótica es que debe ser no patógeno y GRAS - generalmente reconocido como seguro (Hattingh y Viljoen 2001; Prado *et al.* 2008; Barbaros y Huseyin 2010). Las pautas y la información de la

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)/Organización Mundial de la Salud (OMS) demuestran la necesidad de que las cepas probióticas permanezcan intactas a través del tracto intestinal superior para garantizar efectos que promuevan la salud al ingresar a su sitio de acción, independientemente del modo de entrega aplicado. Por ejemplo, para asegurar eso, se ha declarado que el llamado nivel "mínimo terapéutico" de microorganismos probióticos viables debe ser de al menos  $10^6$  UFC/g de células viables durante toda la vida útil del producto (Neffe-Skocińska *et al.* 2018).



**Figura 3:** Efectos benéficos de los probióticos sobre la salud humana.

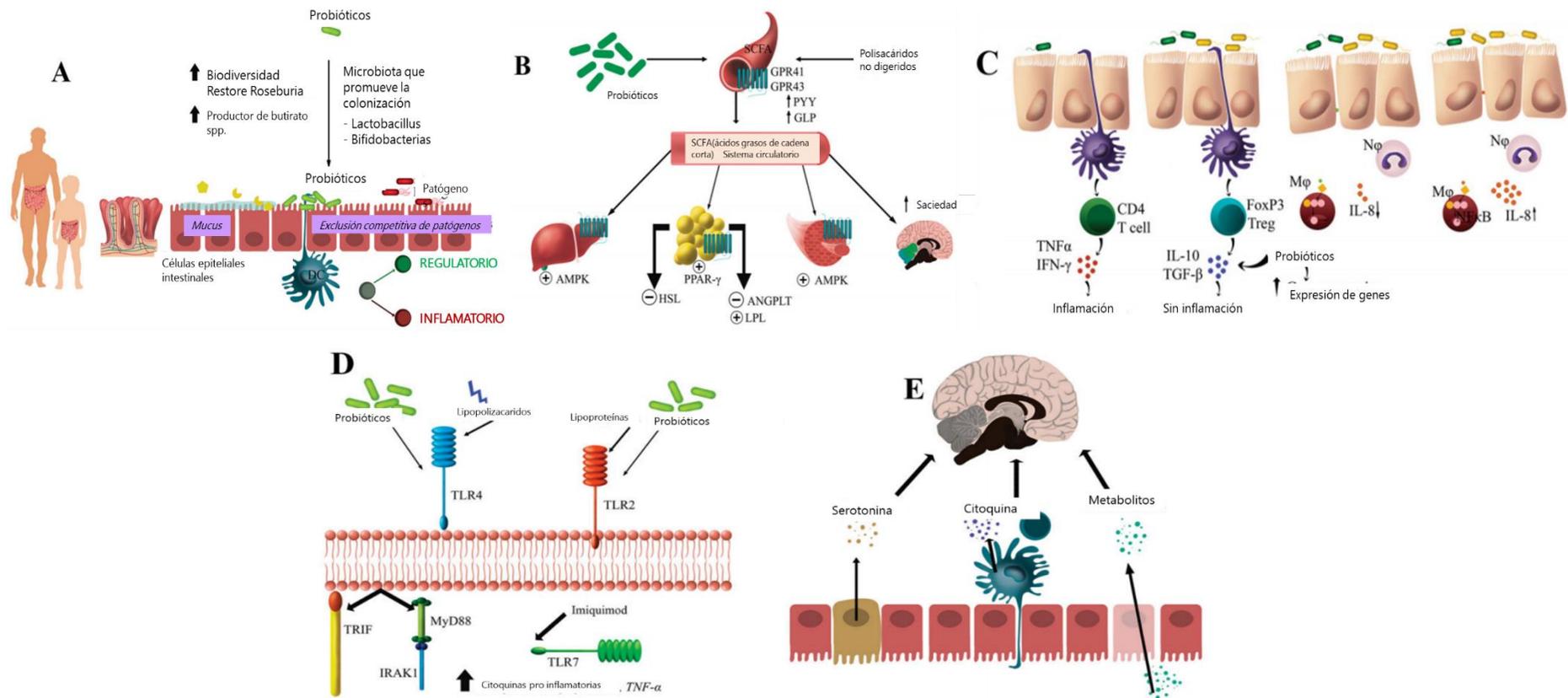
**FUENTE:** Gibson y Roberfroid (1995).

Por otro lado, las autoridades canadienses mencionan que el nivel de bacterias probióticas debe ser de  $1 \times 10^9$  UFC por porción, para *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*,

*brevey longum*) y *Lactobacillus* (*acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *ramnosus* y *salivarius*) (Health Canada 2009). El consumo de productos probióticos se ha incrementado alrededor del 13 a 18 % entre el 2002 y 2007 en Europa occidental y oriental respectivamente (Granato *et al.* 2010).

### **2.6.1. Mecanismo de acción de los probióticos**

Los mecanismos de acción de los probióticos implican. a) la colonización y la normalización de comunidades microbianas intestinales perturbadas en niños y adultos; b) la exclusión competitiva de patógenos y producción de bacteriocinas, c) la modulación de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de una serie de carcinógenos y otras sustancias tóxicas y d) la producción de ácidos grasos volátiles, a saber, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA), que desempeñan un papel en el mantenimiento de la homeostasis energética y la regulación de la funcionalidad en los tejidos periféricos. Otros mecanismos incluyen el aumento de la adhesión celular intestinal, la producción de mucina y la modulación de la actividad del tejido linfoide asociado al intestino y al sistema inmunitario. Los metabolitos producidos por los probióticos pueden interactuar con el eje cerebro-intestino y desempeñar un papel en el comportamiento (Figura 4) (Plaza-Díaz *et al.* 2019).



**Figura 4: Mecanismos de acción de los probióticos.** (A) Colonización y normalización de comunidades microbianas intestinales perturbadas en niños y adultos y exclusión competitiva de patógenos y producción de bacteriocina; (B) actividad enzimática y producción de ácidos grasos volátiles; (C) adhesión celular, antagonismo celular y producción de mucina; (D) modulación del sistema inmune; y (E) interacción con el eje cerebro-intestino. AMPK, AMP quinasa; ANGPTL, similar a la angiopoyetina; DC, célula dendrítica; FoxP3, caja de horquilla P3; GLP, péptido similar al glucagón; GPR, receptor acoplado a proteína G; HSL, lipasa sensible a las hormonas; IFN, interferón; IRAK1, quinasa 1 asociada al receptor de IL-1; LPL, lipoproteína lipasa; MyD88, respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; NF- $\kappa$ B, factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B; PPAR- $\gamma$ , receptor  $\gamma$  activado por proliferador de peroxisoma; PYY, polipéptido YY; TGF, factor de crecimiento transformante; TLR, receptor tipo Toll; TRIF, interferón- $\beta$  inductor de adaptador que contiene dominio TIR.

**FUENTE:** Elaborado en base a Plaza -Díaz *et al.* (2019).

## 2.6.2. Bacterias probióticas

Se han demostrado los beneficios para la salud de cepas probióticas específicas de los siguientes géneros: *Latobacillus Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Escherichia coli* (Salminen, 2002; Fijan, 2014) (Cuadro 4). En general, la existencia de probióticos en el tracto gastrointestinal de humanos o animales depende del comportamiento del huésped, la presencia de antibióticos y la absorción dietética del huésped (Rolfe 2000 ). Las bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, crecen débilmente en la leche debido a su relativa baja actividad proteolítica y a la incapacidad para utilizar la lactosa (Saarela 2009). A fin de mejorar la viabilidad de las bacterias probióticas en los fermentos se añaden varias sustancias a la leche incluyendo fructooligosacáridos (FOS), caseína macropéptidos (CMP), concentrado de proteína de suero (WPC), triptona, extractos de levadura, ciertos aminoácidos, precursores de nucleótidos y una fuente de hierro (Barbaros y Huseyin 2010).

**Cuadro 4: Bacterias probióticas**

Especies		otras
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	
<i>L. acidophilus</i>	<i>Bf. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. Amylovorus</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Bf. breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei sp. rhamnosus</i>	<i>Bf. infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>Bf. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis sp.</i>
<i>L. delbrueckii sp.</i>	<i>Bf. longum</i>	<i>Cremoriss</i>
<i>bulgaricus</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides sp.</i>
<i>L. Fermentum</i>		<i>Dextranicum</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Propionibacterium</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>freudenreichii</i>
<i>L. Lactis</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. paracasei</i>		<i>Streptococcus salivarius sp.</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>thermophilus</i>
<i>L. Reuteri</i>		

**FUENTE:** Prado *et al.* (2008).

### a. *Lactobacillus Plantarum* 299v

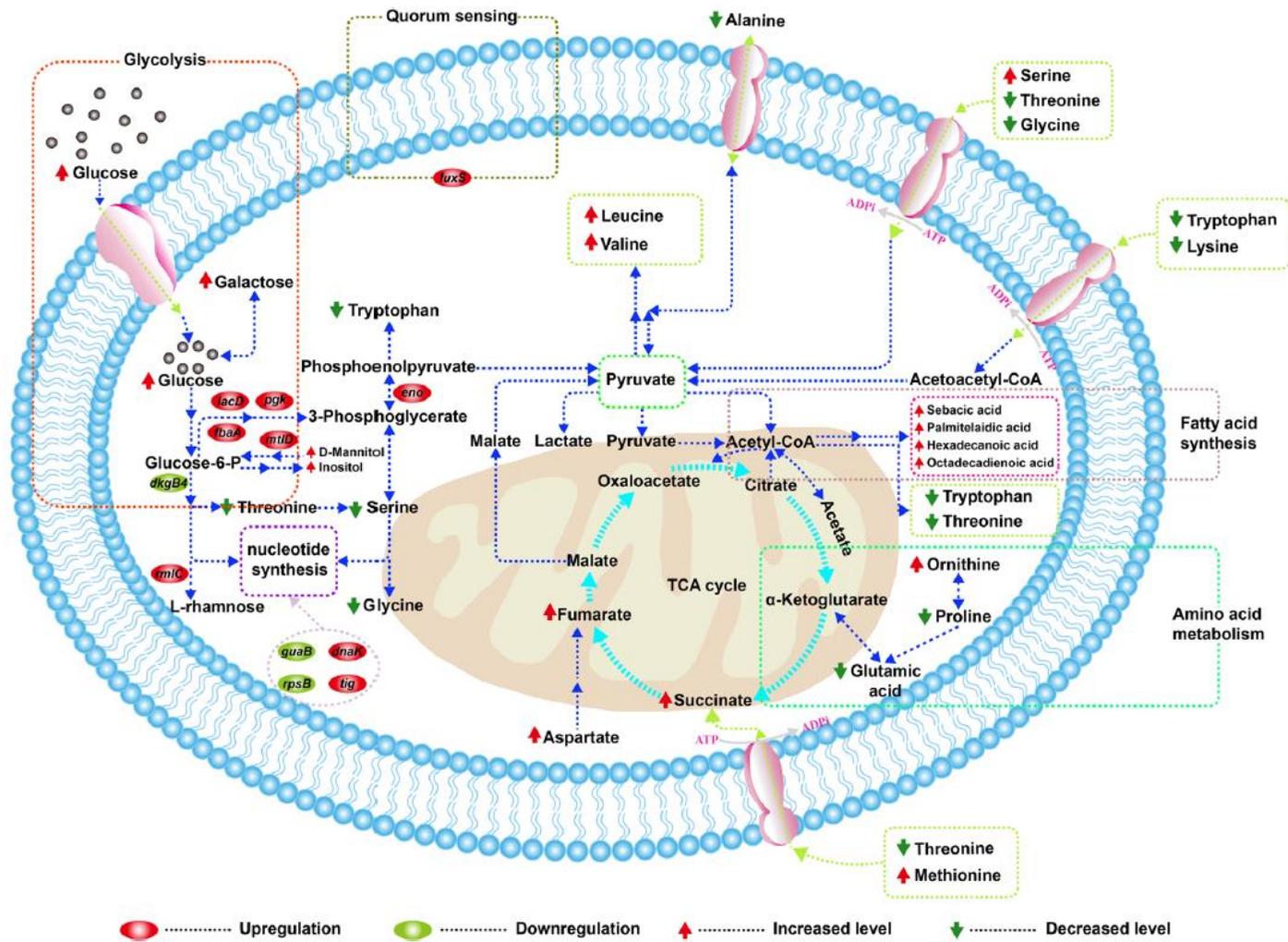
*Lactobacillus plantarum* 299v es una de las especies más estudiadas y ampliamente utilizada en la industria alimentaria como bacterias probióticas y/o iniciador microbiano (Mårtensson *et al.* 2002). Se ha determinado que es GRAS a través de procedimientos científicos de acuerdo con el código Federal de regulaciones-Título 21-FDA. *L. plantarum* 299v se aisló de una mucosa intestinal sana (Molin *et al.* 1993) y puede crecer en un 6% de NaCl en condiciones óptimas, y muestra un crecimiento sub-lethal a 16% de NaCl; es decir puede ser considerada como halotolerante. Posee una amplia tolerancia al pH y crece a valores de pH entre 4.0 y 8.0; con un crecimiento sub-lethal hasta pH 2.0 y hasta 9.0 y puede crecer en presencia de sales biliares hasta un 2% (Melgar-Lalanne *et al.* 2014).

Por otro lado, *L. plantarum* 299v tiene alta tasa de adhesión a la mucosa intestinal, porque poseen una adhesina de unión a manosa (Adlerberth *et al.* 1996) que le permite colonizar temporalmente el intestino grueso (Gbassi *et al.* 2009). Ejerce efecto inhibitorio sobre las *Enterobacteriaceae* y anaerobios gramnegativos, en la mucosa *in vivo* en modelos de ratas que simulan condiciones clínicas severas (Molin 2001). Por otro lado, al ser suplementadas en bebidas de frutas con papilla de avena fermentada, aumenta la concentración de ácidos carboxílicos en las heces de voluntarios sanos (principalmente ácido acético y propiónico), estos ácidos grasos de cadena corta en el colon son una fuente de energía para las células de la mucosa, es decir, una mayor concentración de ácidos grasos de cadena corta en la luz puede ser beneficiosa para el estado de la mucosa (Johansson *et al.* 1998). Por la forma de metabolizar los carbohidratos *L. plantarum* 299v es clasificada como hetero fermentativa facultativa (Cuadro 5). El metabolismo general de las bacterias de *Lactobacillus plantarum* se muestra en la Figura 5.

**Cuadro 5: Especies de *Lactobacillus* seleccionados por el modo de fermentación de azúcares**

<b>Homofermentativa</b>	<b>Hetero fermentativa facultativa</b>	<b>Hetero fermentativa obligatoria</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchnerii</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. salivarius</i>		

**FUENTE:** Vinderola *et al.* (2019).



**Figura 5:** Ruta de cambios metabólicos primarios en *Lactobacillus plantarum*  
**FUENTE:** Ming *et al.* (2018)

## **b. *Lactobacillus rhamnosus* GG**

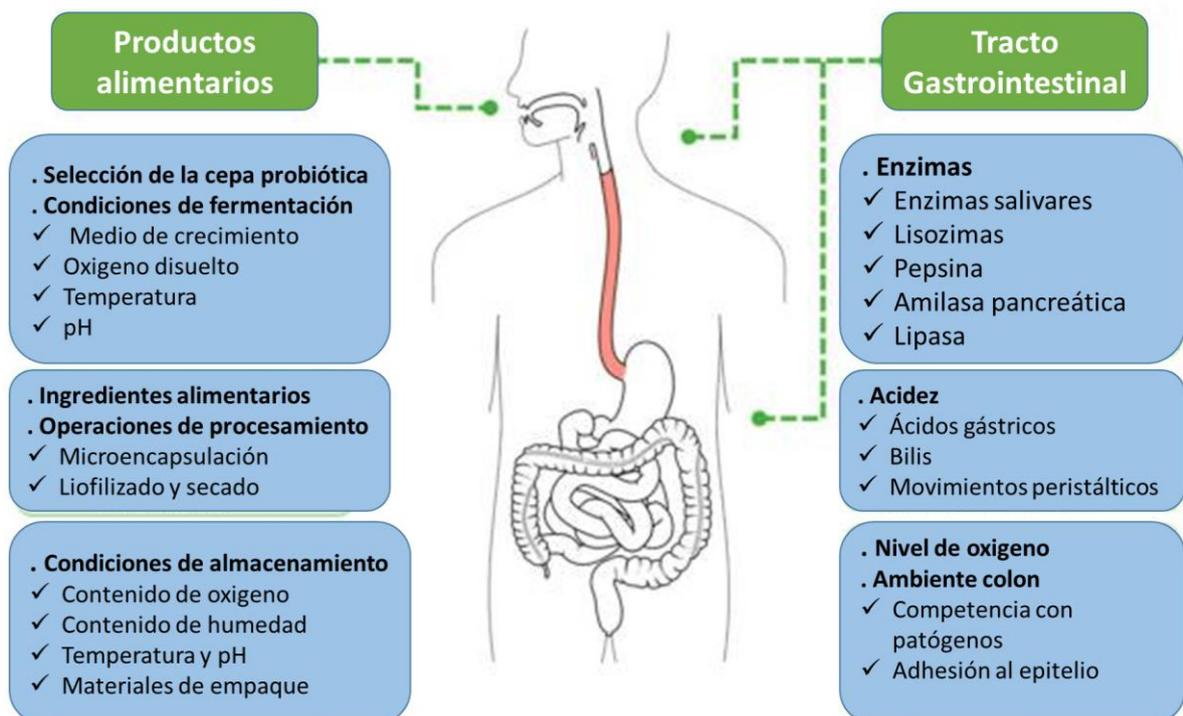
*L. rhamnosus* GG (LGG) es una Gram-positivo, no formador de esporas, facultativamente anaeróbico o microaerofílico, no móvil y catalasa negativa. El valor de pH inicial óptimo para el crecimiento está en el rango de 4.5 a 6.4, crece como varillas individuales o en cadenas cortas. Las dimensiones de las células son de 0.8 a 1 µm en ancho y de 2 a 4 µm de largo (Wood y Holzapfel 1995). La cepa LGG es de origen humano y puede colonizar el tracto intestinal, tolera ácidos y bilis, produce una sustancia antimicrobiana y es capaz de adherirse a las células intestinales humanas (Salminen *et al.* 1991). La capacidad de LGG de colonizar el intestino se debe a sus apéndices similares a fimbria y a la producción de proteínas solubles que pueden aumentar su adherencia a la célula epitelial intestinal. Una vez unido, el LGG produce tanto una biopelícula que puede proteger mecánicamente la mucosa como diferentes factores solubles (inhibidor de la proteasa de serpiente porcina, proteínas p75 y p40, hidrolasa asociada a la pared celular, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y otros) que son beneficiosos para el intestino debido a que mejoran la supervivencia de la cripta intestinal, disminuyen la apoptosis del epitelio intestinal y preservan la integridad del citoesqueleto (Mantegazza *et al.* 2018). La bacteria LGG equilibra el ecosistema intestinal, es decir, aumenta el nivel de lactobacilos y bifidobacterias, promueve la formación de ácidos grasos de cadena corta, disminuye la actividad de las enzimas procarcinógenas y normaliza la barrera de la mucosa (Salminen *et al.* 1991)

Los primeros productos lácteos comerciales probióticos con LGG, bajo la marca GEFILUS, se lanzaron en Finlandia en 1990. Después de un comienzo lento, su consumo anual aumentó rápidamente y alcanzó 6 L/persona (por ejemplo,  $3 \times 10^{11}$  UFC/persona/año) en 1999 (Salminen *et al.* 2002). La LGG tiene diversas aplicaciones en diversos productos lácteos, como yogurt, leche fermentada, leche pasteurizada (no cultivada), queso semiduro, y algunos productos sin leche, como bebidas y complementos alimenticios (cápsulas, tabletas, bolsitas) (Saxelin *et al.* 2008). La empresa Valio Ltd. comenzó a desarrollar bebidas no lácteas con *Lb. rhamnosus* GG en 1996 y el primer producto se lanzó en 1997. Las bebidas de frutas GEFILUS® tienen una vida útil de 5 semanas cuando se refrigeran (Prado *et al.* 2008).

### **2.6.3. Factores que afectan la viabilidad de los probióticos**

Se han identificado varios factores que influyen en la viabilidad de los probióticos en los productos alimenticios durante el procesamiento y el almacenamiento (Figura 6). Estos

factores incluyen: a) parámetros intrínsecos tales como pH, acidez titulable, oxígeno, actividad del agua, presencia de sal, azúcar y otros compuestos (peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, saborizantes y colorantes artificiales, etc.), b) parámetros de procesamiento que incluyen condiciones de fermentación (temperatura de incubación, tratamiento térmico, condiciones de enfriamiento y almacenamiento del producto, materiales de empaque, escala de producción) y c) parámetros microbiológicos (cepa de probióticos empleados, tasa y proporción de inoculación) (Terpou *et al.* 2019)



**Figura 6:** Factores que afectan la viabilidad de los probióticos en productos alimenticios durante el procesamiento, almacenamiento y su tránsito a través del tracto gastrointestinal (GIT).

**FUENTE:** Terpou *et al.* (2019).

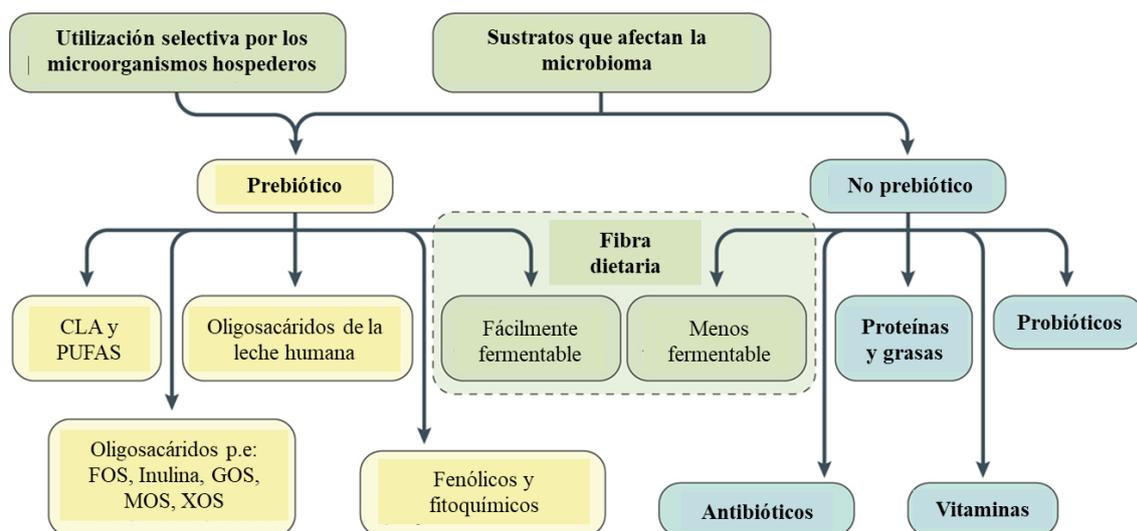
## 2.7. PREBIÓTICOS

El término prebiótico se definió por primera vez en Asia en el año 1995 (Gibson y Roberfroid 1995). Se demostró que la mayoría de los primeros prebióticos evaluados en humanos y utilizados comercialmente estimulan específicamente a *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero no a patógenos como ciertos miembros de la clase *Clostridia* y *Escherichia coli* (Roberfroid *et al.* 2010). El concepto de prebióticos ha venido evolucionando y en la actualidad se define como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los

microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud”. Los prebióticos no son las únicas sustancias que pueden afectar el microbiota, los prebióticos deben ser utilizados selectivamente y tener evidencia adecuada de beneficio para la salud del huésped.

Los efectos sobre la salud de los prebióticos están evolucionando, pero actualmente incluyen beneficios para el tracto gastrointestinal (por ejemplo, inhibición de patógenos, estimulación inmunológica), cardiometabolismo (por ejemplo, reducción de los niveles de lípidos en la sangre, efectos sobre la resistencia a la insulina), salud mental (por ejemplo, metabolitos que influyen en la función cerebral, la energía y la cognición) y los huesos (por ejemplo, biodisponibilidad mineral), entre otros (Gibson *et al.* 2017). Así mismo, los prebióticos pueden mejorar el crecimiento y la supervivencia de los cultivos probióticos debido a la sinergia potencial entre los probióticos y prebióticos, los alimentos que contiene una combinación de estos ingredientes son referidos como simbióticos (Istvan *et al.* 2008).

Los prebióticos de la dieta no deben ser degradados por las enzimas del huésped objetivo. La Figura 7 muestra los prebióticos candidatos y aceptados en que los niveles de evidencia varían actualmente, siendo FOS y GOS los prebióticos más investigados. ácido linoleico conjugado (CLA), ácido graso poliinsaturado (PUFA), fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), mananoligosacárido (MOS), xilooligosacárido (XOS).



**Figura 7:** Prebióticos en alimentos.

**FUENTE:** Adaptado de Gibson *et al.* (2017)

La inulina, un polisacárido natural compuesto de una cadena de unidades de fructosa con una unidad terminal de glucosa (Toneli *et al.* 2010). La inulina es utilizada para reemplazar la grasa o fibra dietaria, tiene una capacidad de gelificación alta con el agua, y es considerado un aditivo alimentario funcional debido a sus propiedades prebióticas, este no es digerido en el intestino delgado, pero es fermentado en el colon por las bacterias lácticas tales como los cultivos iniciadores del yogurt, consecuentemente la inulina promueve el crecimiento de las bacterias saludables, mejora la absorción del calcio, magnesio, reducen el nivel de colesterol y los lípidos séricos. Además, la fermentación de la inulina puede estimular la formación de ácidos grasos de cadena corta tales como acetato, propionato y butirato siendo este último el sustrato energético preferido por colonocitos (Güven *et al.* 2005). Al respecto existen investigaciones donde mencionan que la inulina prebiótica podría mejorar la viabilidad de los probióticos (da Silva Sabo *et al.* 2015). Las bacterias *L. acidophilus* FTDC 8033 y *L. casei* ATCC 393 crecen bien en leche de soya suplementada con inulina (Yeo y Liong 2010). Además, da Silva Sabo *et al.* (2015) también sugirieron que la presencia de 1% de inulina en el medio de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) aumentó la tasa de crecimiento específico máximo de *L. plantarum* ST16 Pa.

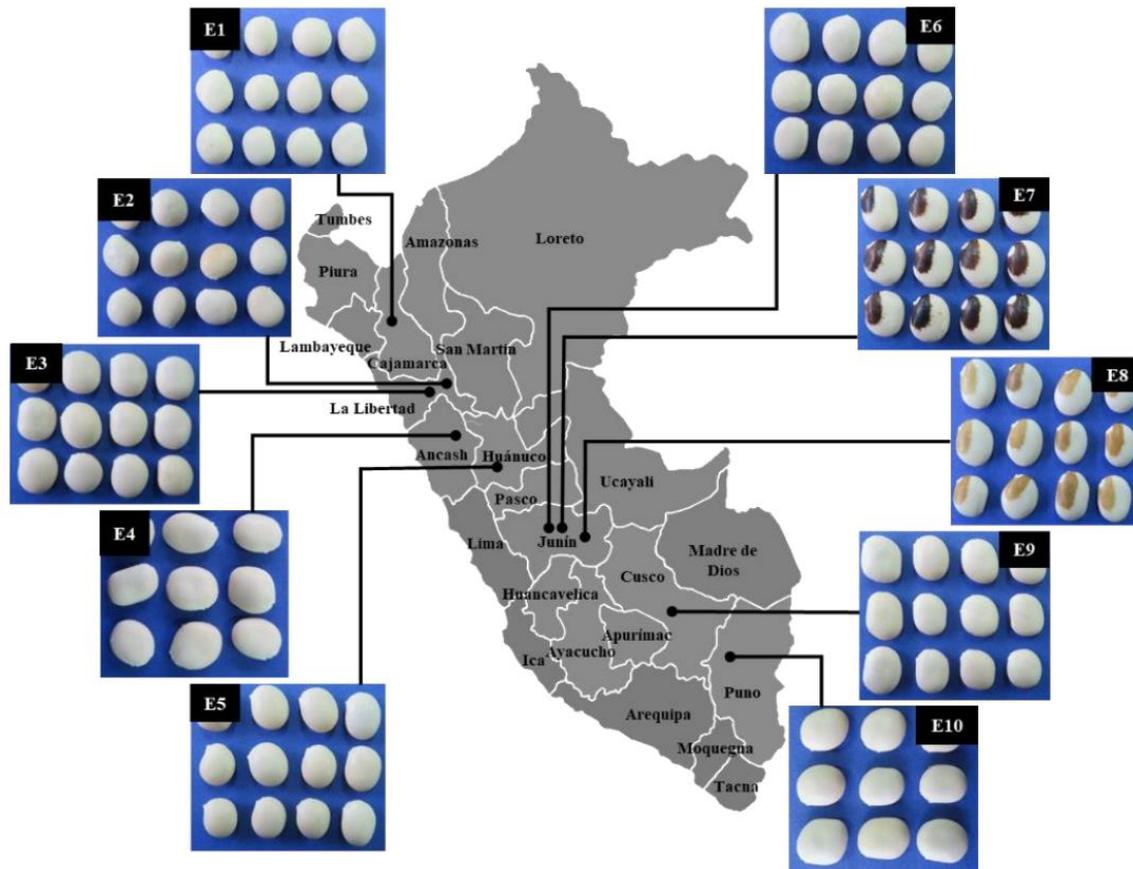
### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de microbiología, fisicoquímica, evaluación sensorial e investigación de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Turku Finlandia (UTU).

#### **3.2. MATERIA PRIMA E INGREDIENTES**

Se utilizaron semillas de diez ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) sin desamargar y desamargados. Las semillas sin desamargar fueron proporcionados por el Programa de Leguminosas de la UNALM provenientes de diferentes regiones del Perú como muestra la Figura 8: (E1) Cajamarca (latitud 6°37'S, longitud 78° 47'O, 2720 m.s.n.m); (E2) Altagracia de Otuzco-La Libertad (latitud 7°50'S, longitud 78° 34'O, 2641 m.s.n.m); (E3) Paton grande de La Libertad (latitud 7° 48'S, longitud 78° 02'O, 3169 m.s.n.m); (E4) Cholo fuerte de Ancash (latitud 9° 32'S, longitud 77° 32'O, 3052 m s.s.n.m); (E5) Huánuco I de Santa Rosa-Marambuco (latitud 9° 54'S, longitud 76° 8'O, 2912 m.s.n.m); (E6) Compuesto blanco semi precoz INIA, (E7) H6 INIA y (E8) Moteado beige de Junín (latitud 11° 29'S, longitud 74° 59'O, 3245 m.s.n.m); (E9) Andenes INIA de Cusco (latitud 13° 31'S, longitud 71° 58'O, 3400 m.s.n.m); (E10) Yunguyo de Puno (latitud 16° 14'S, longitud 69° 05'O, 3826 m.s.n.m).



**Figura 8.** Ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) de diferentes regiones del Perú.

Como ingredientes se usaron: Azúcar, caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, 1960), agar MRS, glucosa, inulina, solución salina (NaCl 0.85% estéril) y Carboximetil celulosa (CMC). En relación a los probióticos se usaron dos bacterias ácido lácticas liofilizadas: *Lactobacillus plantarum* 299v obtenidas del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET), Facultad de Ingeniería Química Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe Argentina) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (Oriola Oy, PB 8, Esbo Finlandia).

### 3.3. MATERIALES, EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

#### 3.3.1. Materiales

Tubos de 15 ml (Sarstedt), filtros de jeringa de 0.2 µm PTFE (VWR international), viales de 1.5 y 2 ml (VWR international), inserto de volumen limitado, asa de kolle, erlenmeyers de 125, 250, 500, etanol 96°, beakers de 10, 50, 100, 250, 300, 500, 1000 ml, Fiolas 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml, pipetas 1, 2, 5, 10, 25 ml, botellas de 500 ml (BOECO),

pipeteadores de 5 y 10 ml, placas petri, tubos de vidrio de 15 ml, espátula de drigalsky, tubos ependorfs, probetas de 100, 500 y 1000 ml

### **3.3.2. Equipos e instrumentos**

Cromatógrafo de gases (HP 6890 y Shimadzu GC-2010 plus), detector de masas HP 5973 MSD, detector de ionización de llamas (FID- Shimadzu Corp), Columna capilar Agilent DB-1MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), UPLC-MS (Waters Acquity) y HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), detector de DAD 2996, espectrómetro de masas Waters Quattro Premier (Waters Corp., Milford, MA) con una interfaz de ionización de electropulverización, columna Phenomenex Aeris péptido XB-C18 (150 x 4,60 mm, 3,6  $\mu$ m, Torrance, CA), micropipetas de 10-100ul, 100-1000ul y 500-5000ul (Sartorius), Vortex-2 Genie (Prolab), balanza analítica Mettler Toledo XS 205 (capacidad máxima 220g, precisión = 0,0001 g), balanza electrónica Mettler PE 360 (GWB), estufa Memmert, multiblock heater (Lab-line), balanza digital marca OHAUS (capacidad máxima 1 kg, precisión = 0,0001 g), autoclave Electric Steroclave (SOTU AKL5), Cámara de flujo laminar ( ULPA –ISOCIDE CLASE II TIPOS A2, LA2-4A3)- 720W), Centrifuga (Sorvall TC-6, Rotor H-400, Du Pont, Newtown, CT, EE.UU.), Centrifuga refrigerada (BOECO GERMANY U-320R), Bomba de vacío Greffenberger Antriebs technik made in Germany, rotavapor (Laborota 4000 Heidolph), equipo de purificación de agua MilliQ Millipore (Elga LabWater, Woodridge, IL, USA), ultrasonido (Ultrasonic Cleaners 5510 Branson), equipo soxhlet, T25 digital Ultra-Turrax high-performance disperser (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), refrigerador-Congelador BOSH KDN49, Congeladora COLDEX CH10P, termómetro (0-100° C  $\pm$  2°), agitador magnético (HANNA HI 200M), potenciómetro (), licuadora Oster X pent (BLSTUB PNC), Microscopio de barrido electrónico (Thermo Scientific Q250 Analytical SEM, Checoslovaquia), metalizador de oro (Quorum Technologies modelo Q150R)

### **3.3.3. Reactivos**

Esparteína (97 %), angustifolina (98 %),  $\alpha$ -isolupanina perclórica (> 95%) y cafeína ( $\geq$  95%) fueron obtenidos de ChemFaces (Wuhan, Hubei, China). (+)-lupanina perclórica (97 %) obtenidas de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Ácido tricloroacético de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Ácido clorhídrico (grado, 37 %), sulfato de sodio (anhidros, granular,  $\geq$  99 %), y metanol de grado HPLC, acetona, acetonitrilo,

diclorometano, y n-hexano de VWR (Espoo, Finlandia), y series homologa de n-alcanos (C8-C40) de AccuStandard, Inc. (New Haven, CT, USA). Hidróxido de sodio de Merck Group (Darmstadt, Germany). El agua fue purificada con un sistema (Elga LabWater, Woodridge, IL, USA) equipado con 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

### 3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

#### 3.4.1. Caracterización físico-química de las semillas de lupino

##### a. Composición químico proximal

- **Humedad:** Se determinó mediante la pérdida de peso de la muestra durante un calentamiento a 105°C hasta obtener un peso constante, según la metodología establecida por la A.O.A.C. 950.27 (2005).
- **Ceniza:** Se determinó por incineración a 550°C con la final de eliminar la materia orgánica, según metodología establecida por la A.O.A.C. 940.26 (2005).
- **Proteína cruda:** Se determinó mediante el método Kjeldahl, considerando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína, según la metodología establecida por la A.O.A.C. 920.152 (2005).
- **Extracto etéreo:** Se determinó siguiendo el método Soxhlet, utilizando hexano como solvente extractor, siguiendo el método A.O.A.C. 948. 22 (2005).
- **Carbohidratos:** Se determinó por diferencia, según lo establecido por la A.O.A.C. (2005).

##### b. Determinación del tamaño de las semillas de lupino

Para las mediciones de largo y ancho, se tomaron aleatoriamente 25 semillas enteras sin desamargar parcialmente secas y 25 semillas desamargadas enteras frescas de acuerdo a la guía de descriptores de lupino (IBPGR 1981).

##### c. Determinación de pH y acidez titulable

El valor de pH de la bebida antes y después de fermentar se midió usando un pH-metro digital y la acidez titulable (como porcentaje de ácido láctico) se determinó después de mezclar la muestra con 10 ml de agua destilada. La titulación se realizó con 0.1N de NaOH en presencia del indicador de fenolftaleína (1 % p/v) hasta un punto final de color rosa tenue (Izadi *et al.* 2015).

## **d. Determinación de los metabolitos secundarios**

### **d.1. Determinación de alcaloides**

Se siguió el método reportado por Muzquiz *et al.* (1994) con algunas modificaciones. Las semillas de lupino finamente molidas se pesaron con precisión (aproximadamente 0,1 g de semillas sin desamargar y 1 g de semillas desamargadas) y se agregó cafeína (100 µg) como estándar interno. Las semillas se homogeneizaron tres veces cada una con 5 ml de ácido tricloroacético al 5 % utilizando un dispersor de alto rendimiento Ultra-Turrax digital T25 a una velocidad de 10.6 rpm durante 1 minuto, seguido de centrifugación (10000 x g) durante 10 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de las tres extracciones se combinaron y se hidrolizaron con 0,8 ml de NaOH 10 M, y los alcaloides se extrajeron tres veces, cada uno con 15 ml de diclorometano. Los extractos de diclorometano se combinaron y se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio a 30 °C. El residuo se disolvió en 1 ml de metanol y se filtró a través de un filtro de jeringa de PTFE de 0,22 µm en un vial de vidrio para el análisis. La identificación de los alcaloides fue realizada acorde al método de Przybylak *et al.* (2005), con ligeras modificaciones. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890 con un detector de masas (MS 5973 MSD) y una columna capilar Agilent DB-1MS (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de película interior). El gas portador a presión constante fue helio. La temperatura del inyector se fijó a 290 °C y la del detector a 300 °C. La temperatura del programa del horno fue isotérmico a 180 °C durante 2 min, luego se aumentó a 300 °C a una velocidad de 6 °C / min y se mantuvo a 300 °C durante 10 min. El volumen de inyección fue de 1 µL. Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con los de los estándares puros (lupanina, esparteína, angustifolina y α-isolupanina) analizados a las mismas condiciones. Así mismo se calcularon los índices de retención (RI) utilizando una serie homóloga de n-alcanos.

La cuantificación de los alcaloides se realizó con un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llamas (GC-FID) y una columna capilar Agilent DB-1MS (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 µm de película interior). Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 290 °C y 300 °C, respectivamente. Las condiciones de elución usadas fueron las mismas descritas anteriormente para el análisis de GC-MS. Cada extracto fue inyectado (1 µL) por triplicado, como estándar interno se usó cafeína. La cuantificación de los alcaloides se realizó usando una curva estándar del patrón respectivo analizado en las mismas condiciones. Debido a que los estándares de algunos compuestos identificados no

estaban disponibles comercialmente o su grado de pureza no era adecuado para fines cuantitativos, la cuantificación de alcaloides se logró de la siguiente manera: Esparteína, lupanina, angustifolina y  $\alpha$ -isolupanina se cuantificaron utilizando compuestos de referencia, en tanto nuttalina, multiflorina, oxilupanina y 11, 12-dehidrolupanina se cuantificaron como lupanina. Los resultados se expresaron como mg /100 g de semilla.

## **d.2. Determinación de isoflavonas y flavonas**

La determinación de isoflavonas y flavonas de las semillas de lupino sin desamargar y desamargado se desarrolló en dos etapas, la primera tuvo como objetivo la elección del mejor método y el tipo de solvente de extracción en función de los compuestos fenólicos totales la segunda consistió en la identificación, cuantificación de las isoflavonas y flavonas en los 10 ecotipos amargos y desamargados.

- **Determinación del tipo de solvente y método de extracción**

Para la determinación del mejor método y solvente de extracción se utilizaron 3 ecotipos de sin desamargar, basado en los métodos de Liu *et al.* (2014) y Gutiérrez *et al.* (2018) con ligeras modificaciones. Se evaluaron 03 solventes de extracción: S1 (acetona al 70 %), S2 (metanol al 70%) y S3 (metanol al 70 % acidificado) y dos métodos de extracción: M1 (sonicado por 10min) y M2 (Ultraturrax por 3 min). Se realizaron 3 etapas de extracción: se pesaron aproximadamente 0.4 g de harina lupino en un tubo de 15 ml. Se añadió 5 ml del solvente de extracción (S1, S2 o S3), se homogenizaron con el método M1 o M2, y luego se centrifugaron a  $1500 \times g$  durante 5 min (Sorvall TC-6, Rotor H-400, Du Pont, Newtown, CT, EE. UU.). Se repitió dos veces las tres etapas anteriores de extracción. Los sobrenadantes de las 3 extracciones fueron combinadas y evaporadas a 35 °C, el extracto se re disolvió en 5 ml de metanol y se filtró a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  antes del análisis.

Para la determinación de compuestos fenólicos totales se siguió el método propuesto por Chirinos *et al.* (2013b) con ligeras modificaciones. Se hizo reaccionar 250  $\mu\text{L}$  de reactivos de Folin Ciocalteu 1 N con 1250  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de sodio 0.5 M y 500  $\mu\text{L}$  de muestra (extracto) o agua (blanco). La mezcla se dejó reposar por 30 minutos bajo oscuridad. Después se midió la absorbancia a 755 nm. El contenido de compuestos fenólicos

totales se estimó a partir de una curva estándar de ácido gálico (Anexo 1). Los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g de semilla.

- **Identificación de isoflavonas y flavonas por UPLC-DAD-ESI-MS**

Se siguió el método reportado por Liu *et al.* (2014), y Tian *et al.* (2017) con ligeras modificaciones. Las harinas de lupino fueron desengrasadas por el método Soxhlet durante 4 h. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 0.4 g de harina lupino sin desamargar y 1 g de harina desamargada en un tubo de 15 ml. Se añadió 5 ml de metanol acuoso al 70 % acidificado (Metanol: HCl; 99:1), y se homogenizó durante 3 min (Ultra-Turrax). La mezcla se centrifugó a  $18000 \times g$  durante 30 min (Sorvall TC-6, Rotor H-400, Du Pont, Newtown, CT, EE. UU.). El sobrenadante se recogió y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para la segunda y tercera extracción, se agregaron 5 ml del solvente de extracción al residuo, se mezclaron mediante vortex durante 1 min y se centrifugaron a  $18000 \times g$  durante 30 min, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, todos los tres extractos fueron recolectados para su análisis.

Para la identificación se utilizó un sistema de cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) Waters Acquity Ultra equipado con un detector de DAD 2996 y un espectrómetro de masas Waters Quattro Premier (Waters Corp. Milford, MA, EE. UU) con una interfaz de ionización por electropulverización (ESI) en modo de ion positivo y negativo. Los métodos relacionados con MS y MS / MS se describieron previamente (Tian *et al.* 2017). Se usó una columna Phenomenex Aeris peptide Aeris XB-C18 ( $150 \times 4.60$  mm,  $3.6 \mu\text{m}$ , Torrance, CA, EE. UU) a temperatura ambiente. La separación cromatográfica a un caudal de 1 ml/min y se inyectó 10  $\mu\text{L}$  de muestra. Como fase móvil se usó agua (A) y acetonitrilo (B), ambas conteniendo 0.1 % (v/v) de ácido fórmico. Para la identificación de las isoflavonas y flavonas se usó el programa de gradiente reportado por Tian *et al.* (2019): Para el análisis de isoflavonas y flavonas el gradiente de la fase móvil fue: 0-15 min con 8-10 % de disolvente B, 15-20 min con 10-13 % B, 20-25 min con 13-16 % B, 25-30 min con 16-18 % B, 30-35 min. con 18-20 % B, 35-40 min. con 20-22 % B, 40-45 min con 22-25 % B, 45-50 min con 25-60 % B, 50-55 min con 60-8 % B, 55-57 min con 8 % B. Los cromatogramas se registraron a 260 nm para isoflavonas y 340 nm para flavonas.

- **Cuantificación de las isoflavonas y flavonas por HPLC-DAD**

La cuantificación de isoflavonas y flavonas se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida Shimadzu, que consta de un auto muestreador SIL-10A, un horno de columna CTO-10, dos bombas de LC-10ATvp y un detector de diodos SPD-M10AVP. El análisis se realizó con 3 repeticiones. La programación de la fase móvil usadas fueron las mismas descritas anteriormente para el análisis de UPLC-DAD- ESI-MS. El contenido de isoflavonas y flavonas se determinó usando curvas estándares de los patrones respectivos. Los resultados se expresaron como mg/100 g de semilla en base seca.

### **3.4.2. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)**

Para el análisis de la microestructura de las semillas de lupino sin desamargar y de la bebida probiótica optimizada se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM; Thermo Scientific Q250 Analytical). Se tomaron imágenes de la cáscara y el cotiledón de las semillas sin desamargar de lupino con una magnificación de (x 34 y x1200) y (x34 y x280) respectivamente de acuerdo a la metodología de Mariotti *et al.* (2006). Las semillas enteras se seccionaron a lo largo del eje transversal mediante fractura en seco, se montaron en trozos de aluminio y se recubrieron con pulverizadores de oro, para adquirir las imágenes.

La microestructura de la bebida antes y después de fermentar, así como también la morfología de las bacterias de *Lactobacillus plantarum* 299v fueron observadas de acuerdo a la metodología de Espírito-Santo *et al.* (2013). Para ello, los extractos de las bebidas se homogenizaron con una pipeta Pasteur, se tomaron alícuotas y se colocaron sobre el porta muestras de aluminio y se dejaron secar para la observación. Para la morfología de las bacterias, se fijó la bebida fermentada a un porta muestras de aluminio al que previamente se le adhirió una capa de cinta de carbono, luego se le dio un baño de oro por 20 minutos en un metalizador automático de rotación al vacío. Posteriormente las preparaciones recubiertas de oro se observaron bajo el SEM y se adquirieron imágenes para cada muestra.

### **3.4.3. Recuento de células viables**

El recuento de células viables en las bebidas de lupino fue analizado antes y después del proceso de fermentación usando el método reportado por Vinderola y Reinheimer (2003) y La Norma Internacional ISO 20128 /IDF192. Se pesó 1 g de la bebida y se diluyó decimalmente con solución salina estéril, luego 0.1 ml de las diluciones de las alícuotas

fueron plaqueadas por triplicado en agar MRS. Las placas de agar MRS se incubaron aeróbicamente durante 72 h a 37 °C y finalmente se realizaron los conteos usando un contador de colonias. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se enumeraron en placas conteniendo de 30 a 300 colonias y la concentración celular se expresó como log UFC/ml.

#### **3.4.4. Análisis reológico**

##### **a. Determinación de la viscosidad aparente**

La viscosidad aparente de las muestras homogenizadas fueron medidas usando un viscosímetro Brookfield rotativo con un *spindle* N° 4 y 3 rpm a 6 °C. Los resultados fueron registrados en (cP) después de 50 s de cizallamiento (Izadi *et al.* 2015).

##### **b. Determinación de firmeza**

La firmeza de la bebida después de 1, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento a 6 °C se determinaron, usando un texturómetro universal INSTRON (Modelo 3365, Canton MA, USA) por penetración de 24.5 mm del accesorio cilíndrico de prueba, con una velocidad de 2 mm/s hasta 35 mm de la muestra. Las muestras fueron preparadas en tubos de 50 ml con un diámetro de 7.5 cm y la relación del diámetro del tubo y el accesorio de prueba fue de 3:1. (Izadi *et al.* 2015).

#### **3.4.5. Evaluación sensorial de la bebida**

La evaluación sensorial de la bebida con la formulación óptima fue realizada a través de una prueba de aceptabilidad de acuerdo a Ureña *et al.* (1999). Participaron 80 personas no entrenadas, cuyas edades comprendían entre 18 - 65 años (profesores, estudiantes y personal de la UNALM). Los panelistas recibieron muestras en vasos de 100 ml en un volumen de 30 ml a 5 °C por persona, la evaluación se realizó por una escala no estructurada de 1 a 10 cm, indicando dos opciones (1 = desagrada muchísimo y 10 = agrada muchísimo). La prueba se realizó en un solo día en orden monádico y aleatoriamente en cabinas individuales con luz natural sirviendo agua mineral antes de la prueba.

### **3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

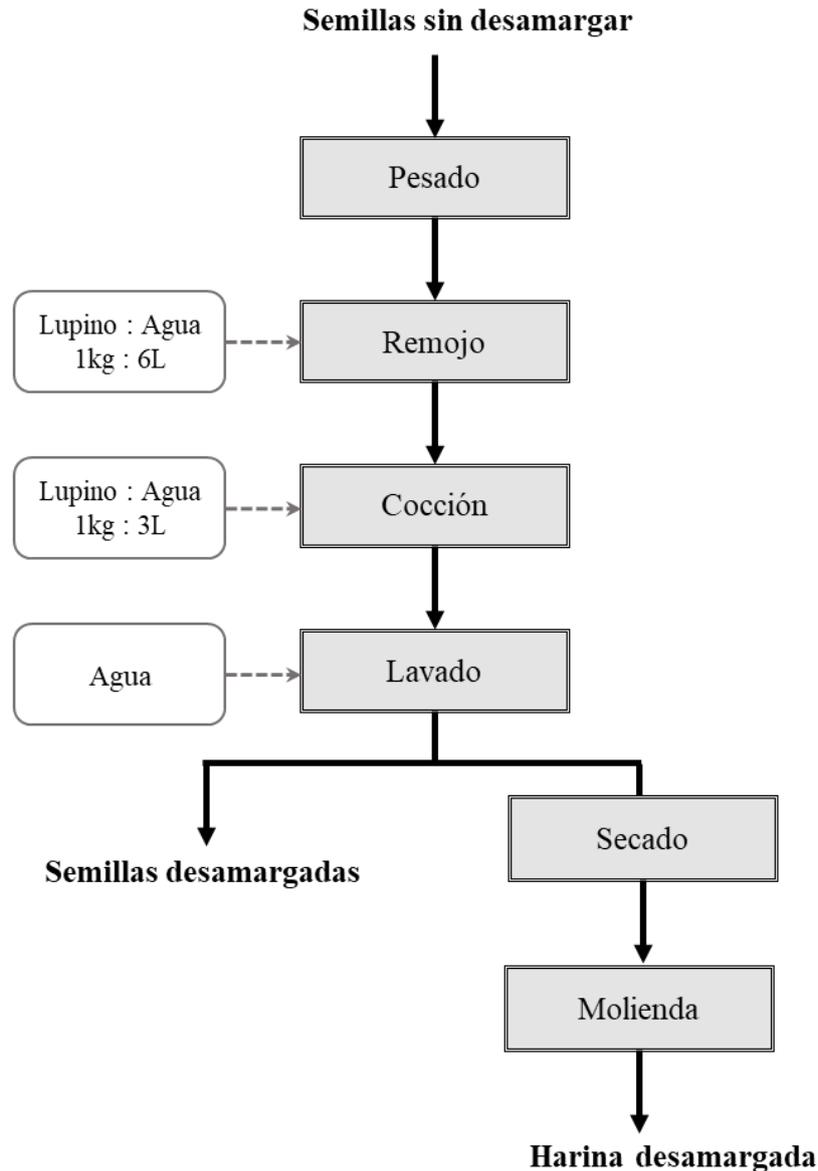
A continuación, se describen las diferentes etapas seguidas en la presente investigación.

### **3.5.1. Tratamiento de las semillas**

Las semillas sin desamargar de diez ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) fueron seleccionadas y posteriormente molidas en un molino de martillos a un tamaño de partícula de 100 µm. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C para los respectivos análisis (proximal, identificación y cuantificación de alcaloides, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos)

### **3.5.2. Desamargado de las semillas de lupino**

Las semillas sin desamargar fueron desamargadas según el método de Jacobsen y Mujica (2006), con ligeras modificaciones. Las semillas se seleccionaron y remojaron en agua durante 12 h a temperatura ambiente, se cocinaron durante 1 h cambiando el agua cada 30 min. Posteriormente, las semillas fueron lavadas con agua corriente durante cinco días. Las semillas desamargadas fueron dividida en dos partes, la primera se secó a 50 °C durante 18 h, seguidamente se molieron y en forma de harina se almaceno a -20°C para la identificación y cuantificación de alcaloides, identificación y cuantificación de isoflavonas y flavonas. La segunda parte de las semillas desamargadas frescas fueron utilizadas para la elaboración de la bebida (Figura 9).



**Figura 9:** Proceso de desamargado de las semillas de lupino.

### 3.5.3. Elaboración de la bebida

En la Figura 10 se muestra el flujo de operaciones para la elaboración de la bebida.

#### a. Preparación del cultivo iniciador y propagación

La preparación del inóculo se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar manteniéndose las condiciones asépticas. Para obtener concentraciones iniciales de cada bacteria, las bacterias probióticas de *L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG fueron activadas en 10 ml de caldo MRS respectivamente, posteriormente fueron incubadas a 37 °C por 48 h. Seguidamente fueron sembradas por agotamiento en placas contenidas de agar MRS. Las

placas se incubaron a 37 °C por 72 h. Se tomó una colonia aislada de cada placa y se coló en tubos de 10 ml que contenían caldo MRS y se incubaron a 37 °C por 24 h. Después de la incubación se tomó 1 % del cultivo en 100 ml de caldo MRS y se incubó por 24 h para que las bacterias probióticas lleguen aproximadamente a una concentración de 10<sup>9</sup> UFC/ml. Las bacterias contenidas en los 100 ml fueron centrifugadas a 6000 rpm por 15 min a 8 °C, seguidamente se realizaron 2 lavados de los pellets con solución salina. El precipitado fue resuspendido en solución de sacarosa, la solución resultante fue almacenada en tubos eppendorf a -35°C. Previa a la etapa de inoculación se activaron las bacterias probióticas en 10 ml de caldo MRS por un tiempo de 24 h, una vez activas, se procedió a la etapa de incubación.

#### **b. Procedimiento para la obtención de la bebida probiótica fermentada**

Para obtener la bebida probiótica se realizaron las siguientes etapas:

- **Recepción**

Se recibieron las semillas desamargadas con un porcentaje de humedad de 71.98 %, posteriormente se pesaron las semillas de lupino, glucosa, inulina, azúcar y agua.

- **Licudo**

Las semillas de lupino desamargadas frescas fueron licuadas con una relación de agua (p/v), se agregó glucosa, azúcar, el tiempo estimado de licuado fue de 2 min.

- **Estandarización**

La estandarización se llevó cabo a de 32 °C, el extracto licuado fue homogenizado con las concentraciones de inulina y CMC establecidas de acuerdo al diseño experimental.

- **Pasteurización**

Se llevó a cabo en botellas de vidrio de 500 ml, que contenían un volumen de extracto de 100 ml, las botellas completamente cerradas fueron puestas en un baño sin agitación a 95 °C por 10 min, con la finalidad de eliminar los gérmenes patógenos y reducir la carga microbiana presentes en los ingredientes utilizados.

- **Enfriamiento**

El extracto homogéneo fue enfriado a 42 °C, para luego adicionar las bacterias probióticas.

- **Inoculación**

La preparación del inóculo se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar manteniéndose las condiciones asépticas. La etapa de inoculación consistió en la adición de *Lactobacillus plantarum* 299v y *Lactobacillus rhamnosus* GG en una concentración de 1 %, a 37 °C.

- **Incubación**

En esta etapa se llevó a cabo la fermentación láctica producida por las bacterias probióticas. Las botellas de 500 ml inoculadas, fueron incubadas a 37 °C por 18 h para la identificación de los factores significativos (Cuadro 6) y por 12 h para la Optimización de la bebida (Tripathi *et al.* 2014). La incubación se realizó hasta que la bebida de lupino alcanzó un pH entre 4.5-4.7, manteniendo la temperatura constante con la finalidad de contribuir al proceso de fermentación.

- **Enfriamiento**

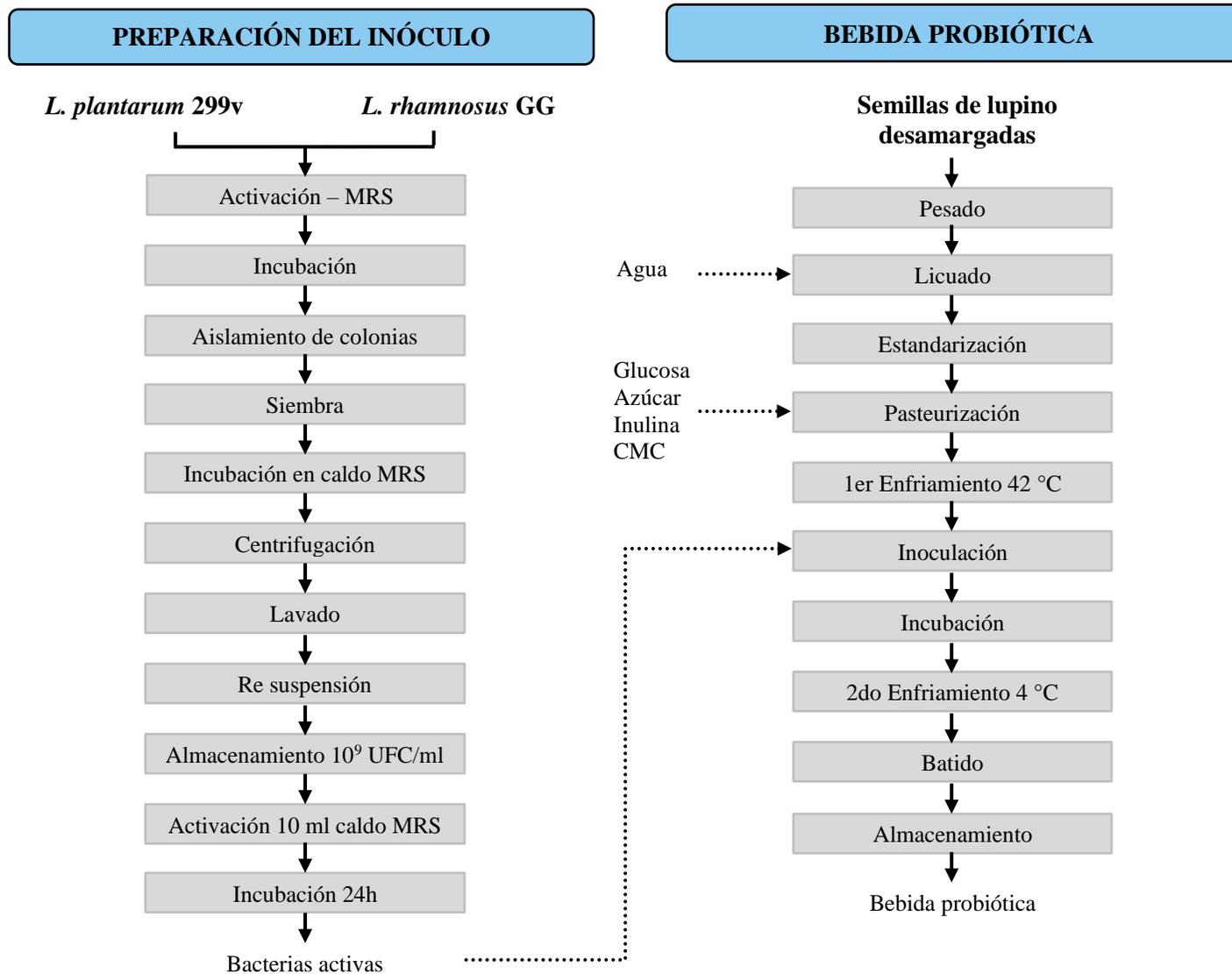
La bebida se enfrió en una cámara de refrigeración a 4 °C con el fin de detener el proceso de fermentación y evitar el incremento de acidez.

- **Batido**

Se incorporó pulpa de fruta (fresa) para el saborizar la bebida optimizada.

- **Almacenamiento**

El almacenamiento de la bebida se llevó a 4 °C y se realizaron los análisis al producto final (viabilidad de las bacterias, pH, acidez, textura y viscosidad).



**Figura 10:** Diagrama de flujo para la elaboración de la bebida.

**Fuente:** Adaptado de Nelson *et al.* (1976); Gupta *et al.* (2010).

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.6.1. Diseño experimental

La presente investigación llevó a cabo en tres etapas, los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el esquema experimental mostrado en la Figura 11.

##### a. Caracterización fisicoquímica de las semillas de lupino: Etapa I

Se caracterizaron diez ecotipos de *L. mutabilis* Sweet antes y después del proceso de desamargado.

##### b. Optimizar los factores de formulación de la bebida probiótica: Etapa II

###### b.1. Determinación de los factores que influyen en el crecimiento de las bacterias probióticas (*Screening*)

Se determinaron los factores que influyen significativamente en el crecimiento de las bacterias probióticas durante la elaboración de la bebida a base lupino. Para ello, se usó el diseño de Taguchi con un arreglo ortogonal L8 (2<sup>7</sup>) (Martil 1991; Ashengropha *et al.* 2013) con los siguientes factores: la concentración de lupino (%), concentración de azúcar (%), tipo bacteria probiótica (*L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG), concentración de inulina (%) y concentración de CMC (%) (Cuadro 6). Los factores y sus niveles (Cuadro 6) se establecieron en base a literatura científica (Ludeña *et al.* 2016; Mäkinen *et al.* 2016; Savedboworn *et al.* 2017; Lorusso *et al.* 2018), y pruebas preliminares. El porcentaje de cada ingrediente en peso/volumen se calculó tomado como base la cantidad de agua.

**Cuadro 6: Factores y niveles en el diseño Taguchi L<sub>8</sub> (2<sup>7</sup>)**

Factores	Niveles	
	1 (Mínimo)	2 (Máximo)
F1→ Lupino (%)	15	65
F2→ Azúcar (%)	2	8
F3→ F1xF2	-	-
F4→ Tipo de bacteria	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
F5→ F1xF4	-	-
F6→ Inulina (%)	1	2
F7→ CMC (%)	0.2	0.8

En el Cuadro 7 se muestran los tratamientos generados por la metodología Taguchi con un total de ocho tratamientos (formulaciones) por duplicado a ensayar y con el criterio mayor es mejor. Cabe resaltar que el número de ensayos generados es equivalente a 128 ensayos que correspondería a un diseño factorial de  $2^7$  experimentos.

**Cuadro 7: Tratamientos generados por la metodología Taguchi**

Ensayos	Lupino (%)	Azúcar (%)	F1xF2	Tipo de bacteria	F1xF4	Inulina (%)	CMC (%)
1	65	2	2	<i>L. plantarum</i>	2	1	0.8
2	15	2	1	<i>L. plantarum</i>	1	1	0.2
3	65	2	2	<i>L. rhamnosus</i>	1	2	0.2
4	15	2	1	<i>L. rhamnosus</i>	2	2	0.8
5	15	8	2	<i>L. plantarum</i>	1	2	0.8
6	15	8	2	<i>L.rhamnosus</i>	2	1	0.2
7	65	8	1	<i>L. plantarum</i>	2	2	0.2
8	65	8	1	<i>L. rhamnosus</i>	1	1	0.8
9	65	2	2	<i>L. plantarum</i>	2	1	0.8
10	15	2	1	<i>L. plantarum</i>	1	1	0.2
11	65	2	2	<i>L. rhamnosus</i>	1	2	0.2
12	15	2	1	<i>L. rhamnosus</i>	2	2	0.8
13	15	8	2	<i>L. plantarum</i>	1	2	0.8
14	15	8	2	<i>L.rhamnosus</i>	2	1	0.2
15	65	8	1	<i>L. plantarum</i>	2	2	0.2
16	65	8	1	<i>L. rhamnosus</i>	1	1	0.8

## b.2. Determinación del tiempo de fermentación

Para determinar el tiempo de fermentación de la bebida a base de lupino se estableció como parámetro deseado el valor de pH (4.5-4.7), que corresponde a un yogurt tradicional (FDA and Australia New Zealand Food Standard Code Recommendations) y a bebidas no lácteas (Bianchi *et al.* 2014; Lorusso *et al.* 2018). Así mismo, Ankenman y Morr (1996) mencionan que un valor de pH de 4.7 o menor es importante para conseguir una buena textura, sabor, aroma y estabilidad en tipo de productos.

Se plantearon las siguientes formulaciones preliminares: a) formulación 1: 66 % de lupino, 9 g de azúcar, 1 g de glucosa, 1 g de inulina, 0.2 g de CMC y 1 % de inóculo (Sayedboworn y Wanchaitanawong 2015) y b) formulación 2: 20 % de lupino, 2 g de azúcar, 1 g de glucosa, 1 g de inulina, 0.8 g de CMC y 1 % de inóculo. La formulación 1 se fermentó durante 18 h (Shirai *et al.* 1992) y la formulación 2 durante 12 h (Ludeña *et al.* 2016) usando las bacterias probióticas (*L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG).

### **b.3. Optimización de la bebida**

La bebida se optimizó mediante la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) (Gupta *et al.* 2010; Zanninia *et al.* 2018) usando como factores los identificados en la etapa de *Screening* y como variables respuestas la tasa de crecimiento de las bacterias probióticas y pH de la bebida 4.5-4.7. Los niveles de los factores usados en la optimización se muestran en el Cuadro 8. El Diseño central compuesto frontal ( $2^3$ ) con 4 punto centrales usado en la optimización se muestra en el Cuadro 9.

**Cuadro 8: Niveles mínimos y máximos de los factores para la optimización de la bebida**

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>		
	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Lupino (%)	20	30	40
Azúcar (%)	6	7	8

El diseño empleado en la elaboración de la bebida a base de lupino, en términos de variables sin codificar se muestra en la Cuadro 9.

**Cuadro 9: Diseño empleado para la optimización por el método de superficie respuesta**

<b>Ensayos</b>	<b>Lupino (%)</b>	<b>Azúcar (%)</b>	<b>Tasa de crecimiento (%)</b>	<b>pH</b>
1	30	8	-	-
2	30	7	-	-
3	20	6	-	-
4	30	7	-	-
5	20	7	-	-
6	40	7	-	-
7	40	8	-	-
8	30	7	-	-
9	30	7	-	-
10	30	6	-	-
11	20	8	-	-
12	40	6	-	-

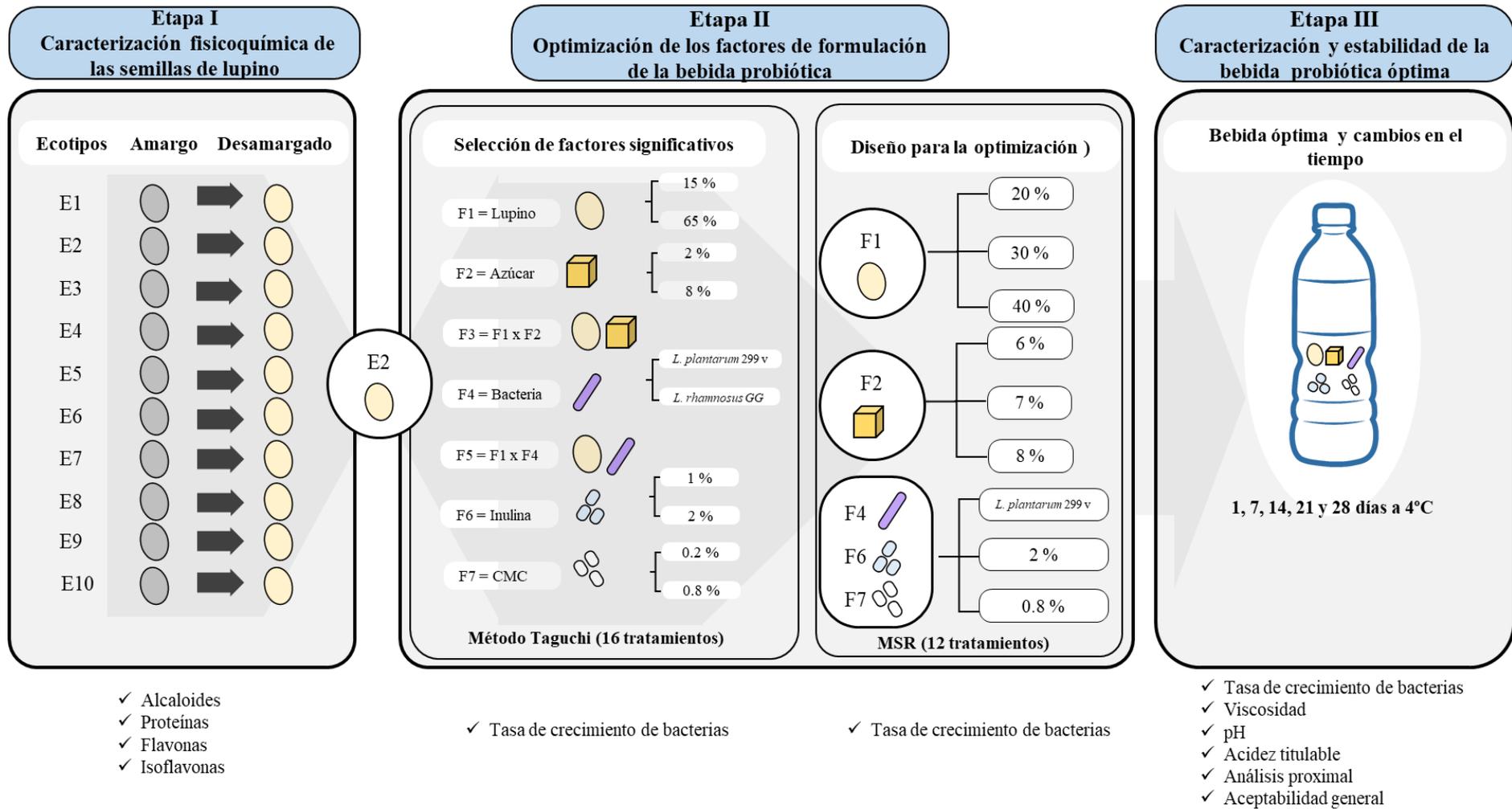
**c. Caracterización y estabilidad de la bebida probiótica: Etapa III**

**c.1. Evaluación sensorial**

Se realizaron pruebas de aceptabilidad general de la formulación óptima de la bebida probiótica, con la finalidad de evaluar la reacción del consumidor frente al producto final.

**c.2. Estabilidad durante el almacenamiento**

El pH, acidez, viscosidad y viabilidad de las bacterias de *L. plantarum* 299v se evaluaron en la formulación óptima a 1, 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a 4 °C de acuerdo a lo descrito para bebidas con fuentes no lácteas (Aragon-Alegro *et al.* 2007).



**Figura 11:** Diseño experimental para la obtención de la bebida probiótica de lupino.

### **3.6.2. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos realizados en el presente trabajo se agrupan de acuerdo a las tres etapas del diseño experimental:

#### **Etapa I:**

Los resultados del contenido de alcaloides, proteínas, compuestos fenólicos totales y flavonoides (isoflavonas y flavonas) fueron analizados mediante el Diseño Completamente al Azar (DCA), para evaluar las diferencias entre los diez ecotipos. Si el ANOVA del DCA es significativo, se realizó la prueba HSD de Tukey para la comparación de medias. Los análisis estadísticos se realizaron, utilizando el software Statgraphics 18 (Statistical Graphics, Washington, DC, EE. UU.).

#### **Etapa II:**

- La identificación de los factores significativos en la elaboración de la bebida se realizó mediante la metodología Taguchi con un arreglo ortogonal  $L_8(2^7)$ , para ello se utilizó el software statistica v.7 (SatSoft Inc., USA)
- La optimización de los parámetros de formulación de la bebida se realizó mediante el Método de Superficie Respuesta con un Diseño central compuesto frontal ( $2^3$ ), con 4 punto centrales (12 experimentos) usando el software Desing expert (Versión 11) (Stat-Ease Corporation, EE.UU.). Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS SEMILLAS DE LUPINO

#### 4.1.1. Caracterización físico-química de las semillas de lupino

##### a. Composición químico proximal

La composición químico proximal de los 10 ecotipos antes del proceso de desamargado se muestran en el Cuadro 10. Se observa que el ecotipo Altagracia presenta mayor contenido de proteínas (E2 = 49.3 %) comparado a los otros ecotipos, y el de menor contenido el ecotipo Huánuco I (E5 = 45.2 %). Dichas diferencias pueden estar asociados con factores genéticos y agronómicos (Roder *et al.* 2013; Carvajal-Larenas *et al.* 2016). El contenido de proteínas promedio en los 10 ecotipos fue de 47.3 %, valor que se encuentra dentro del rango de 32.0-52.6 % reportado por Carvajal-Larenas *et al.* (2016). Así mismo, es mayor respecto a otras variedades como *L. albus* (38.2 %), *L. angustifolius* (33.95 %) y *L. luteos* (42.2 %) (Jiménez- Martínez *et al.* 2003b). Respecto al contenido de grasa, el ecotipo con mayor contenido fue Andenes INIA (E9 = 20.8 %), proveniente del Departamento de Cusco y el de menor concentración fue el ecotipo Yunguyo de Puno (E10 = 15.3 %). El contenido de grasa promedio de los 10 ecotipos fue 17.8 %, encontrándose este valor dentro del rango de 13.0 a 24.6 % reportado por Carvalho *et al.* (2005). El promedio del contenido de cenizas en los 10 ecotipos fue de 3.7 %, resultados que concuerdan con los reportados por Güémes-Vera *et al.* (2008).

El ecotipo con mayor contenido de carbohidratos fue Huánuco I (E5 = 34 %), y el de menor contenido el ecotipo de Cusco (E9 = 27.7 %). El promedio del contenido de carbohidratos fue 31.1 %, que se encuentra dentro de los valores de 26.1 y 43.2 % reportados por Jiménez- Martínez *et al.* (2003b). Respecto al contenido de ceniza dentro de los 10 ecotipos evaluados, el ecotipo con mayor contenido de ceniza fue E5 con 4.9 %, proveniente de Huánuco y con menor contenido los ecotipos E2 de la Libertad y E6, E7 de Junín.

**Cuadro 10: Composición químico proximal de 10 ecotipos de lupinos (*Lupinus mutabilis* Sweet) sin desamargar (porcentaje en base seca)**

Ecotipos	Materia seca (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Ceniza (%)	Carbohidratos (%)
<b>E1</b>	90.1±0.03	46.8±0.06 <sup>c</sup>	15.9±0.01 <sup>b</sup>	3.8±0.01 <sup>d</sup>	33.4±0.03 <sup>h</sup>
<b>E2</b>	90.2±0.02	49.3±0.06 <sup>h</sup>	17.3±0.03 <sup>c</sup>	3.2±0.03 <sup>ab</sup>	30.1±0.06 <sup>c</sup>
<b>E3</b>	90.2±0.02	48.5±0.06 <sup>g</sup>	18.5±0.06 <sup>e</sup>	3.5±0.03 <sup>c</sup>	29.5±0.15 <sup>b</sup>
<b>E4</b>	90.6±0.03	45.4±0.03 <sup>b</sup>	18.1±0.03 <sup>d</sup>	3.8±0.02 <sup>d</sup>	32.7±0.08 <sup>g</sup>
<b>E5</b>	90.1±0.03	45.2±0.02 <sup>a</sup>	15.9±0.03 <sup>b</sup>	4.9±0.01 <sup>h</sup>	34.0±0.06 <sup>i</sup>
<b>E6</b>	90.3±0.03	47.4±0.07 <sup>de</sup>	19.0±0.05 <sup>f</sup>	3.1±0.03 <sup>a</sup>	30.5±0.10 <sup>d</sup>
<b>E7</b>	90.6±0.02	47.7±0.05 <sup>f</sup>	18.9±0.03 <sup>f</sup>	3.2±0.03 <sup>b</sup>	30.2±0.04 <sup>c</sup>
<b>E8</b>	90.4±0.03	47.2±0.06 <sup>d</sup>	18.1±0.06 <sup>d</sup>	3.5±0.03 <sup>c</sup>	31.2±0.15 <sup>e</sup>
<b>E9</b>	89.5±0.03	47.4±0.03 <sup>e</sup>	20.8±0.04 <sup>g</sup>	4.1±0.01 <sup>e</sup>	27.7±0.01 <sup>a</sup>
<b>E10</b>	89.5±0.02	48.5±0.04 <sup>g</sup>	15.3±0.04 <sup>a</sup>	4.3±0.03 <sup>f</sup>	31.9±0.05 <sup>f</sup>

Resultados expresados como promedio ± desviación estándar.

Valores con letras diferentes (a-i) dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

E1: ecotipo Cajamarca; E2: ecotipo Altagracia de Otuzco-La Libertad; E3: ecotipo Paton grande de La Libertad; E4: ecotipo Cholo fuerte de Ancash; E5: ecotipo Huánuco I de Santa Rosa-Marambuco; E6: ecotipo Compuesto blanco semi precoz INIA; E7: ecotipo H6 INIA; E8: ecotipo Moteado beige de Junín; E9: ecotipo Andenes INIA de Cusco y E10: ecotipo Yunguyo de Puno.

Respecto a las semillas desamargadas, al comparar la concentración de proteínas en los Cuadro 10 y 11, se observan que tienen una mayor concentración de proteínas comparado a las semillas sin desamargar. El proceso de desamargado acuoso puede inducir a cambios en la composición química de los lupinos al disminuir carbohidratos, alcaloides, taninos, entre otros compuestos soluble en agua lo que permite el aumento relativo de la proteína (Villacrés *et al.* 2000; Carbajal-Larenas *et al.* 2016). Así mismo, el pH y la temperatura influyen en la desnaturalización de las proteínas y la disminución de la solubilidad Jiménez-Martínez *et al.* (2001). El contenido de proteína expresada en base seca difiere estadísticamente entre cada ecotipo, siendo el ecotipo Altagracia proveniente de La Libertad-norte del Perú (E2), el que presenta mayor contenido (52.2 %) y el de menor concentración (48.0 %) el ecotipo Huánuco I de Santa Rosa- Marambuco del centro del Perú (Cuadro 10). El promedio del contenido de proteínas en las semillas desamargadas es 50.2 %, valor que se encuentra dentro del rango (51.1 -72.0 %) reportado en trabajos anteriores (Villacrés *et al.* 2000; Carbajal-Larenas *et al.* 2016). Referido a otros componentes Curti *et al.* (2018), mencionan que el proceso de

desamargado modifica el contenido de ácidos grasos; así el contenido ácido esteárico aumenta y el contenido de ácido linoleico y la relación w-6/w-3 disminuye.

**Cuadro 11: Análisis de proteína de 10 ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) desamargados (porcentaje en base seca)**

Ecotipos	Materia seca (%)	Proteína (%)
E1	93.5±0.05	49.5±0.00 <sup>c</sup>
E2	93.4±0.05	52.2±0.03 <sup>h</sup>
E3	93.5±0.02	51.3±0.06 <sup>g</sup>
E4	93.9±0.02	48.3±0.03 <sup>b</sup>
E5	93.4±0.07	48.0±0.08 <sup>a</sup>
E6	93.5±0.01	50.3±0.06 <sup>e</sup>
E7	93.5±0.02	50.7±0.05 <sup>f</sup>
E8	93.6±0.01	50.1±0.05 <sup>d</sup>
E9	92.8±0.01	50.2±0.04 <sup>e</sup>
E10	92.8±0.02	51.3±0.04 <sup>g</sup>

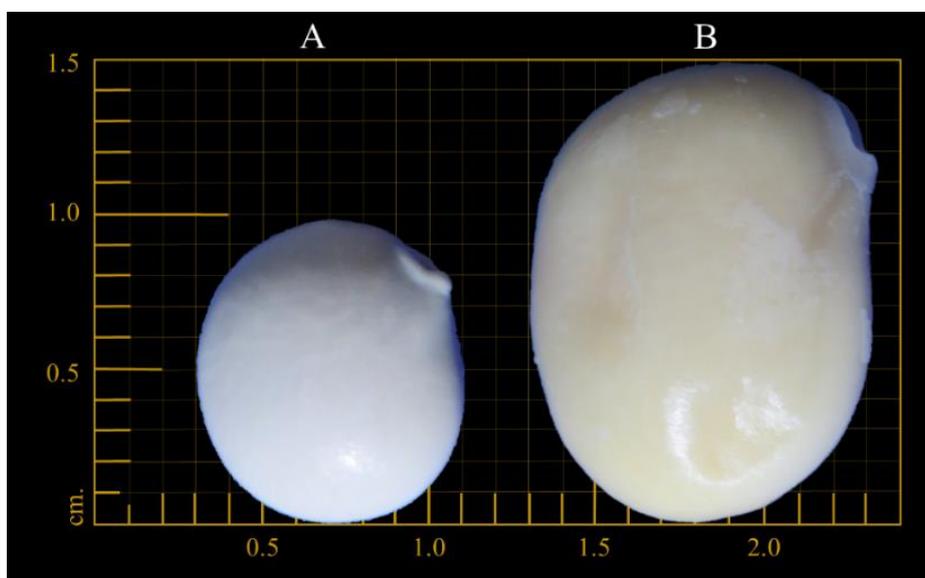
Valores expresados como promedio ± desviación estándar. Valores con letras diferentes (a-h) dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p < 0.05$ ).

E1: ecotipo Cajamarca; E2: ecotipo Altagracia de Otuzco-La Libertad; E3: ecotipo Paton grande de La Libertad; E4: ecotipo Cholo fuerte de Ancash; E5: ecotipo Huánuco I de Santa Rosa-Marambucó; E6: ecotipo Compuesto blanco semi precoz INIA; E7: ecotipo H6 INIA; E8: ecotipo Moteado beige de Junín; E9: ecotipo Andenes INIA de Cusco y E10: ecotipo Yunguyo de Puno.

## b. Tamaño

Las semillas de lupino del ecotipo Altagracia a una humedad de 9.8 % presentaron una estructura rígida y con el proceso de desamargado las semillas incrementaron su humedad a 71.98 % haciéndolas más suave y consecuentemente más sensibles a procesos mecánicos. Así mismo, Jiménez-Martínez *et al.* (2001) menciona que el remojo y la cocción de las semillas aumentan la permeabilidad de la pared celular. Similar comportamiento ha sido observado en diferentes frijoles adzuki (Oliveira *et al.* 2013). Al respecto, Miano *et al.* (2015) mencionan que la humedad aumenta con el tiempo de remojo del grano, describiendo un comportamiento sigmoidal, con una fase de retraso inicial seguida de una fase de mayor tasa de absorción y, finalmente, una fase estacionaria. En cuanto al tamaño, las semillas sin desamargar midieron, 1 y 0.8 cm de largo y ancho respectivamente, mientras que las semillas desamargadas incrementaron su tamaño a 1.5 y 1 cm largo y ancho respectivamente (Figura

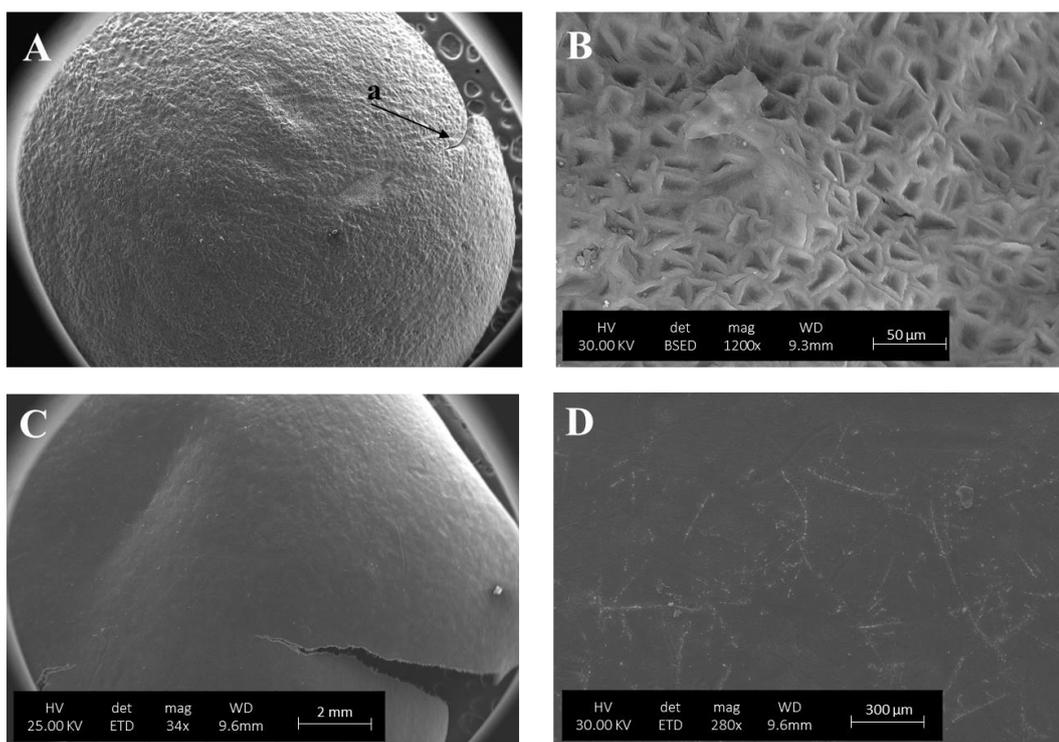
12). Ortega *et al.* (2010) mencionan que el agua absorbida es almacenada en la estructura porosa de las semillas, hidratando el interior de las células y los espacios entre las paredes celulares. Esto produce un aumento en el volumen total y cambios en tamaño y estructura no reversibles cuando las semillas son secadas nuevamente.



**Figura12:** Semillas de *Lupinus mutabilis* S. Ecotipo Altagracia: A) sin desamargar hidratadas, B) desamargadas.

### c. Microestructura

Las imágenes SEM de las semillas sin desamargar del ecotipo Altagracia mostraron diferencias estructurales entre la cáscara y el cotiledón (Figura 13). El cotiledón (Figura 13A y B) presenta una superficie rugosa, y al ser magnificada (1200x) se puede observar una estructura porosa con cavidades triangulares ordenadas homogéneamente. Estas estructuras sumadas al hilum facilitarían el ingreso de solventes y la salida de solutos presentes en el grano. Miano *et al.* (2015) han confirmado que el hilum y fisura hiliar es la entrada principal de agua al grano. Por otro lado, la cáscara muestra una apariencia lisa (Figura 13 C y D), a un mayor aumento (280x) la estructura es bastante plana. Al respecto Miano *et al.* (2015), señalan que la superficie de la cubierta de la semilla está revestida por una cutícula que contiene diferentes tipos de sustancias hidrofóbicas tales como cera, polisacáridos de lignina, pectina, callos, quinonas, suberina, cutina que afectan la permeabilidad de las semillas de lupino. Finalmente, la cubierta también contiene los compuestos fenólicos muy similares a semillas de otras legumbres (Patterson *et al.* 2017).



**Figura 13:** Micrografía de la semilla sin desamargar: A) Cotiledón (34x), a: Hilum; B) Ampliación del cotiledón (1200x); C) Cáscara (34x); D) Ampliación de cáscara (280x).

#### 4.1.2. Metabolitos secundarios

##### a. Identificación y cuantificación de alcaloides en semillas sin desamargar y desamargadas

###### • Alcaloides individuales en las semillas sin desamargar y desamargadas

Los alcaloides individuales fueron identificados por GC-MS en función de sus iones característicos y por los tiempos de retención de los estándares. En las semillas sin desamargar se identificaron ocho alcaloides, tales como: esparteína, angustifolina,  $\alpha$ -isolupanina, lupanina, nutallina, multiflorina, oxilupanina y 11, 12-dehidrolupanina (Cuadro 12). El perfil obtenido para los ecotipos estudiados fue similar a los hallazgos de estudios anteriores de Muzquiz *et al.* (1994) y Wink *et al.* (1995). Aunque se han descrito otros alcaloides tales como 13-hidroxilupanina, 17-oxosparteína y 11,12-deshidrosparteína en *L. mutabilis* (Hatzold *et al.* 1983; Gross *et al.* 1988), que no se identificaron en los ecotipos investigados. Algunos de los alcaloides detectados en las semillas estudiadas también son comunes en otras especies, como angustifolina, lupanina y esparteína en semillas de *L. albus*, esparteína en *L. luteus*, lupanina en *L. hispanicus* y angustifolina en *L. angustifolius* (Jiménez-Martínez *et al.* 2001; Romeo *et al.* 2018).

**Cuadro 12: Perfil de alcaloides en los ecotipos y parámetro de lipofilia (Log P)**

Picos	Alcaloides	Iones identificados	M <sup>+</sup>	ID	RI /Exp	RI/Lit	Log P
1	Cafeína (Estándar interno)	194/109/82/67/55	194	S	-	-	-
2	Esparteína	98/137/193/234	234	S	1803	1785	2.5
3	Angustifolina	55/94/112/150/193	234	S	2093	2083	1.4
4	α- Isolupanina	55/98/136/149/219/248	248	S	2122	2105	1.6
5	Lupanina	55/98/136/149/248	248	S	2176	2165	1.6
6	Nutallina	98/136/150/247/264	264	T	2271	2255	0.6
7	Multiflorina	55/110/134/149/246	246	T	2328	2310	1.5
8	Oxilupanina	55/134/152/165/246/264	264	T	2423	2410	0.6
9	11,12- Dehidrolupanina	134/148/231/246	246	T	2573	2190	1.5

**M<sup>+</sup>**: ion molecular; **RI/Exp**: Índice de retención obtenido en el experimento, calculado de acuerdo a Kovats [30]:  $100 (tc - tn / (tn+1) - tn) + n$ , donde  $tc$  es el tiempo de retención del compuesto,  $tn$  es el tiempo de retención anterior  $n$ -alcano,  $tn+1$  es el tiempo de retención del siguiente  $n$ -alcano and  $n$  es el anterior  $n$ -alcano; **RI/Lit**: Índice de retención descrito en la literatura por Wink *et al.* (1995); **ID**: Identificación; **S**: Identificado por comparación con un estándar autentico, **T**: Identificación tentativa por comparación de espectros de masa y RI en la literatura Wink *et al.* (1995) y NIST 05 base de datos. **Log P**: Valor del parámetro de lipofilia, Calculado por XLogP3 3.0

Por otro lado, se presenta el parámetro de lipofilia (Log P) de los alcaloides individuales identificados (Cuadro 12), este parámetro muestra las posibles relaciones entre estructura y actividad (SAR). Se observa que la esparteína tiene el log P más alto (2,5) en comparación a los otros alcaloides tales como lupanina,  $\alpha$ -isolupanina, 11, 12-dehidrolupanina, multiflorina y angustifolina con un promedio de Log P (1,5). Los alcaloides con los valores más bajos de Log P fueron la nutallina y la oxilupanina. Es importante resaltar que los alcaloides con Log P más alto son más hidrófobos, propiedad que facilita la entrada de los alcaloides a las células a través de las membranas celulares hidrófobas (Kučerka *et al.* 2019).

Respecto al contenido de alcaloides individuales en las semillas sin desamargar de los diez ecotipos, se encontró como alcaloide principal a la lupanina con un contenido entre 2.5-5.2 g/100 g en b.s. constituyendo en promedio el 77.2 % de los alcaloides totales (Cuadro 13). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Gross *et al.* (1988) que mencionan que la lupanina es el principal alcaloide en *L. mutabilis*, y representa más del 80 % de los alcaloides totales. Así mismo, Rybiński *et al.* (2018) encontraron que la lupanina en *L. albus* representa el 71.3 % de los alcaloides totales, siendo este valor más bajo en comparación con el nivel reportado en *L. mutabilis*. Entre los ecotipos estudiados, E8 (Moteado beige de Junin) tuvo mayor contenido de lupanina y alcaloides totales. El segundo alcaloide más abundante fue esparteína con un rango de concentración de 0.2-0.9 g/100 g en b.s., resultado similar a estudios de composición de alcaloides en semillas de *L. mutabilis* (Hatzold *et al.* 1983). La esparteína representó en promedio el 9.9 % del total de alcaloides, y el ecotipo con el mayor contenido de esparteína fue E5 (Huánuco I). Los alcaloides presentes en proporciones más pequeñas incluyen la angustifolina y la multiflorina, ambos presentes en un nivel promedio de 0.1 % de los alcaloides totales (Cuadro 13). Las proporciones relativas de estos dos alcaloides son más bajas en comparación con las reportadas anteriormente para *L. albus* (angustifolina 3.8 % y multiflorina 6.8 % del total de alcaloides) (Rybiński *et al.* 2018). Finalmente, otros alcaloides presentes en los diez ecotipos amargos incluyen  $\alpha$ -isolupanina, nutallina, oxilupanina y 11,12-dehidrolupanina, que representan en promedio 0.4, 6.8, 4.0 y 1.4 % del total de alcaloides, respectivamente.

**Cuadro 13: Alcaloides en semillas de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) sin desamargar y desamargadas, determinadas por CG- FID (g/100 g b.s)**

Semillas	Ecotipos	Alcaloides individuales <sup>a</sup>							
		Esparteína	Angustifolina	$\alpha$ - Isolupanina	Lupanina	Nuttalina	Multiflorina	Oxilupanina	11,12-Dehidrolupanina
Sin desamargar	E1	0.640±0.008 <sup>f</sup>	0.005±0.000 <sup>bc</sup>	0.015±0.000 <sup>c</sup>	2.958±0.008 <sup>b</sup>	0.452±0.006 <sup>f</sup>	0.012±0.000 <sup>e</sup>	0.177±0.006 <sup>bc</sup>	0.083±0.003 <sup>d</sup>
	E2	0.421±0.005 <sup>d</sup>	0.004±0.000 <sup>a,b</sup>	0.021±0.000 <sup>d</sup>	4.307±0.146 <sup>d</sup>	0.505±0.008 <sup>g</sup>	0.003±0.000 <sup>b</sup>	0.141±0.011 <sup>ab</sup>	0.052±0.000 <sup>b</sup>
	E3	0.592±0.017 <sup>e</sup>	0.013±0.000 <sup>g</sup>	0.012±0.001 <sup>ab</sup>	4.262±0.179 <sup>d</sup>	0.546±0.015 <sup>h</sup>	0.008±0.000 <sup>d</sup>	0.220±0.014 <sup>cd</sup>	0.077±0.003 <sup>cd</sup>
	E4	0.774±0.029 <sup>g</sup>	0.003±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>bc</sup>	3.322±0.014 <sup>c</sup>	0.375±0.030 <sup>e</sup>	0.010±0.000 <sup>d</sup>	0.099±0.001 <sup>a</sup>	0.031±0.000 <sup>a</sup>
	E5	0.890±0.017 <sup>h</sup>	0.007±0.000 <sup>e</sup>	0.010±0.000 <sup>a</sup>	2.504±0.044 <sup>a</sup>	0.281±0.008 <sup>cd</sup>	0.006±0.000 <sup>c</sup>	0.160±0.008 <sup>b</sup>	0.047±0.001 <sup>ab</sup>
	E6	0.274±0.004 <sup>b</sup>	0.009±0.000 <sup>f</sup>	0.027±0.000 <sup>e</sup>	4.164±0.026 <sup>d</sup>	0.314±0.004 <sup>d</sup>	0.001±0.000 <sup>a</sup>	0.263±0.016 <sup>de</sup>	0.099±0.003 <sup>e</sup>
	E7	0.423±0.008 <sup>d</sup>	0.009±0.000 <sup>f</sup>	0.019±0.000 <sup>d</sup>	3.354±0.061 <sup>c</sup>	0.262±0.008 <sup>bc</sup>	0.003±0.000 <sup>b</sup>	0.233±0.013 <sup>cd</sup>	0.062±0.002 <sup>bc</sup>
	E8	0.196±0.002 <sup>a</sup>	0.009±0.000 <sup>ef</sup>	0.027±0.000 <sup>e</sup>	5.231±0.045 <sup>f</sup>	0.145±0.003 <sup>a</sup>	0.001±0.001 <sup>a</sup>	0.294±0.016 <sup>e</sup>	0.073±0.003 <sup>cd</sup>
	E9	0.377±0.003 <sup>c</sup>	0.009±0.000 <sup>f</sup>	0.020±0.000 <sup>d</sup>	4.771±0.065 <sup>e</sup>	0.236±0.010 <sup>b</sup>	0.001±0.000 <sup>a</sup>	0.266±0.026 <sup>de</sup>	0.099±0.001 <sup>e</sup>
	E10	0.367±0.014 <sup>c</sup>	0.005±0.000 <sup>d</sup>	0.016±0.002 <sup>c</sup>	3.612±0.261 <sup>c</sup>	0.275±0.022 <sup>bcd</sup>	0.001±0.000 <sup>a</sup>	0.149±0.047 <sup>ab</sup>	0.069±0.016 <sup>cd</sup>
Desamargadas	E1	0.002±0.000 <sup>e</sup>	n/d	n/d	0.003±0.000 <sup>c</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E2	0.001±0.000 <sup>bc</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E3	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E4	0.002±0.000 <sup>d</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E5	0.001±0.000 <sup>ab</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E6	0.001±0.000 <sup>bc</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E7	0.001±0.000 <sup>bc</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E8	0.001±0.000 <sup>ab</sup>	n/d	n/d	0.002±0.000 <sup>b</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E9	0.001±0.000 <sup>c</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d
	E10	0.001±0.000 <sup>ab</sup>	n/d	n/d	0.001±0.000 <sup>a</sup>	n/d	n/d	n/d	n/d

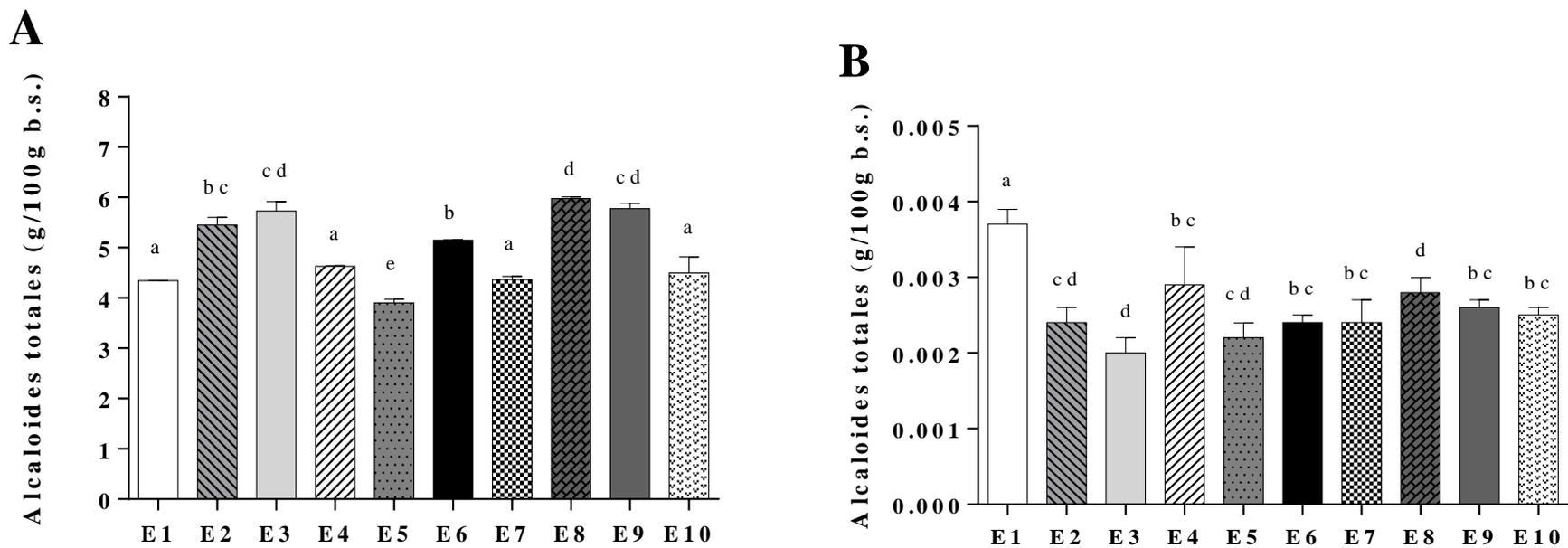
<sup>a</sup>Valores expresados como promedio ± desviación estándar. Valores con letras diferentes (a-h) dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p < 0.05$ ); n/d = no detectado (es decir por debajo del límite de detección), b.s: base seca.

E1: ecotipo Cajamarca; E2: ecotipo Altagracia de Otuzco-La Libertad; E3: ecotipo Paton grande de La Libertad; E4: ecotipo Cholo fuerte de Ancash; E5: ecotipo Huánuco I de Santa Rosa-Marambuco; E6: ecotipo Compuesto blanco semi precoz INIA; E7: ecotipo H6 INIA; E8: ecotipo Moteado beige de Junín; E9: ecotipo Andenes INIA de Cusco y E10: ecotipo Yunguyo de Puno.

Posterior al proceso de desamargado, sólo se identificaron dos alcaloides predominantes, esparteína y lupanina en los diez ecotipos, mientras que no se detectaron los alcaloides que estaban presentes en concentraciones más bajas en las semillas sin desamargar. El Cuadro 13 muestra los contenidos de lupanina y esparteína de 0.001-0.002 y 0.001-0.003 g/100 g, respectivamente. Después del proceso de desamargado, el promedio del contenido de esparteína representa el 54% y lupanina el 46% de los alcaloides totales. Estos alcaloides (lupanina y esparteína), se redujeron en promedio de 99,9 y 99,7%, respectivamente. El nivel de disminución en el contenido de lupanina es muy similar al obtenido por Santana *et al.* (1996), quienes reportaron la eliminación del 99% del contenido inicial de lupanina presente en las semillas de *L. albus* después de un proceso de fermentación. Durante la fermentación, las bacterias utilizan la lupanina como fuente de carbono y energía.

- **Alcaloides totales en semillas sin desamargar y desamargadas**

El contenido total de alcaloides en las semillas de lupino sin desamargar se muestra en la Figura 14A. Todos los ecotipos pueden considerarse variedades amargas, por su contenido de alcaloides  $\geq 5$  g/100 g en b.s., mientras que el contenido en variedades no amargas generalmente está entre 0.01-0.05 g/100 g en b.s. (Jiménez-Martínez *et al.* 2007). Los ecotipos con mayor contenido de alcaloides fueron E2, E3, E6, E8 y E9, cada uno de los cuales alcanzó un nivel cercano a 6 g/100 g en b.s. Los ecotipos E2 y E3 eran de la misma región, pero de diferentes altitudes (3350 y 3496 metros a nivel del mar, respectivamente), mientras que los ecotipos E6 y E8 eran de la parte central del Perú y el ecotipo E9 del sur de Perú, pero todos fueron cultivados a altitudes similares. Los ecotipos que contenían niveles intermedios de alcaloides (cerca del 5 g/100 g en b.s.) fueron E1, E4, E7 y E10, y el ecotipo que contenía menos alcaloides fue E5 con un contenido total de 4 g/100 g en b.s. Ecotipos con mayor contenido de alcaloides se cultivan en lugares a más de 3280 metros sobre el nivel del mar, en estas zonas alto andinas, el clima es seco, templado y con baja humedad, favoreciendo la acumulación de los alcaloides (Carvajal-Larenas *et al.* 2016). El contenido de alcaloides es menor en los ecotipos cultivados a una altitud inferior a 3271 m.s.n.m y superior a 3761 m.s.n.m. Estas diferencias pueden estar influenciadas por las diferencias varietales, distribución de alcaloides en la planta y el tipo suelo de cultivo (Frick *et al.* 2018).



**Figura 14:** Contenido de alcaloides totales en los diez ecotipos de *Lupinus mutabilis*. **(A)** Antes del proceso de desamargado; **(B)** después del proceso de desamargado. Las barras representan la desviación estándar de tres réplicas independientes. Los valores con letras diferentes (a-e) difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

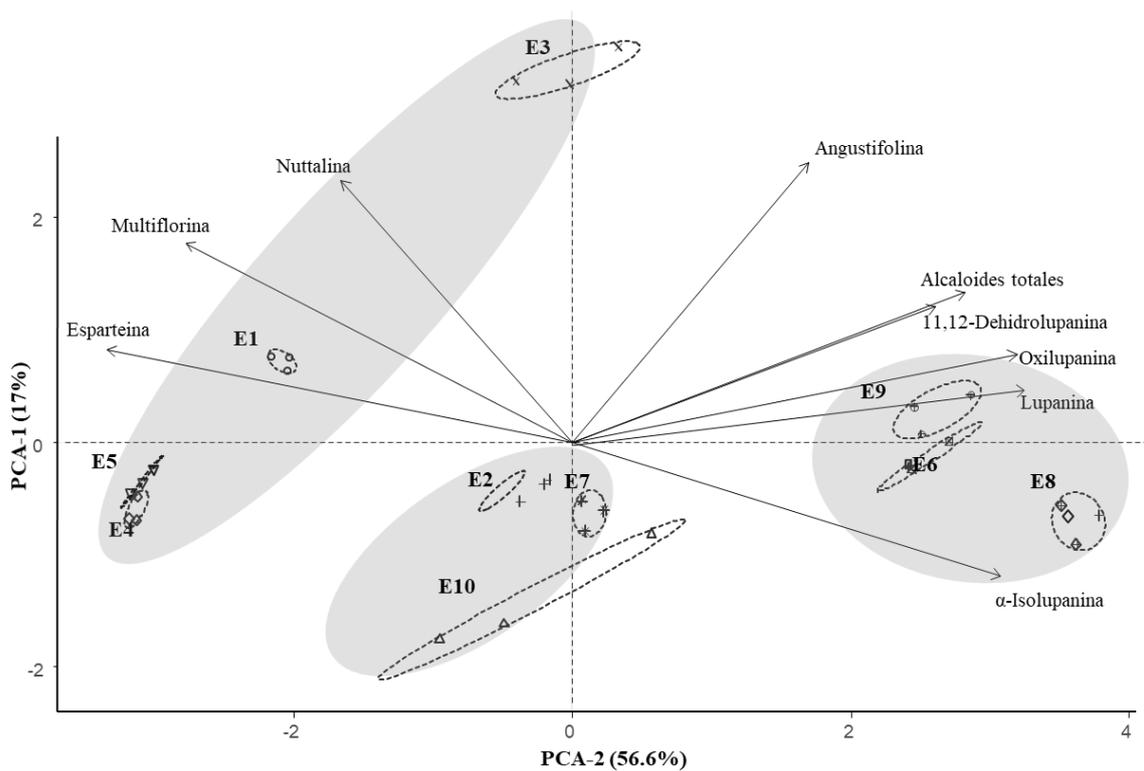
El contenido de alcaloides totales en las semillas sin desamargar fue de 4 a 6 g/100 g b.s., siendo este resultado mayor comparado a los reportados en estudios previos de semillas de *L. mutabilis*. Al respecto, Hatzold *et al.* (1983) reportaron contenidos totales de alcaloides de 3.1 % en *L. mutabilis*. Así mismo, Gross *et al.* (1988) reportaron niveles bajos en variedades modificadas de *L. mutabilis* ("Inti" 0.0075% y "2150" 0.015%). El nivel de alcaloides totales de los ecotipos resultó ser mayor a otras variedades tales como *L. campestri*, *L. angustifolius*, *L. hispanicus*, *L. luteus* y *L. albus* (1.9 a 2.7 %) (Jiménez-Martínez *et al.* 2007).

En relación al contenido de alcaloides totales en las semillas desamargadas se muestran en la Figura 14B. Todos los ecotipos presentaron contenidos de alcaloides residuales muy bajos con promedio de 0.003 g/100 g en b.s. Los niveles residuales en las semillas desamargadas son mucho más bajos que el límite permisible (20 mg/100 g) para el consumo humano y animal (Calabrò *et al.* 2015). La disminución de los alcaloides en las semillas desamargadas se debe a la solubilización en agua y la degradación térmica de los alcaloides y el incremento de la permeabilidad del tegumento, lo que facilita la eliminación de los alcaloides (Jimenez-Martínez *et al.* 2001; Frick *et al.* 2018). Así mismo, se puede observar que existen diferencias en el porcentaje de disminución de alcaloides entre los ecotipos después del desamargado, que explicarse por las diferencias en la estructura y composición del grano (Miano *et al.* 2015).

- **Distribución de los alcaloides en los diferentes ecotipos**

Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) para identificar patrones en el conjunto de datos que resaltan las posibles similitudes y diferencias entre los ecotipos de lupino, en términos de composición de alcaloides. Se retuvieron dos componentes principales (PC), correspondientes a valores propios que explicaban el 73,6% de la variabilidad total de los datos. El primer componente (PC1) fue responsable del 17% de la variación, explicado principalmente por esparteína, nuttalina y multiflorina (Figura 15), mientras que el componente dos (PC2) representó el 56.6% de la variación y se asoció con el contenido total de alcaloides y con los compuestos como lupanina, oxilupanina, angustifolina,  $\alpha$ -isolupanina y 11,12-dehidrolupanina. Como se muestra en la Figura 15, los ecotipos de lupino estudiados se dividieron en tres grupos. Un grupo incluye E8, E9 y E6 por presentar niveles más altos de lupanina, oxilupanina, angustifolina,  $\alpha$ -isolupanina y 11,

12-dehidrolupanina, y un contenido más bajo de esparteína. E1, E3, E4 y E5 forman otro grupo, del cual E1 y E3 tienen menos esparteína, pero más multiflorina y nuttalina en comparación a otros ecotipos. E4 y E5 aparecen en el lado negativo de PC1 y PC2 con un bajo contenido de lupanina,  $\alpha$ -isolupanina, oxilupanina, angustifolina y 11, 12 dehidrolupanina, pero con mayor contenido de esparteína en comparación con otros ecotipos. E2, E7 y E10 son similares con respecto a cada alcaloide. Los ecotipos con contenidos más altos de lupanina tenían menor contenido de esparteína, mostrando una relación inversa entre los contenidos de los dos alcaloides principales. En el futuro, los alcaloides aislados se pueden seleccionar para aplicaciones farmacológicas y fertilizantes. Para este propósito, se pueden tomar semillas de las regiones altoandinas de Junín y Huánuco, que tienen un alto contenido de alcaloides totales con mayor contenido de lupanina y esparteína, respectivamente.



**Figura 15.** Proyección de ecotipos de lupino y cargas por alcaloides en el plano compuesto por componentes principales PC1 y PC2 que explican el 73,6% de la varianza total.

## **b. Identificación y cuantificación de isoflavonas y flavonas en semillas sin desamargar y desamargadas.**

### **• Selección del solvente y el método de extracción**

Para seleccionar el tipo solvente y el método de extracción de isoflavonas y flavonas se evaluaron 3 ecotipos de semillas de lupino sin desamargar en términos del contenido de compuestos fenólicos. Del Cuadro 14, se observa que existen diferencias significativas entre los 6 tratamientos (Método\*Solvente) ( $p < 0.05$ ) con excepción del ecotipo (E5) ( $p < 0.064$ ) para la extracción de compuestos fenólicos. Por otro lado, no existe diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración de compuestos fenólicos de los ecotipos E1, E5 y E7, al comparar los métodos de extracción (Ultraturrax y Sonicado). Sin embargo, si existe diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de solventes utilizados, obteniéndose la mayor concentración de compuestos fenólicos con el solvente S3 (metanol al 70 % acidificado), está comportamiento fue similar en los tres ecotipos. Estos resultados confirman que el metanol es más eficiente en la extracción de polifenoles de bajo peso molecular (Dai *et al.* 2010).

De acuerdo al comportamiento observado en los tres ecotipos durante las interacciones (método\*solvente), y efecto de cada factor (método y solvente) sobre la concentración de compuesto fenólicos. El presente estudio consideró elegir el método de Ultraturrax, en vista que utiliza un menor tiempo de extracción (factor eficiencia) y el solvente S3 (metanol al 70% acidificado), ya que con este nivel se obtienen mayor concentración de compuestos fenólicos en los tres ecotipos evaluados. El contenido de compuestos fenólicos de los tres ecotipos evaluados a las condiciones elegidas fluctúan entre 8.92 y 10.6 mg EAG /g en b.s. Valores similares han sido reportados por Chirinos *et al.* (2013a), quienes evaluaron 27 plantas peruanas dentro de ellas *Lupinus mutabilis* Sweet con un valor de 12.1 mg EAG /g b.s. Así mismo, al comparar con otras leguminosas como el garbanzo los resultados obtenidos fueron similares con valores de 10.8 mg de EAG /g (Sreerama *et al.* 2012).

**Cuadro 14: Efecto del método de extracción y el tipo de solvente en el contenido de compuestos fenólicos totales EAG (mg/100 g) de semillas sin desamargar**

Factores en estudio			Ecotipos		
Tratamiento	Método	Solvente	E1	E5	E7
T1		S1	9.30 ± 0.07 <sup>ab</sup>	7.72 ± 0.14 <sup>ab</sup>	7.52 ± 1.31 <sup>c</sup>
T2	Sonicado	S2	9.40 ± 0.01 <sup>ab</sup>	6.77 ± 1.54 <sup>b</sup>	9.61 ± 0.30 <sup>ab</sup>
T3		S3	9.80 ± 0.15 <sup>a</sup>	8.24 ± 0.12 <sup>ab</sup>	10.32 ± 0.13 <sup>a</sup>
T4		S1	7.91 ± 1.22 <sup>b</sup>	7.90 ± 0.31 <sup>ab</sup>	8.30 ± 0.20 <sup>bc</sup>
T5	Ultraturrax	S2	8.09 ± 0.83 <sup>b</sup>	7.31 ± 0.81 <sup>ab</sup>	7.35 ± 0.11 <sup>c</sup>
T6		S3	10.6 ± 0.06 <sup>a</sup>	8.92 ± 0.61 <sup>a</sup>	10.59 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>p</i> (Método*Solvente)			0.001	0.064	0.000
Efecto del Método		Sonicado	9.50 ± 0.25 <sup>a</sup>	7.57 ± 1.00 <sup>a</sup>	9.15 ± 1.43 <sup>a</sup>
		Ultraturrax	8.87 ± 1.50 <sup>a</sup>	8.04 ± 0.88 <sup>a</sup>	8.74 ± 1.45 <sup>a</sup>
<i>p</i> (Método)			0.228	0.305	0.561
Efecto del solvente		S1	8.60 ± 1.08 <sup>b</sup>	7.81 ± 0.23 <sup>ab</sup>	7.90 ± 0.94 <sup>b</sup>
		S2	8.74 ± 0.89 <sup>b</sup>	7.04 ± 1.14 <sup>b</sup>	8.48 ± 1.25 <sup>b</sup>
		S3	10.2 ± 0.45 <sup>a</sup>	8.58 ± 0.54 <sup>a</sup>	10.45 ± 0.17 <sup>a</sup>
<i>p</i> (Solvente)			0.009	0.009	0.001

Valores expresados como promedio ± desviación estándar.

Valores con letras diferentes (a-c) dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

S1: Acetona al 70%; S2: Metanol al 70%; S3: Metanol al 70 % acidificado

T1: Sonicado – S1; T2: Sonicado – S2; T3: Sonicado – S3; T4: Ultraturrax – S1; T5: Ultraturrax – S2 y T6: Ultraturrax – S3.

E1: ecotipo Cajamarca; E5: ecotipo Huánuco I de Santa Rosa-Marambuco; E7: ecotipo H6 INIA.

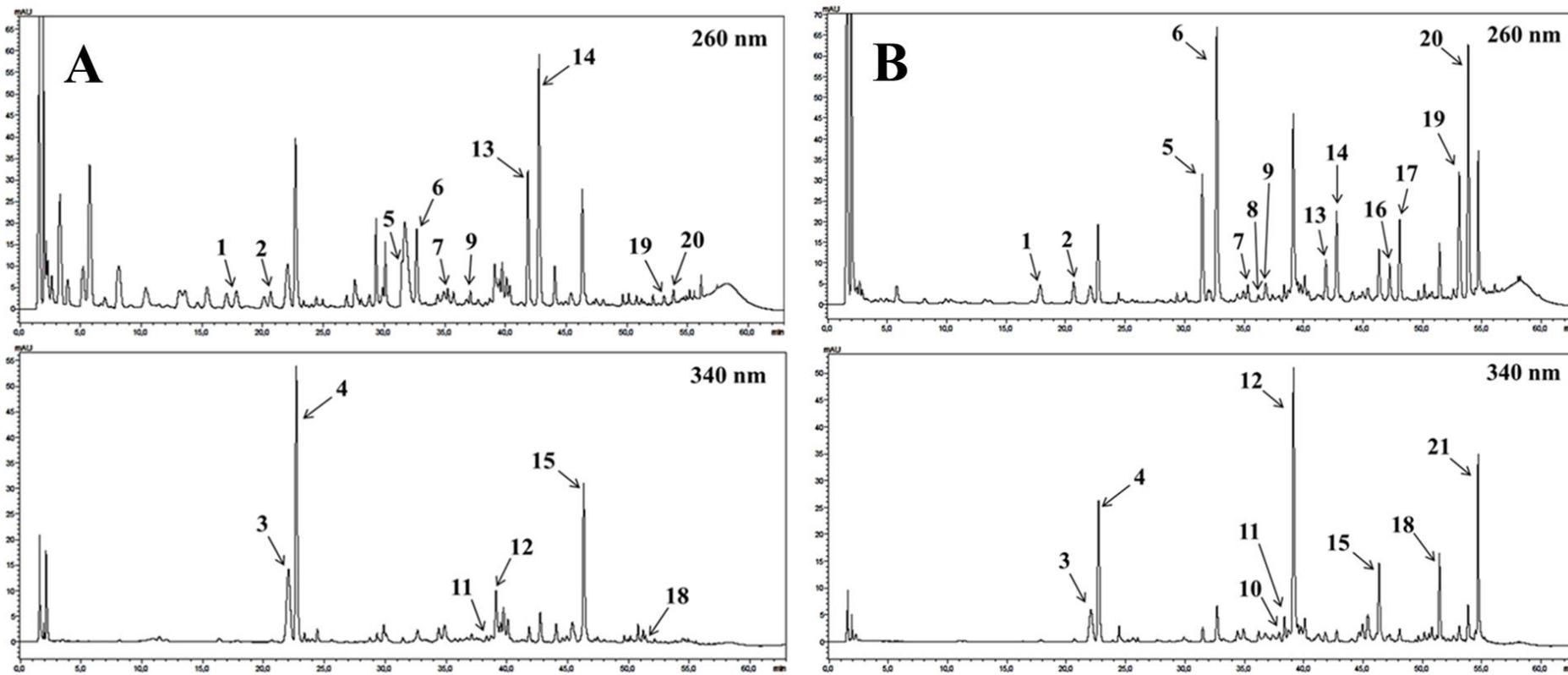
- **Identificación de isoflavonas y flavonas en las semillas sin desamargar y desamargadas por UPLC-DAD-MS<sup>2</sup>**

Las isoflavonas y flavonas en los extractos de lupino se caracterizaron en función de su máxima absorción UV, tiempo de retención en cromatografía líquida (LC), iones típicos de espectroscopía de masas MS e iones de fragmentos de MS. Estos datos cualitativos se compararon con los estándares de referencia y publicaciones anteriores. Como resultado, se identificaron 21 flavonoides (isoflavonas y flavonas) en las semillas sin desamargar y desamargadas. Los cromatogramas de LC de los extractos y la caracterización de los flavonoides se dan en la Figura 16 y el Cuadro 15, respectivamente. De acuerdo con estudios previos (Khan *et al.* 2015), la genisteína es la principal isoflavona en los extractos de lupino

tanto como aglicona y derivados glucosilados (Cuadro 15). Resultados que concuerdan con lo reportado por Gálvez *et al.* (2009), quienes detectaron genisteína y derivados de genisteína en las cáscaras y cotiledones de cultivares SLp-1, SLp-4 y H-6 de *L. mutabilis*. Probablemente las agliconas de genisteína y derivados glucosilados pudieron ser mutabileína y mutabilina, respectivamente como se reportó en semillas de *L. mutabilis* (Dini *et al.* 1998). En el presente estudio los derivados de genisteína estaban presentes como mono-, di- y trisacáridos como restos de azúcar. Basado en el patrón de fragmentación de la generación de iones  $[M+H\text{-acilado de azúcar}]^+$ . Kachlicki *et al.* (2016), encontraron ciertos monosacáridos acilados con ácidos alifáticos, principalmente como malonilhexósido ( $[M+H-248]^+$ ) y acetilhexósido ( $[M+H-204]^+$ ). Estos sustituyentes de azúcar podrían haberse unido sólo a los grupos hidroxilo de la genisteína aglicona. Esta identificación se basó en lo reportado por Waridel *et al.* (2001) que demostraron que los O-glucósidos de los flavonoides no producían iones de fragmentos  $[M+H-120]^+$  en comparación con sus contrapartes C-glucosiladas. Dentro de las isoflavonas mencionadas en el presente estudio, cabe resaltar que los compuestos 8, 16 y 17 sólo se presentaron en semillas desamargadas.

Adicionalmente, en el presente estudio se encontraron varias isoflavonas desconocidas. El Anexo 2, muestra un compuesto desconocido de isoflavona (compuesto 20) que exhibe una absorción máxima típica de UV a una longitud de onda de 260 nm. En comparación con la genisteína aglicona, la diferencia de 30 Da en el peso molecular podría indicar la presencia de un grupo metoxilo en el compuesto desconocido. Sin embargo, cuando se probó un estándar de tectorigenina, esta no coincidía, aunque tenía un grupo metoxilo más en el carbono seis (C6) del anillo A que la genisteína. Otra posibilidad es que el compuesto desconocido sea 3'-O-metillobol (5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi-isoflavona), que se aislaron previamente de extractos de hojas de lupino blanco (*L. albus*, cv. Kievskij Mutant) descrito por Tahara *et al.* (1984). Kachlicki *et al.* (2005), estudiaron las raíces de tres especies de altramuces (*L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*) usando LC/UV y LC/ESI/MS<sup>n</sup>, los resultados sugirieron que la 2'-hidroxigenisteína junto con sus glucósidos fueron las principales isoflavonas en los extractos. Este grupo de compuestos también se encuentran en semillas y tejidos foliares de especies de altramuces (Stobiecki *et al.* 2010; Wojakowska *et al.* 2013; Aisyah *et al.* 2016). Considerando la sustitución del metilo como la característica estructural común de los flavonoides, también era probable que el compuesto desconocido en las muestras pudiera ser 2'-hidroxigenisteína metilada. En vista que anteriormente se ha reportado la identificación de 2'-hidroxigenisteína en hipocótilos germinados de *L. albus* L.

*cv multolupa* (Barceló y Muñoz 1989). Además, las muestras de lupino estudiadas también contenían otros compuestos de isoflavonas desconocidos, identificados como compuestos 6, 9, 14 y 17 que podrían ser varios derivados O-glicosilados del compuesto 20, como sugieren los datos de MS y MS<sup>2</sup> (Cuadro 15).



**Figura 16:** Cromatograma LC de isoflavonas y flavonas en ecotipos de lupino: **A.** Sin desamargar; **B.** Desamargado. El número de picos se detalla en el Cuadro 15.

En cuanto a las flavonas, se ha informado ampliamente que las apigeninas glicosiladas son las principales flavonas de los lupinos (Dueñas *et al.* 2009; Siger *et al.* 2012; Wojakowska *et al.* 2013). En contraste con estudios previos, los extractos de *Lupinus mutabilis* contenían sólo dos tri-glucósidos de apigenina, identificados como apigenina 7-O-apiofuranosil-6,8-di-C-glucósido y apigenina-pentosido-6,8-di-C-glucósido (Cuadro 15).

Así mismo, el compuesto 21 se identificó preliminarmente como una flavona dado su absorción máxima de UV a aproximadamente 340 nm (Anexo 3). Como el peso molecular del compuesto 21 era 30 Da más que el de la apigenina, podría tratarse de un derivado metoxilado. Muth *et al.* (2008) investigaron los perfiles de flavonoides en extractos de hojas de lupino azul (*L. angustifolius*), y propusieron que 3'-O-metiluteuteolina (crisoeriol) glicosilada era la flavona dominante. Stobiecki *et al.* (2010) y Wojakowska *et al.* (2013), revelaron la presencia de crisoeriol y sus glucósidos O-/C en las raíces y hojas de algunas especies de altramuces mexicanos. Sin embargo, confirmamos por coinyección que el compuesto 21, no era crisoeriol, debido al diferente tiempo de retención mostrado en el cromatograma LC. Otra posibilidad es que el compuesto 21 podría haber sido diosmetina (luteolina 4'-O-metil éter), que se encontró previamente en las semillas de lupinos (*L. angustifolius*, cv. Zapatón), especialmente en las germinadas (Dueñas *et al.* 2009). El presente estudio no pudo confirmar esta suposición. Además, de acuerdo con los resultados de MS<sup>2</sup>, algunos derivados O-glicosilados del compuesto 21 también se identificaron a partir de extractos de lupino estudiados, incluidos los compuestos 10, 11, 12, 15 y 18. Es importante resaltar que, los compuestos 10 y 21 sólo se presentaron en semillas desamargadas estos son eliminados durante el proceso de desamargado acuoso (Cortés *et al.* 2020).

**Cuadro 15. Identificación de isoflavonas y flavonas en 10 ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet), por UPLC-DAD-MS<sup>2</sup>**

N° pico	Identificación	UV $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup> / [M] <sup>-</sup> en MS (m/z)	[A+H] <sup>+</sup> / [A-H] <sup>-</sup> en MS (m/z)	Producción de iones de [M+H] <sup>+</sup> (MS <sup>2</sup> , m/z)
1	Genisteína 4',7- <i>O</i> -diglucosido	260,330	595/593	271/431,269	595→271
2	Isoflavona-pentósido-pentósido-hexósido desconocida	260,327	727/725	595,463,301/593,461,299	727→523,487,457,445,439,427,421,409,403,391,379,361,349,337,325,307,295 595→481,458,421,409,403,391,379,365,347,337,325,307,295,271 463→301,286,269,241,229,213,199,153
3	Apigenina-pentósido-6,8-di- <i>C</i> -glucósido	271,337	727/725	595,577/605,593,473,455,383,353,335	727→541,523,511,505,481,457,445,439,427,421,409,403,391,379,355,349,337,325,307,295 595→421,409,403,391,379,361,349,337,325,307,295
4	Apigenina 7- <i>O</i> -apiofuranosil-6,8-di- <i>C</i> -glucósido	270,337	727/725	595,577/605,593,473,455,383,353,335	727→541,523,511,505,481,457,445,439,427,421,409,403,391,379,355,349,337,325,307,295 595→421,409,403,391,379,361,349,337,325,307,295
5	Genisteína 7- <i>O</i> -glucósido	260,330	433/431	271/269	433→271,253,243,241,215,153
6	Isoflavona <i>O</i> -hexóxido 1 desconocida	261,330	463/461	301/299	463→301,286,269,241,229,213,199,153
7	Genisteína 4'- <i>O</i> -glucósido	260,330	433/431	271/269	433→271,253,243,241,215,153
8	Genisteína 7- <i>O</i> -xilosilglucósido	265,330	565/563	433,271/269	433→271,153
9	Isoflavona <i>O</i> -hexóxido 2 desconocida	260,330	463/461	301/299	463→301,286,269,241,229,213,199,153
10	Flavona <i>O</i> -glucósido desconocida	267,345	463/461	301/299	463→301,286,258
11	Flavona <i>O</i> -hexóxido-pentósido desconocida	270,345	595/593	463,301/461,299	595→301,286,258
12	Flavona <i>O</i> -hexóxido desconocida	268,347	463/461	301/299	463→301,286,258
13	Genisteína <i>O</i> -malonilhexósido	265,335	475/473	519,271/269	
14	Isoflavona <i>O</i> -malonilhexósido desconocida	261,330	549/547	505,301/503,299	549→301,286,269,241,153
15	Flavona <i>O</i> -malonilhexósido desconocida	267,345	549/547	505,301/503,299	549→301,286,258
16	Genisteína <i>O</i> -acetilhexósido	261,330	475/473	271/269	
17	Isoflavona <i>O</i> -acetilhexósido desconocida	262,330	505/503	301/299	505→301,286,269,241,153
18	Flavona <i>O</i> -acetilhexósido desconocida	268,343	505/503	301/299	505→301,286,258
19	Genisteína aglicona	261,330	271/269		271→253,197,169,153
20	Isoflavona aglicona desconocida	262,330	301/299	-/284,269	301→269,241,229,213,201,187,153
21	Flavona aglicona desconocida	268,346	301/299	-/284,269	301→286,258,229,203,187,153

- **Cuantificación de isoflavonas y flavonas en las semillas sin desamargar y desamargadas**

El contenido de isoflavonas y flavonas de los 10 ecotipos sin desamargar y desamargados se cuantificaron mediante análisis por HPLC. La cuantificación de isoflavonas y flavonas se realizó a 260 nm y 340 nm, respectivamente usando como estándares genisteína y apigenina. En el Cuadro 16, se muestran las rectas de calibración usadas para la cuantificación.

**Cuadro 16: Longitud de onda y rectas de calibración para la cuantificación de flavonas e isoflavonas**

Compuestos	Longitud de onda registrada	Ecuación <sup>b</sup>	Valor de R <sup>2</sup>
<b>Flavonas<sup>a</sup></b>			
Apigenina aglicona	340 nm	$y = 2 \times 10^{-8} x + 0.0008$	0.999
<b>Isoflavonas<sup>a</sup></b>			
Genisteína aglicona	260 nm	$y = 1 \times 10^{-7} x - 0.0004$	0.999

<sup>a</sup> Se disolvieron 1 ~ 2 mg de cada compuesto de referencia en 10 ml de metanol y luego se diluyeron a cuatro concentraciones diferentes con 3 repeticiones. Las curvas de calibración se construyeron trazando las áreas de pico en las longitudes de onda registradas del cromatograma HPLC en función de las concentraciones.

<sup>b</sup> La ecuación se expresó como  $y = A x + B$ , donde y fue la concentración de fenólicos (mg / ml), y x el área bajo curva en el cromatógrafo LC

El contenido de isoflavonas y flavonas en las semillas de lupino se muestra en el Cuadro 17. Es importante resaltar que el contenido total de isoflavonas y flavonas, es la suma de todos los compuestos aglicona y derivados glucosídicos en cada uno de los 10 ecotipos antes y después del proceso de desamargado. Respecto a las isoflavonas totales (expresadas como genisteína) en las semillas sin desamargar, los ecotipos que mostraron mayor contenido fueron E6 = 212.18 mg de genisteína /100 g y E7 = 208.24 mg de genisteína /100 g de Junín; E3 = 201.82 mg de genisteína /100 g y E2 = 201.15 mg de genisteína /100 g de La Libertad y el menor contenido de isoflavonas se encontró en los ecotipos E1, E5 y E9 provenientes de Cajamarca, Huánuco y Cusco respectivamente. El promedio de isoflavonas en los 10 ecotipos sin desamargar fue de 185.3 mg de genisteína /100 g b.s, resultado que fue mayor a lo reportado por Gálvez *et al.* (2009) quienes obtuvieron 37.6 mg de genisteína/100 g b.s en semillas enteras. Al comparar el contenido de isoflavonas de los 10 ecotipos de *L. mutabilis* sin desamargar con otras leguminosas como la soya, los resultados fueron menores a 265 mg/100 g en b.s, representando a la suma de genisteína, daidzeína, glicetina y

equivalentes aglicona (Mortensen *et al.* 2009). Sin embargo, el contenido de isoflavonas fue similar a otras variedades cultivadas en el estado de Paraná Brasil (54 a 147 mg/100 g) reportados por Carrão-Panizzi *et al.* (1998). El nivel de isoflavonas fue menor que las encontradas en soya de variedades Koreanas (949 mg/100 g) (Genovese *et al.* 2004).

Respecto al contenido de flavonas en las semillas sin desamargar el ecotipo con mayor concentración fue E5 = 47.12 mg de apigenina/100 g b.s, frente a otros ecotipos, y el menor contenido de flavonas se encontró en el ecotipo E1 de Cajamarca. El promedio del contenido de flavonas en los 10 ecotipos fue de 40 mg de apigenina /100 g b.s. Las diferencias del contenido de isoflavonas y flavonas pueden atribuirse a las diferencias entre los ecotipos, a las condiciones geográficas, a la etapa de maduración, a las condiciones posteriores a la cosecha y a los métodos de extracción (Bednarek *et al.* 2003; Faraj; Chirinos *et al.* 2013a).

**Cuadro 17: Isoflavonas y flavonas en los ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) sin desamargar y desamargados**

Ecotipos	Isoflavonas		%	Flavonas		%
	(mg de genisteína /100 g b.s)			(mg de apigenina /100 g b.s)		
	SD	D		SD	D	
<b>E1</b>	152.84 ± 1.1 <sup>a</sup>	142.81 ± 0.73 <sup>cd</sup>	93	33.80 ± 0.32 <sup>a</sup>	18.58 ± 0.11 <sup>e</sup>	55
<b>E2</b>	201.15 ± 7.5 <sup>bd</sup>	176.36 ± 2.08 <sup>f</sup>	88	39.81 ± 0.60 <sup>de</sup>	15.18 ± 0.12 <sup>b</sup>	38
<b>E3</b>	201.82 ± 3.9 <sup>d</sup>	109.52 ± 3.33 <sup>a</sup>	54	40.29 ± 0.73 <sup>e</sup>	15.69 ± 0.36 <sup>bc</sup>	39
<b>E4</b>	184.10 ± 4.3 <sup>b</sup>	136.06 ± 1.78 <sup>b</sup>	74	40.37 ± 0.40 <sup>e</sup>	12.42 ± 0.15 <sup>a</sup>	31
<b>E5</b>	159.46 ± 9.6 <sup>a</sup>	163.47 ± 1.66 <sup>e</sup>	102	47.12 ± 1.62 <sup>f</sup>	21.57 ± 0.37 <sup>f</sup>	46
<b>E6</b>	212.18 ± 0.5 <sup>d</sup>	185.20 ± 3.35 <sup>g</sup>	87	40.19 ± 0.21 <sup>e</sup>	17.96 ± 0.15 <sup>e</sup>	45
<b>E7</b>	208.24 ± 7.4 <sup>d</sup>	139.89 ± 1.95 <sup>bc</sup>	67	38.41 ± 1.07 <sup>cde</sup>	16.25 ± 0.10 <sup>cd</sup>	42
<b>E8</b>	185.76 ± 3.7 <sup>bc</sup>	134.20 ± 2.83 <sup>bc</sup>	72	37.77 ± 0.25 <sup>cd</sup>	18.23 ± 0.36 <sup>e</sup>	48
<b>E9</b>	163.74 ± 5.2 <sup>a</sup>	144.78 ± 0.48 <sup>cd</sup>	88	34.67 ± 0.84 <sup>ab</sup>	16.81 ± 0.25 <sup>d</sup>	48
<b>E10</b>	183.40 ± 5.2 <sup>b</sup>	147.15 ± 1.44 <sup>d</sup>	80	36.85 ± 0.77 <sup>bc</sup>	16.49 ± 0.38 <sup>d</sup>	45

Valores expresados como promedio ± desviación estándar. Valores con letras diferentes (a-g) dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p < 0.05$ ). b.s.: Base seca; % (porcentaje de disminución), SD: Sin desamargar; D: Desamargados. E1: ecotipo Cajamarca; E2: ecotipo Altagracia de Otuzco-La Libertad; E3: ecotipo Paton grande de La Libertad; E4: ecotipo Cholo fuerte de Ancash; E5: ecotipo Huánuco I de Santa Rosa-Marambuco; E6: ecotipo Compuesto blanco semi precoz INIA; E7: ecotipo H6 INIA; E8: ecotipo Moteado beige de Junín; E9: ecotipo Andenes INIA de Cusco y E10: ecotipo Yunguyo de Puno.

El proceso de desamargado disminuyó el contenido de isoflavonas y flavonas (Cuadro 17). El ecotipo con mayor contenido de isoflavonas fue E6 = 185.20 mg de genisteína/100 g

frente a otros ecotipos y el promedio de isoflavonas residuales en los 10 ecotipos desamargados fue de 148 mg de genisteína /100 g, representando este valor un gran potencial en las semillas de lupino desamargado, en vista que las isoflavonas se han asociado con efectos beneficiosos en los humanos, como la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y síntomas menopáusicos (Adlercreutz y Mazur, 1997). Así mismo se puede observar diferentes porcentajes de disminución de las isoflavonas, ello debido a las diferentes estructuras de las semillas de lupino.

Del mismo modo se observó una disminución del contenido de flavonas posterior al proceso de desamargado mostrando al ecotipo E5 = 21.57 mg apigenina/100 g en b.s con contenido, el promedio de flavonas en las semillas desamargadas de los 10 ecotipos fue 17 mg de apigenina/100 g b.s. La disminución del porcentaje de flavonas es variable entre los diferentes ecotipos. Finalmente cabe resaltar que las flavonas tienden a disminuir más que las isoflavonas posteriores al desamargado acuoso (Cuadro 17)

#### **4.2. SELECCIÓN DEL ECOTIPO PARA LA ELABORACIÓN DE LA BEBIDA**

El trabajo de investigación tuvo como objetivo obtener una bebida probiótica proteica, para elegir al ecotipo apropiado se tomaron ciertos criterios tales como: a) mayor contenido de proteínas b) bajo nivel de alcaloides residuales en las semillas desamargadas, debido a que los alcaloides son considerados antimicrobianos y un nivel alto podría haber tenido efecto en la viabilidad de las bacterias probióticas c) el contenido de isoflavonas y flavonas, ya que son consideradas como prebióticos, pero en concentraciones altas podrían inhibir el crecimiento microbiano.

Por lo tanto, de los 10 ecotipos caracterizados, se observó que el ecotipo Altagracia tenía una mayor concentración de proteínas (Cuadro 11), frente a otros ecotipos. Respecto al contenido de alcaloides residuales en los ecotipos desamargados no existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 14b), excepto para el ecotipo Cajamarca que tenía mayor concentración de alcaloides. Cabe resaltar que, en todos los ecotipos desamargados, los niveles residuales de alcaloides se encontraban por debajo de las especificaciones establecidas por las autoridades sanitarias del Reino Unido, Francia y Australia (Calabrò *et al.* 2015). Así mismo el contenido de isoflavonas y flavonas estuvieron en un nivel

intermedio. De acuerdo a lo mencionado se seleccionó al ecotipo Altagracia proveniente de la Libertad para la elaboración de la bebida.

#### **4.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES SIGNIFICATIVOS EN LA ELABORACIÓN DE LA BEBIDA**

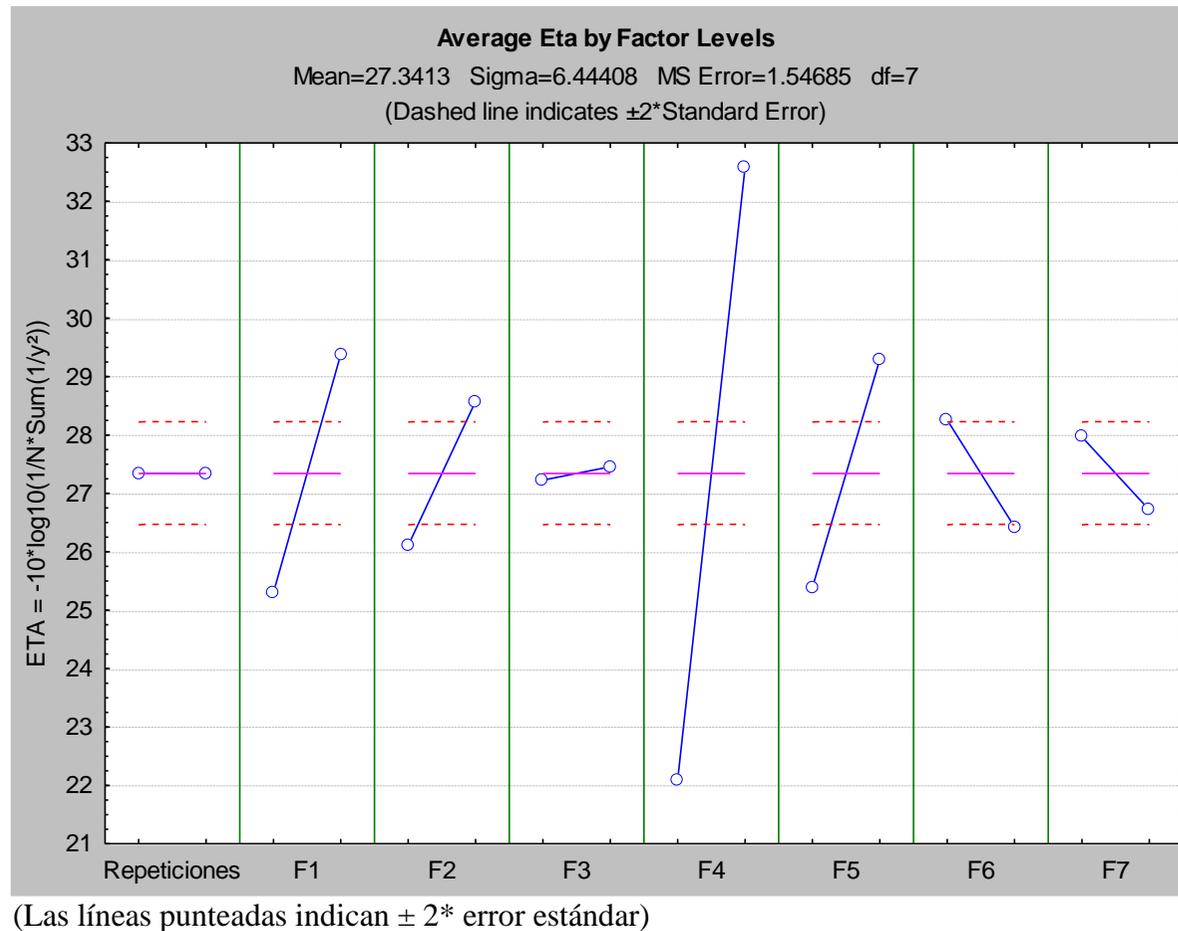
Se evaluaron siete factores con dos niveles, mediante el método Taguchi, haciendo un total de 8 corridas por duplicado (Cuadro 18). Los valores de la tasa de crecimiento de *L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG (%), estuvieron entre los rangos de (7.94-22.2 %) y (30.3-58.9 %) respectivamente. Del Cuadro 18 se puede observar que la mayor tasa de crecimiento, se obtuvo con la bacteria *L. rhamnosus* GG, y la menor tasa de crecimiento con *L. plantarum* 299v a concentraciones menores de azúcar y lupino. La tasa de crecimiento de las bacterias ácido lácticas está influenciada por muchos factores, entre ellos, el estrés ácido y osmótico, que se produce por la producción de ácido láctico y la aplicación de aditivos alimentarios durante la fabricación de leches fermentadas (Lucas *et al.* 2004)

Los valores ETA (Valores señal /ruido) presentados en la Figura 17, muestran a los factores significativos y no significativos que influyeron en el crecimiento de las bacterias probióticas. Los factores significativos fueron la concentración de lupino, concentración de azúcar, tipo de bacteria e interacción lupino-tipo de bacteria; dichos factores exceden la región delimitada correspondiente al valor ETA. Los factores que no tuvieron significancia (no exceden la región delimitada del valor ETA) fueron: Concentración de inulina, concentración de CMC e interacción lupino-azúcar, porque, al realizar la variación de un nivel bajo a un nivel alto, no afectan el crecimiento de las bacterias probióticas. Cabe resaltar respecto a las concentraciones de inulina de 1 y 2 %, ciertamente no fueron significativas en la tasa de crecimiento de las bacterias probióticas, sin embargo, Guven *et al.* (2005), mencionan que la inulina tiene un efecto prebiótico, por que promueve el crecimiento de las bacterias probióticas, pero dichos resultados se dan con mayores concentraciones de inulina respecto a la investigación realizada. Es importante considerar que productos fermentados, como por ejemplo leche de soja fermentada con probióticos, que contienen fructooligosacáridos (FOS), inulina y pectina, aumentan la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I y mejoran el efecto antihipertensivo *in vitro* (Yeo y Liang 2010 ).

**Cuadro 18: Tratamientos según diseño experimental Taguchi L<sub>8</sub> (2<sup>7</sup>) y tasa de crecimiento de bacterias probióticas**

R1 y R2: Repeticiones de la determinación de la tasa de crecimiento de bacterias probióticas en la bebida  $[(\text{UFC/ml})_{\text{inicial}} / (\text{UFC/ml})_{\text{final}}] \times 100$ .

Tratamientos	Factores de control							Tasa de crecimiento de bacterias probióticas (%)		
	Lupino (%)	Azúcar (%)	F1xF2	Tipo de bacteria	F1xF4	Inulina (%)	CMC (%)	R1	R2	Promedio
1	65	2	-	<i>L. plantarum</i>	-	1	0.8	17.65	19.00	18.3
2	15	2	-	<i>L. plantarum</i>	-	1	0.2	9.57	7.06	8.3
3	65	2	-	<i>L. rhamnosus</i>	-	2	0.2	33.33	40.14	36.7
4	15	2	-	<i>L. rhamnosus</i>	-	2	0.8	28.41	32.22	30.3
5	15	8	-	<i>L. plantarum</i>	-	2	0.8	6.83	9.05	7.9
6	15	8	-	<i>L. rhamnosus</i>	-	1	0.2	61.82	55.96	58.9
7	65	8	-	<i>L. plantarum</i>	-	2	0.2	23.38	21.03	22.2
8	65	8	-	<i>L. rhamnosus</i>	-	1	0.8	55.79	45.87	50.8



- F1:** Concentración de lupino.
- F2:** Concentración de azúcar.
- F3:** Interacción lupino-azúcar.
- F4:** Tipo de bacteria.
- F5:** Interacción lupino-tipo de bacteria.
- F6:** Concentración de inulina.
- F7:** Concentración de CMC.

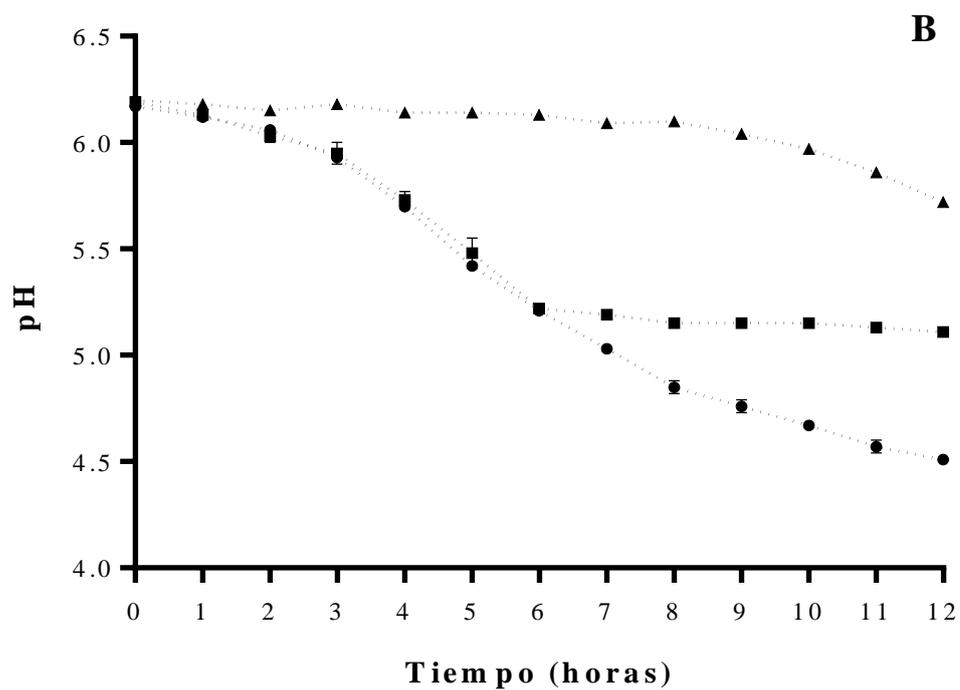
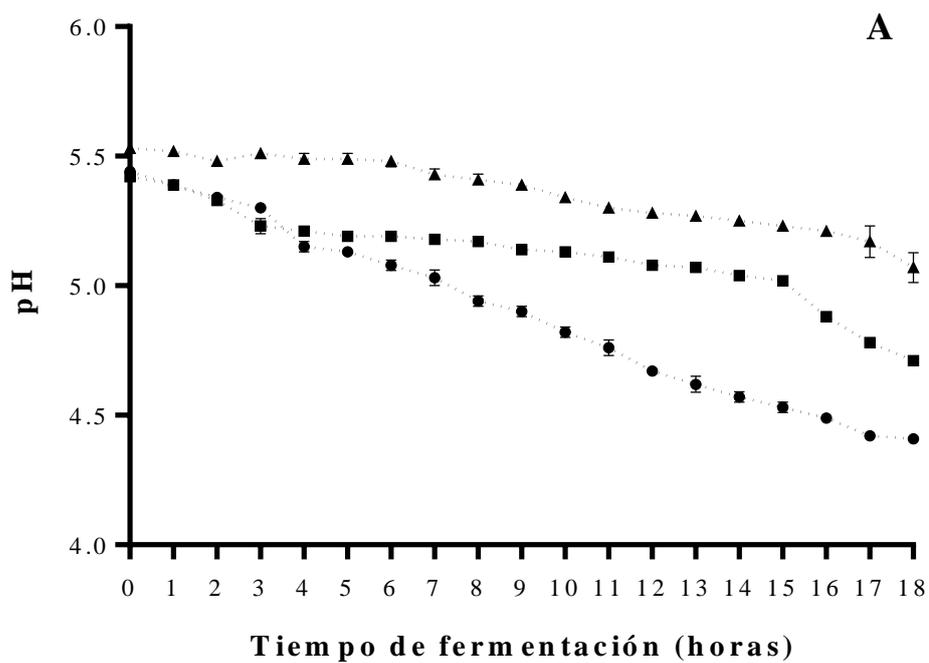
**Figura 17:** Valores señal/ruido (ETA) de cada factor evaluado en la tasa de crecimiento de bacterias probióticas aplicando Taguchi L<sub>8</sub> (2<sup>7</sup>)

**Cuadro 19: Niveles con mayor crecimiento de bacterias probióticas con descenso de pH (4.5 - 4.7) en la bebida fermentada según Taguchi**

<b>FACTORES</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Nivel seleccionado</b>
F1→ Lupino (%)	65	2
F2→ Azúcar (%)	8	2
F3→ F1xF2	-	-
F4→ Tipo de bacteria	<i>L. plantarum</i> 299v	1
F5→ F1xF4	-	-
F6→ Inulina (%)	2	2
F7→ CMC (%)	0.8	2

#### **4.4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE LA BEBIDA**

Para determinar el tiempo de fermentación se realizaron pruebas preliminares con dos formulaciones (Formulación 1 y 2) como se detalló en el ítem 3.6.1.2.2. El criterio considerado fue el nivel de pH de la bebida fermentada, para ello se partió con un tiempo de 18 horas de fermentación, en vista que el cultivo de las bacterias ácido lácticas a temperaturas controladas alcanza la fase estacionaria entre las 10 -18 h de fermentación (GRAS notice (GRN) 2020). La Figura 18 muestra el comportamiento del pH para cada bebida en función del tiempo de fermentación (18 y 12 h): Control (bebida sin inóculo), bebida con *L. plantarum* 299v y bebida con *L. rhamnosus* GG. En la Figura 18A (Formulación 1), se puede observar que la bebida sin inóculo tiende a mantener el pH durante las 8 h, posteriormente tiende a bajar lentamente hasta las 18 h de fermentación. En la bebida inoculada con *L. rhamnosus* GG, el pH tiende a disminuir muy lentamente, observándose durante las 4 primeras horas una disminución de 5.42 a 5.21, posterior a ello se mantiene constante hasta las 15 h (pH = 5.02) y finalmente a las 18 h alcanza un pH de 4.71. Por otro lado, en la bebida inoculada con *L. plantarum* 299v, la disminución del pH se dio rápidamente observándose que a las 12 h fue 4.67 y a las 18 h de 4.41. En cuanto a la Formulación 2 (Figura 18B), se observó un comportamiento similar a lo descrito para la Formulación 1. De acuerdo a los resultados obtenidos y a los niveles de pH establecidos para la bebida (4.5 - 4.7), se consideró realizar la fermentación por un tiempo de 12 h, en vista que el pH deseado para la bebida oscilo en ese tiempo.



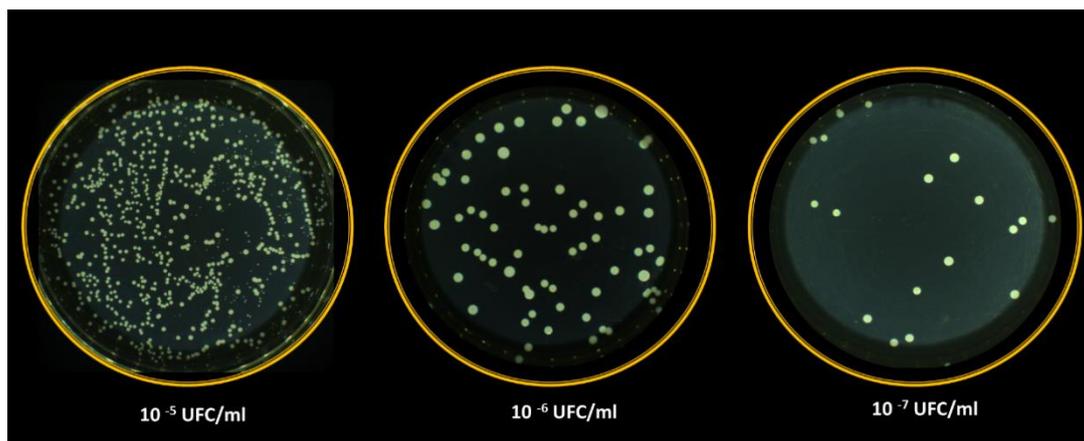
**Figura 18:** Cinética de cambio de pH en la bebida fermentada: A) 18 h de fermentación, B) 12 h de fermentación. (▲) Control (sin inóculo), (●) *L. plantarum* 299v, (■) *L. rhamnosus* GG.

Así mismo, las pruebas sensoriales contribuyeron a la decisión (preliminares) de elegir entre las 12 y 18 h de fermentación, dichos resultados pueden ser reforzados por Li *et al.* (2014), quienes encontraron que el sabor y apariencia de la leche de soja fermentada eran los mejores después de las 12 h de fermentación. Del mismo modo cabe resaltar lo mencionado por Salmerón *et al.* (2014), que el crecimiento máximo de los lactobacilos en sustratos de cereales se logra dentro de las primeras 10 h. Por otro lado, los resultados muestran que las bacterias de *L. rhamnosus* GG tiene un buen crecimiento en un medio vegetal, pero, no se da la disminución del pH del medio, dando lugar al desarrollo de bacterias no deseadas, que presentaron un sabor desagradable en la bebida, al respecto Molin (2001) menciona que, las bacterias de *L. rhamnosus* GG generalmente se asocian con productos lácteos, mientras que las bacterias de *L. plantarum* se encuentran en alimentos fermentados de origen vegetal. De acuerdo a lo mencionado se consideró realizar la optimización sólo con *L. plantarum* 299v, que es conocida por su capacidad de adaptarse a diferentes tipos de ecosistemas y sustratos vegetales (Ribeiroa *et al.* 2020).

#### **4.5. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE DILUCIÓN PARA *L. plantarum* 299v**

Para el recuento estándar en placa, se realizaron las diluciones seriadas de la bebida de lupino, y se pudo determinar el factor de dilución de las bacterias de *L. plantarum* 299v, con el método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie. En la Figura 19 se presenta las colonias de las bacterias, con características bastante notorias en el medio de cultivo MRS, mostrando formas muy definidas que facilitaron su conteo. El factor de dilución determinado fue de  $10^{-6}$  UFC/ml (Figura 19), concentración que permitió contar adecuadamente las bacterias.

La ICMSF (2000), que las bacterias mesófilas para su óptimo conteo deben estar dentro del rango de 30 y 300 colonias.



**Figura 19:** Factor de dilución para el crecimiento de *L. plantarum* 299v

#### 4.6. OPTIMIZACIÓN DE LOS FACTORES DE FORMULACIÓN DE LA BEBIDA PROBIÓTICA

El desarrollo de un nuevo alimento probiótico exige varios factores a tener en cuenta; entre ellos el más importantes es el nivel de bacterias viables en el producto final. En tal sentido, se optimizaron los factores de formulación para maximizar el crecimiento de las bacterias probióticas y alcanzar un pH entre 4.5 - 4.7 en la bebida a base de lupino. Para ello se consideraron tres factores significativos obtenidos en la etapa de *Screening* (Método Taguchi): Concentración de lupino, concentración de azúcar y tipo de bacteria (*L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG). Sin embargo, por razones expuestas anteriormente se procedió a la optimización sólo con la bacteria *L. plantarum* 299v como constante, para lo cual se consideraron dos factores: Concentración de lupino y concentración de azúcar. Así mismo, los otros ingredientes adicionales se mantuvieron constantes, como la concentración de inulina con 2 % y carboximetil celulosa (CMC) con 0.8 %, ya que las respuestas no difirieron entre la menor y mayor concentración para la tasa de crecimiento de las bacterias probióticas.

Para la etapa de optimización se consideró un diseño central compuesto con cara centrada ( $\alpha = 1$ ) de acuerdo a la metodología descrita por Ayala y Pardo (1995), la fermentación se llevó a cabo durante un período de 12 h, necesario para alcanzar el nivel de pH deseado (4.5 - 4.7). Los 12 experimentos del diseño central compuesto con cara centrada con dos factores y tres niveles (Cuadro 9), que incluyen 4 réplicas en el punto central para ajustar una superficie de segundo orden. El efecto de las diferentes concentraciones de los dos factores en la tasa de crecimiento de *L. plantarum* 299v y el pH se muestra en el Cuadro 20. Se

observó que a mayor concentración lupino (40 %) y mayor concentración de azúcar (8 %) se obtiene una tasa de crecimiento de 27.88 %, siendo está menor a una concentración de lupino de 30 % y 8 % de azúcar (32.11 %). Este comportamiento se podría atribuir al estrés osmótico que afecta la viabilidad de las bacterias probióticas en las matrices alimentarias. Así, en algunos lactobacilos expuestos a niveles variables de concentraciones de azúcar, mostraron pérdidas de viabilidad probiótica debido al estrés osmótico (Sunny *et al.* 2007).

**Cuadro 20: Valores experimentales y predichos de la tasa de crecimiento de *L. plantarum* 299v y pH.**

Ensayos	Lupino (%)	Azúcar (%)	<i>L. plantarum</i> 299v		pH	
			Experimental	Predicho	Experimental	Predicho
1	30	8	32.11	30.57	4.71	4.74
2	30	7	28.00	28.84	4.68	4.71
3	20	6	25.29	24.90	4.57	4.58
4	30	7	27.73	28.84	4.7	4.71
5	20	7	25.91	25.45	4.57	4.57
6	40	7	26.76	26.61	4.48	4.47
7	40	8	27.88	28.57	4.53	4.52
8	30	7	29.46	28.84	4.71	4.71
9	30	7	29.58	28.84	4.73	4.71
10	30	6	27.11	28.05	4.73	4.70
11	20	8	26.09	26.94	4.6	4.58
12	40	6	26.12	25.57	4.42	4.44

#### 4.6.1. Efecto de los factores sobre la tasa de crecimiento de *L. plantarum* 299v

- **Evaluación del modelo matemático**

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, es una relación empírica entre la tasa de crecimiento de las bacterias probióticas y las variables independientes en unidades codificadas, como se indica en la siguiente ecuación:

#### **Ecuación en términos de factores codificados**

$$Y = + 28.84 + 0.5783*A + 1.26*B + 0.2400*AB - 2.81* A^2 + 0.4638*B^2 \dots\dots (1)$$

Mediante la conversión de los valores codificados en valores reales (unidades no codificadas), se presenta la siguiente ecuación:

**Ecuación en términos de factores reales**

$$\text{Log UFC/ml} = +20.75125 + 1.57658 * \text{Lupino} - 5.95250 * \text{Azúcar} + 0.024000 * \text{Lupino} * \text{azúcar} - 0.028113 * \text{Lupino}^2 + 0.463750 * \text{Azúcar}^2 \dots\dots\dots(2)$$

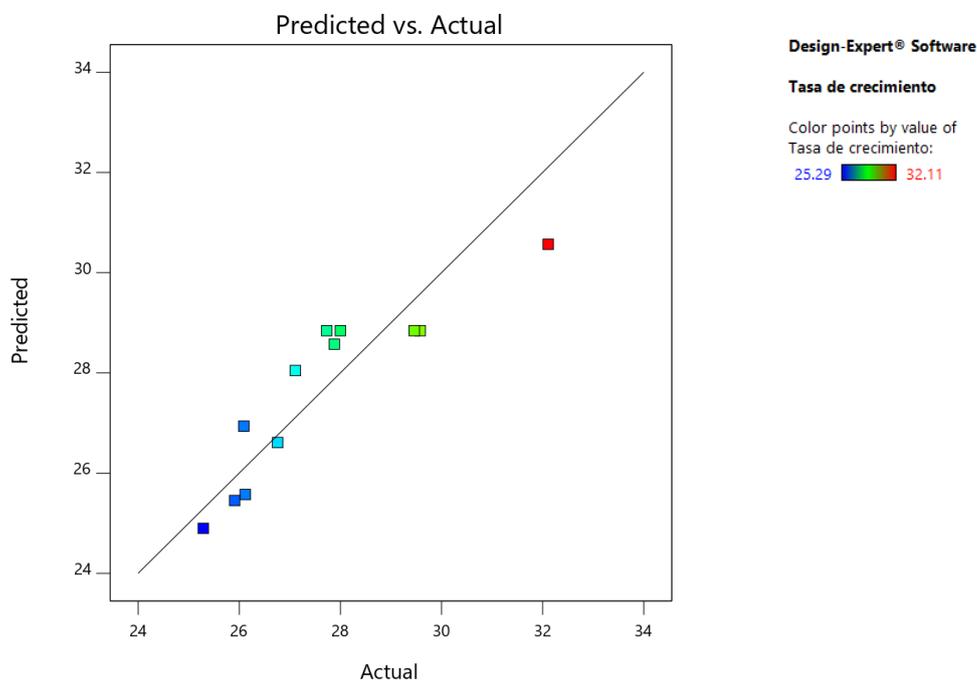
El análisis de varianza del modelo cuadrático de la ecuación 1, se presentan en el Cuadro 21. La evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo cuadrático indica que fue significativo ( $P < 0.05$ ) como es evidente en la prueba F de Fisher (modelo F, la razón de la regresión cuadrática media al residual cuadrático medio es 5.02) y tiene un valor de probabilidad [(modelo  $P > F$ ) = 0.0374]. Los valores  $p$  correspondientes sugieren que, entre las variables de prueba utilizadas en el estudio, B (concentración de azúcar),  $A^2$  (lupino x lupino) son términos significativos del modelo con valores  $p$  inferiores a 0.05. Según Gupta *et al.* (2010) la significancia indica que pueden actuar como nutrientes limitantes y una pequeña variación en sus concentraciones alterará el crecimiento de las bacterias probióticas en gran medida. Por otro lado, otros términos, como A (concentración de lupino), AB (lupino x azúcar),  $B^2$  (azúcar x azúcar) no fueron significativos. Resultados similares se observaron en el estudio de Gupta *et al.* (2010), quienes evaluaron el crecimiento de *L. plantarum* en avena fermentada.

**Cuadro 21: Análisis de varianza y regresión para el crecimiento de *L. plantarum* 299v**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F- value	p-value	Sig.
<b>Modelo</b>	33.51	5	6.70	5.02	0.0374	*
A-Lupino	2.01	1	2.01	1.50	0.2662	n. s
B-Azúcar	9.53	1	9.53	7.13	0.0370	*
AB	0.2304	1	0.2304	0.1725	0.6924	n. s
$A^2$	21.08	1	21.08	15.78	0.0074	*
$B^2$	0.5735	1	0.5735	0.4293	0.5366	n. s
<b>Residual</b>	8.02	6	1.34			
Lack of Fit	5.23	3	1.74	1.88	0.3085	n. s
Error puro	2.78	3	0.9276			
<b>Total</b>	41.52	11				

\*Significancia a un nivel de  $\alpha = 0,05$ ; n.s = No significativo

La prueba de falta de ajuste del modelo (*lack of fit*) 0.3085 fue no significativa ( $p > 0.05$ ) para todas las variables, indicando que los resultados experimentales se ajustan adecuadamente al modelo para predecir el crecimiento de las bacterias. La idoneidad del modelo se confirmó también con el coeficiente de determinación ( $R^2 = 0.8070$ ), que indica que el modelo podría predecir el 80.70 % de variabilidad en la respuesta. El valor bajo del coeficiente de variación ( $CV = 4.18$ ) indicó la fiabilidad de los experimentos y un alto grado de precisión. El valor de la precisión Adeq, es decir, la relación señal/ruido de 6.9373 indicaba una señal adecuada. Además, existe un grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido al  $R^2$  ajustado de 0.6461 (Figura 20)

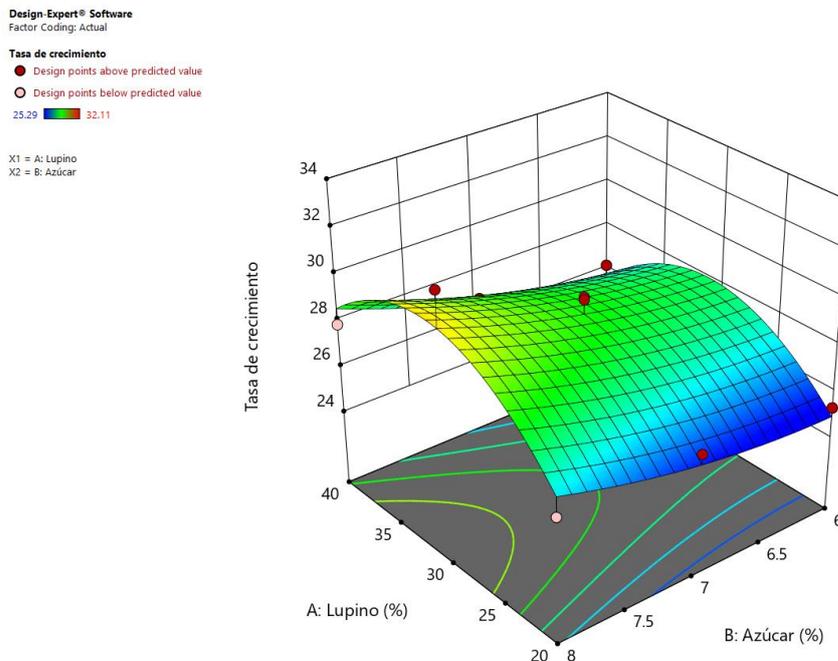


**Figura 20:** Valores predichos y experimentales de la tasa de crecimiento de *L. plantarum* 299v.

- **Análisis de la superficie de respuesta**

La superficie de respuesta tridimensional generado a partir del modelo cuadrático (Ecuación 2) para estudiar la interacción de los dos factores evaluados, y para visualizar los efectos combinados de los factores sobre el crecimiento de *L. plantarum* 299v en la bebida de lupino (Figura 21). El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes de manera eficiente para maximizar la respuesta.

Como se observa en el Cuadro 20, las bacterias probióticas tuvieron una buena tasa de crecimiento en las diferentes formulaciones de la bebida de lupino. Obteniéndose la máxima tasa de crecimiento de 30.63 (equivalente al valor experimental validado  $31.7 = 13 \times 10^8$  UFC/ml (9.11 log)  $_{\text{final}} / 41 \times 10^6$  UFC/ml (7.61 log)  $_{\text{inicial}}$ , con los valores óptimos de los factores no codificados de 31.5 % de concentración de lupino y 8 % de concentración de azúcar, durante 12 h de fermentación (Figura 21). Todos los puntos óptimos se ubicaron dentro de la región experimental y variaron alrededor de sus puntos centrales en diferente medida. Estudios previos han reportado tendencias similares con *L. plantarum* Q823 y *L. casei* Q1, con recuentos bacterianos iniciales de 8 log UFC/ml, y posterior al proceso de fermentación de 6 h a 30 °C, fueron capaces de crecer a un nivel de 9.5 log UFC /ml en bebida fermentada de quinoa (Ludeña *et al.* 2016). El nivel de bacterias en la bebida de lupino fue superior a los estudios obtenidos con arroz fermentado, con un máximo de 8.42 log UFC/ml de *L. plantarum* TISTR 2075 a un mayor tiempo de fermentación (24 h) (Savedboworn *et al.* 2017) y a  $6.8 \times 10^7$  UFC/ ml para leche de soya después de un tiempo de fermentación de 16-18 h (Mital y Steinkraus 1974). Por otro lado, los valores del nivel de bacterias del estudio fueron inferiores a los niveles obtenidos en una bebida de trigo germinado (10.43 log UFC/mL) con *L. acidophilus* NCDC-14 durante 8 h de fermentación (Sharma *et al.* 2014).



**Figura 21:** Superficie de respuesta estimada para la tasa de crecimiento de *L. plantarum* 299v

Del mismo modo, el contenido de oligosacáridos presentes en las semillas de lupino como base prebiótica pudo haber influido en el crecimiento de las bacterias, en vista que estas semillas son consideradas de alto contenido de galatósidos (7-15 %), pertenecientes a la familia de las rafinosas, que son utilizados por las bacterias probióticas (Martínez-Villaluenga 2007). Así mismo, el contenido fenólico en la bebida también puede influir en la viabilidad de los probióticos, ejerciendo una actividad protectora o antimicrobiana (Succi *et al.* 2017; Terpou *et al.* 2019), como las isoflavonas que se encuentran en las semillas de lupino, al respecto Faraj y Vasanthan (2004), mencionan que la fermentación convierte los glicósidos de isoflavonas en agliconas a través de la hidrólisis del enlace glucosídico y la posterior utilización de la glucosa por parte de las bacterias para la obtención de energía.

#### 4.6.2. Efecto de los factores sobre el pH

- **Evaluación del modelo matemático**

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, es una relación empírica entre el pH y las variables independientes en unidades codificadas, como se indica en la siguiente ecuación:

##### **Ecuación en términos de factores codificados**

$$Y = + 4.71 - 0.0517*A + 0.02*B + 0.02*AB - 0.185* A^2 \dots\dots\dots (3)$$

Mediante la conversión de los valores codificados en valores reales (unidades no codificadas), se presenta la siguiente ecuación:

##### **Ecuación en términos de factores reales**

$$pH = +3.51000 + 0.089833*Lupino - 0.040000*Azúcar + 0.002000*Lupino*azúcar - 0.001817*Lupino^2 \dots\dots\dots (4)$$

El análisis de varianza del modelo cuadrático de la ecuación 1, se presentan en el Cuadro 22. La evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo cuadrático indica que fue significativo ( $P < 0.05$ ) como es evidente en la prueba F de Fisher (modelo F, la razón de la regresión cuadrática media al residual cuadrático medio es 46.63) y tiene un valor de probabilidad [(modelo  $P > F$ ) = 0.0001]. Los valores  $p$  correspondientes sugieren que, entre las variables de prueba utilizadas en el estudio, A (concentración de lupino),  $A^2$  (lupino x

lupino) son términos significativos del modelo con valores  $p$  inferiores a 0.05. Por otro lado, otros términos, como B (concentración de azúcar), AB (lupino x azúcar) y  $B^2$  (Azúcar\*Azúcar) fueron no significativos.

**Cuadro 22: Análisis de varianza y regresión para el pH**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-value	$p$ -value	Sig.
<b>Model</b>	0.1193	5	0.0239	34.08	< 0.0002	*
A-Lupino	0.0160	1	0.0160	22.88	0.0031	*
B-Azúcar	0.0024	1	0.0024	3.43	0.1135	n. s
AB	0.0016	1	0.0016	2.29	0.11813	n. s
$A^2$	0.0913	1	0.0913	130.38	< 0.0001	*
$B^2$	0.0003	1	0.0003	0.3810	0.5598	n. s
<b>Residual</b>	0.0042	6	0.0007			
Lack of Fit	0.0029	3	0.0010	2.23	0.2635	n. s
Error puro	0.0013	3	0.0004			
<b>Total</b>	0.1235	11				

\*Significancia a un nivel de  $\alpha = 0,05$ ; n.s = No significativo

La prueba de falta de ajuste del modelo (*lack of fit*) 0.2635 fue no significativa ( $p > 0.05$ ) para todas las variables, indicando que los resultados experimentales se ajustan adecuadamente al modelo para predecir el pH del medio de fermentación. La idoneidad del modelo se confirmó con el coeficiente de determinación ( $R^2 = 0.9660$ ), que indica que el modelo podría predecir el 96.60% de variabilidad en la respuesta. El valor bajo del coeficiente de variación ( $CV = 0.5728$ ) indicó la fiabilidad de los experimentos y un alto grado de precisión. El valor de la precisión Adeq, es decir, la relación señal/ruido de 15.8575 indicaba una señal adecuada.

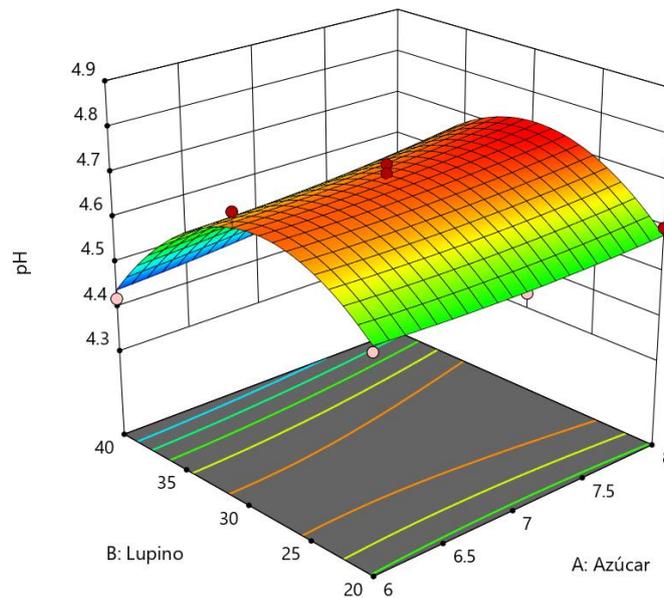
- **Análisis de la superficie de respuesta**

La superficie de respuesta tridimensional generado a partir del modelo cuadrático (Ecuación 4) muestra la interacción de los dos factores evaluados, y permite visualizar los efectos combinados de los factores sobre el pH en la bebida (Figura 22). Con los parámetros de formulación optimizados (concentración de lupino 31.5 % y 8 % de concentración de azúcar) se pudo obtener un valor de pH de 4.73.

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual

pH  
● Design points above predicted value  
○ Design points below predicted value  
4.42 4.73

X1 = A: Azúcar  
X2 = B: Lupino



**Figura 22:** Superficie de respuesta estimada para pH del medio fermentación

#### 4.6.3. Validación del modelo

La verificación de los resultados óptimos para el crecimiento de las bacterias probióticas se llevó a cabo durante las 12 h de fermentación. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo (Cuadro 23).

**Cuadro 23:** Condición óptima recomendado por el modelo de segundo orden, respuesta estimada y experimental

Condiciones óptimas	No codificado		
Concentración de lupino (%)	31.5		
Concentración de azúcar (%)	8		
Variable respuesta	Estimada	*Experimental	Rango
Tasa de crecimiento %	30.63	31.7 ±1.23	25.29 - 32.11
pH	4.73	4.75	4.42-4.73

\*Valores expresados como promedio ± desviación estándar.

#### 4.7. CARACTERÍSTICAS DE LA BEBIDA PROBIÓTICA ÓPTIMA

Las características fisicoquímicas de la bebida óptima a base de lupino, se muestran en el Cuadro 24. Así mismo se ha incluido en el cuadro el análisis proximal de las semillas de lupino desamargado, valores que permitirán estimar los cambios de la composición de la bebida posterior al proceso de fermentación. La bebida presentó una humedad de 87.4 % y 12.6 % de sólidos totales, resultados muy similares a 86.8 % de humedad y 13.19 % sólidos totales reportados por Sharma *et al.* (2014). El porcentaje de proteína fue de 2.2 % en base húmeda, valores que se encuentran dentro del rango de las bebidas a base de leguminosas que contienen entre 1.5 a 3.0 % de proteínas (Jiménez-Martínez *et al.* 2003a). En cuanto al contenido de grasa, ceniza y carbohidratos la bebida de lupino presentó 1.1 %, 0.4 % y 8.9 % respectivamente, valores muy cercanos a los obtenidos por Sharma *et al.* (2014).

El pH de la bebida disminuyó de 6.11 a 4.75, después de 12 h de fermentación, con un incremento de la tasa de crecimiento de las bacterias probióticas, tendencia muy similar fue reportado por Lorusso *et al.* (2018), quienes obtuvieron una reducción de pH de 6.0 a 3.9 en una bebida fermentada de quinoa durante 20 h de fermentación. El pH final (4.75) de la bebida de lupino fue superior a 4.02 de una bebida tipo yogurt de *L. campestri* durante 8 h de fermentación (Jiménez-Martínez *et al.* 2003a). Del mismo modo, fue superior al ser comparado con una bebida fermentada a base de quinua (Ludeña *et al.* 2016; Lorusso *et al.* 2018). Los valores de pH en la bebida se encontraban dentro del rango de bebidas fermentadas a base de cereales, estos valores bajos pueden crear un ambiente no favorable para los microorganismos patógenos (Salmerón *et al.* 2014). Frente a este comportamiento Matusek *et al.* (2009), mencionan que la disminución del pH favorece la degradación rápida de los oligosacáridos, por lo que se tendría mayor disponibilidad de nutrientes. Es decir en un entorno de pH bajo, las células pueden utilizar el azúcar metabolizable para proporcionar trifosfato de adenosina (ATP) a  $F_0 F_1$ -ATPasa a través de la glucólisis, permitiendo la exclusión de protones y manteniendo así su viabilidad (Hutkins y Nannen 1993).

Respecto a la tasa de crecimiento de las bacterias de *L. plantarum* 299v en la bebida fue de 30.63 % (equivalente al valor experimental validado  $31.7 = 13 \times 10^8$  UFC/ml (final) /  $41 \times 10^6$  UFC/ml (inicial)), reflejando un contenido final de  $13 \times 10^8$  UFC/ml. Dicha cantidad de bacterias viables, se encuentra dentro del rango de  $10^7$ - $10^9$  UFC/g o ml de un producto en el

momento de consumo para ejercer efectos de actividad probiótica si es consumido diariamente (Van Niel *et al.* 202; Bernat *et al.* 2013). Así mismo, las regulaciones de Canadá e Italia, consideran a las siguientes especies bacterianas *Bifidobacterium (adolescentis, animalis, bifidum, breve and longum)* y *Lactobacillus (acidophilus, casei, fermentum, gasseri johnsonii, paracasei, plantarum, rhamnosus y salivarius)*, cuando se entregan en los alimentos a un nivel de  $1 \times 10^9$  UFC/ por porción, como probióticos (Heath Canada 2009). Por otro lado, el nivel de bacterias viables en la bebida fermentada a base de lupino fue inferior a los resultados obtenidos por (Molin *et al.* 1991), quienes obtuvieron  $\approx 1 \times 10^{12}$  UFC de *L. plantarum 299v* en una papilla de avena fermentada.

**Cuadro 24: Características fisicoquímicas de la bebida fermentada y semillas de lupino**

	<b>Componente</b>	<b>Lupino<sup>a</sup></b>	<b>Lupino<sup>b</sup></b>	<b>Bebida probiótica<sup>c</sup></b>
	Humedad (%)	72.0 ± 0.35	22.7 ± 0.11	87.4 ± 0.021
	Proteína (%)	14.6 ± 0.17	4.6 ± 0.05	2.2 ± 0.00
<b>Base</b>	Grasa (%)	7.1 ± 0.06	2.2 ± 0.02	1.1 ± 0.014
<b>fresca</b>	Ceniza (%)	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.00
	CHO (%)	5.5 ± 0.14	1.7 ± 0.04	8.9 ± 0.007
	pH	-	-	4.75
	Tasa de crecimiento	-	-	31.7 = 13 x 10 <sup>8</sup> UFC/ml

Valores expresados como promedio ± desviación estándar.

<sup>a</sup> Calculado en 100 g de muestra, <sup>b</sup> Calculado en 31.5 g, <sup>c</sup> Calculado en 100 mL de bebida fermentada.

La bebida a base de lupino tiene un gran potencial debido a que las bacterias ácido lácticas (BAL) metabolizan diferentes sustratos, lo que lleva a cambios bioquímicos en la composición de la bebida mejorando las propiedades nutricionales, la biodisponibilidad de los compuestos nutritivos, las propiedades sensoriales de las matrices alimentarias e incrementando la vida útil (Septembre-Malaterre *et al.* 2018; Guerin *et al.* 2020; Petrova y Petrov 2020). Así, los alimentos fermentados de origen vegetal presentan una mayor actividad antioxidante, debido principalmente al aumento de los compuestos fenólicos y flavonoides por hidrólisis microbiana. Las enzimas microbianas hidrolizan glucósidos fenólicos y liberan agliconas, que tiene mayor capacidad antioxidante (Sun Jin *et al.* 2014). La fermentación en fase líquida que se produce en las bebidas conduce a una rápida bioconversión, junto con la liberación directa de los metabolitos en el medio de cultivo en comparación con las fermentaciones en estado sólido (Subramaniyam y Vimala 2012).

Finalmente es importante resaltar que la bebida fermentada a base de lupino, puede representar un producto potencial para la salud, debido a que contiene varios productos llamados postbióticos, que son subproductos metabólicos (compuestos bioactivos) solubles secretados por microorganismos probióticos vivos, liberados de la matriz alimentaria, y después de su lisis bacteriana, ofrecen efectos positivos al huésped. Así mismo los postbióticos pueden denominarse metabióticos, biogénicos o metabolitos y/o sobrenadantes/ extractos libres de células (Aguilar *et al.* 2018)

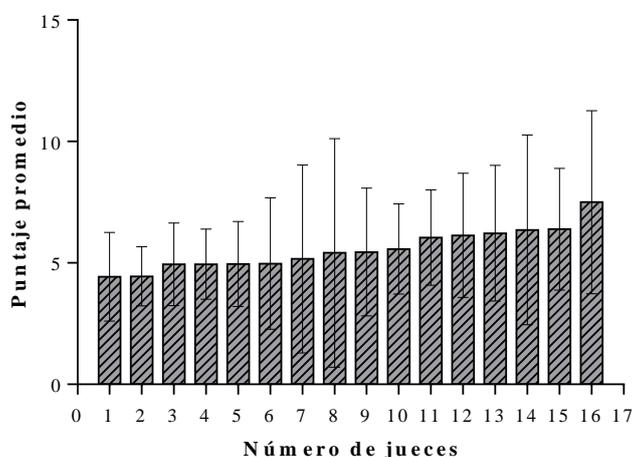
#### **4.7.1. Evaluación sensorial de la bebida**

La evaluación sensorial de la bebida óptima se realizó mediante una prueba de aceptabilidad general, para ello se consideró agregar jalea de fresa. La prueba se realizó con 80 panelistas sin entrenar, quienes evaluaron las propiedades sensoriales de la bebida. La media de los puntajes obtenidos por los panelistas se muestra en la Figura 23. La bebida optimizada tuvo una puntuación de  $5.4 \pm 2.4$  en aceptabilidad general, la que encuentra dentro de los rangos "me gusta" y "me gusta mucho" de la escala no estructurada (1-10 cm). Cabe resaltar que los resultados pudieron estar influenciados por la adición de jalea de fresa, así como también por los metabolitos producidos a partir del metabolismo de las bacterias, que proporcionan importantes atributos de sabor (Salmerón *et al.* 2014). Debido a que las bacterias probióticas fermentan los carbohidratos de frutas, verduras, cereales y legumbres produciendo gas y alcohol (Mohammadi *et al.* 2011). Las bacterias probióticas el género *L. plantarum* se caracteriza por la formación de diacetil (un fuerte olor a mantequilla) y acetoína (un olor similar al yogur), que podría mejorar el sabor de los alimentos fermentados, como el yogur (Xiao y Lu 2014).

Por otro lado, Singh *et al.* (2017), afirman que los compuestos fenólicos presentes en el lupino también pueden afectar las propiedades sensoriales de los alimentos. Cabe resaltar que, elaborar bebidas no lácteas es un desafío, en vista que las legumbres presentan componentes distintos a los que se pueden encontrar en frutas y lácteos, facilitando la aceptabilidad del consumidor. Esta afirmación es reforzada por Sethi *et al.* (2016), que señalan que, en las alternativas lácteas a base de legumbres, la aceptabilidad sensorial es un factor limitante. Por la presencia de ácidos grasos insaturados y la presencia de lipoxigenasas (Maestri *et al.* 2000 ) quienes catalizan la formación de hidroperóxidos, a partir de ácidos grasos insaturados, cuando se degradan, dando lugar a compuestos volátiles y no volátiles,

como aldehídos y alcoholes de cadena media (*n*-hexanal y *n*-hexanol), que se asocian con sabor a frijol o desagradable (Silva *et al.* 2020). Sin embargo, los procesos tanto tecnológicos como fermentativos, pueden mejorar la calidad sensorial (eliminar el sabor a frijol) (Caplice *et al.* 1999).

Así mismo es importante tener en cuenta que los métodos de conservación también puede influir en las propiedades sensoriales. Mäkinen *et al.* (2015) mencionan que la pasteurización, el tratamiento UHT, mejora la estabilidad microbiológica y extiende la vida útil del producto. Sin embargo, el tratamiento térmico puede causar cambios en las propiedades de las proteínas y vitaminas, lo que influye en la estabilidad, el sabor, el aroma y el color del producto final.



**Figura 23:** Evaluación de aceptabilidad general de la bebida fermentada, cada barra representa el promedio de 5 jueces de los 80 evaluados.

#### 4.7.2. Estabilidad durante el almacenamiento de la bebida probiótica

- **Viabilidad de las bacterias probióticas**

El comportamiento de las bacterias probióticas en la bebida durante 28 días de almacenamiento a 4 °C se muestra en la Figura 24. La bebida fermentada a base de lupino frutada con jalea de fresa posterior a los 7 días, mostró una disminución ligera a un nivel de 9.04 log UFC/ml, y a los 14 días de almacenamiento la tendencia de la viabilidad tiende a bajar un ciclo logarítmico y posteriormente se mantiene constante durante los 28 días. La disminución ligera de las bacterias puede verse afectadas también por la acidez y los bajos niveles de pH, debido a la producción de ácido láctico y ácidos orgánicos, que inhiben el

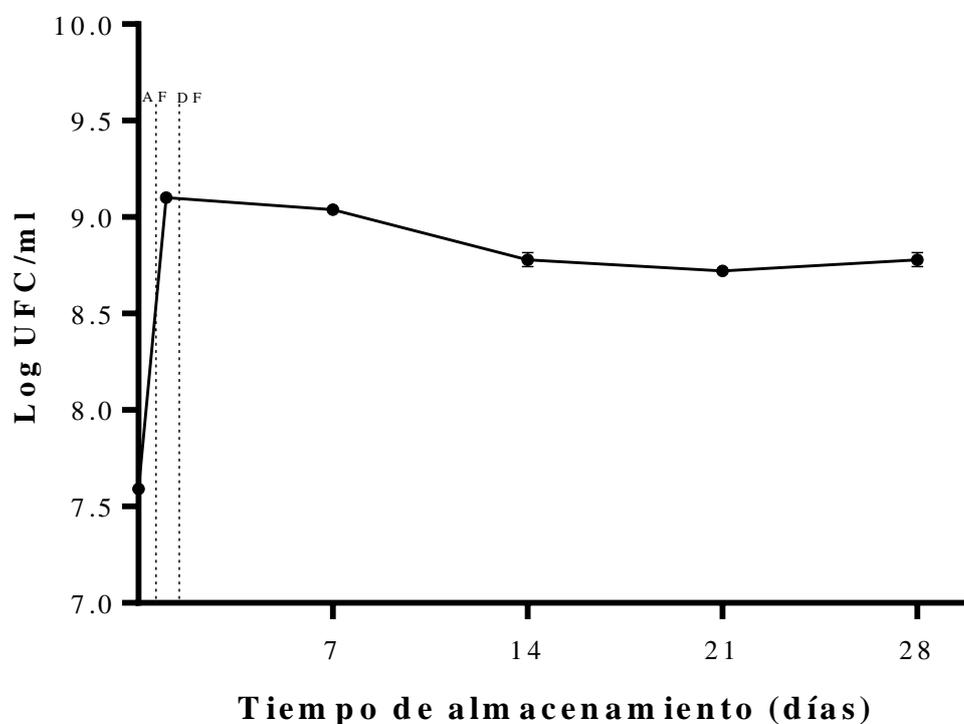
crecimiento microbiano en su forma no disociada, disociada o indirectamente mediante la liberación de protones ( $H^+$ ) en el medio (Rathore *et al.* 2012). Al respecto Champagne *et al.* (2008), mencionan que, por lo general los jugos de frutas con bajo pH y un alto contenido de ácidos orgánicos imponen un desafío de estrés significativo a los probióticos.

El recuento de células viables de *L. plantarum* 299v posterior a los 28 días fue de 8.75 log ( $57 \times 10^7$ ) UFC/ml, con una reducción de 0.26 log aun pH de 3.85. Sin embargo, cabe resaltar que el nivel obtenido al final del almacenamiento se encontró muy por encima del mínimo terapéutico recomendado de 6 log UFC/ml en el momento del consumo (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud 2001). Dichos valores del estudio también fueron superiores a los obtenidos por Angelov *et al.* (2006), durante 21 días de almacenamiento de una bebida de avena.

El mantenimiento de la viabilidad de las bacterias pudo estar influido por la presencia de inulina en la bebida, como lo mencionan Capela *et al.* (2006), la adición de oligofruktosa como prebiótico al yogur (1,5 % *p/v*) mejoró la viabilidad de los organismos probióticos durante el almacenamiento refrigerado. Los fructanos, fructo oligosacáridos e inulina, así como los galacto oligosacáridos (GOS) y la lactulosa, son los compuestos más utilizados como prebióticos que ayudan a mejorar la actividad de los probióticos (Markowiak *et al.* 2017; Rastall *et al.* 2015). Así mismo, Savedboworn *et al.* (2017), determinaron que la suplementación de inulina al 2 % proporcionó el mayor número de células viables de 8.90 UFC/ml después de la fermentación de extracto de arroz Plai Ngahm Prachin Buri. Respecto a la reducción obtenida al final del almacenamiento, este valor fue más bajo frente a lo reportado en otros productos como jugos, donde mencionan que la disminución de 0.4 log después de 6 semanas de almacenamiento a 4 °C se observó en naranja y piña, los cuales tenían un valor de pH de aproximadamente 3.8. Disminuciones más resaltantes fueron de 8.0 log, la viabilidad celular en los jugos puede estar fuertemente influenciado por los altos niveles de compuestos fenólicos y al muy bajo pH de estos jugos por ejemplo granada y fresa con  $pH \leq 3$  (Nualkaekul *et al.* 2011), dicho comportamiento no se observó en el trabajo de investigación en vista que el valor de pH final de almacenamiento fue de 3.85 (Cuadro 25).

Como se mencionó anteriormente la viabilidad de las bacterias en el producto probiótico durante el almacenamiento, es considerado un factor crítico, la viabilidad de los probióticos

en las leches fermentadas podría verse afectada significativamente por la formulación y los factores del proceso durante la producción (Lucas *et al.* 2004). La bebida a base de lupino cumple con el nivel exigido de probióticos viables posterior al proceso de almacenamiento. Sin embargo, se vienen desarrollando trabajos de investigación relacionados a bacterias probióticas no viables, los llamados paraprobióticos, que son células microbianas (probióticas o no probióticas) intactas inactivas (no viables), que cuando se administran en cantidades suficientes confieren beneficios a los consumidores (Cuevas-González *et al.* 2020). Esto significaría que las bacterias no viables intactas, que se incrementan durante el almacenamiento en la bebida de lupino, podrían también ejercer efectos saludables.



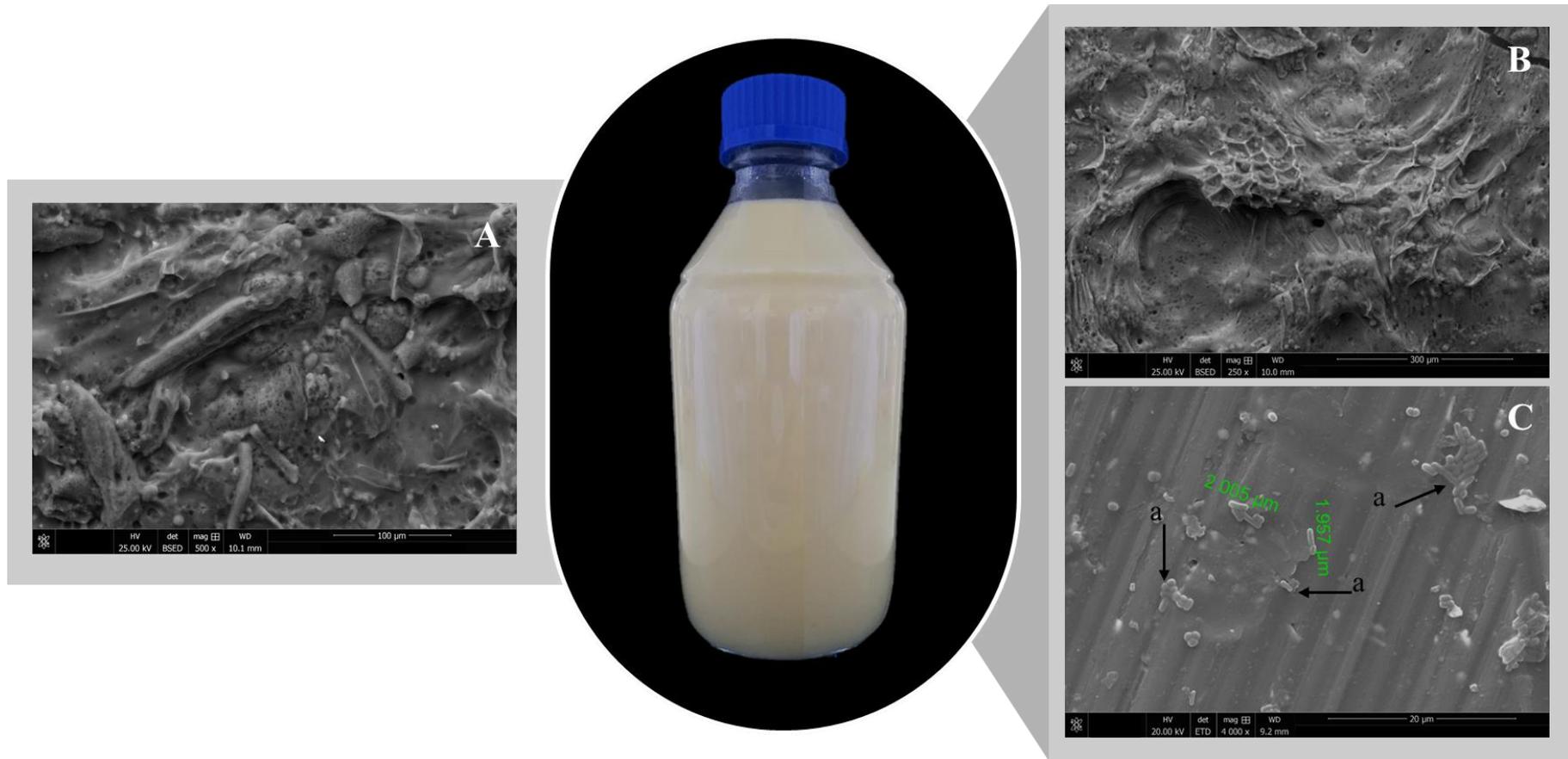
**Figura 24:** Viabilidad de *L. plantarum* 299v (●) durante el almacenamiento. AF (antes de fermentar), DF (Después de fermentar).

- **Características morfológicas**

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido indicaron diferencias en la microestructura de las muestras antes y después de fermentar (Figura 25 A y B). La bebida antes de fermentar es mucho más rugosa con presencia de partículas irregulares, en contraste a la bebida después de fermentar, que es más homogénea. Dicha estructura en la bebida

fermentada puede estar relacionado con la producción de exopolisacáridos (EPS) generados por los procesos metabólicos de las bacterias. Según Gangoiti *et al.* (2017) los EPS contribuye con la reología de los alimentos fermentados y proporciona posibles propiedades promotoras de la salud en los avances de los alimentos funcionales.

Por otro lado, a mayor aumento las bacterias de *Lactobacillus plantarum* 299v presentes en la bebida se muestran como barras regulares de aproximadamente 1.9 - 2  $\mu\text{m}$  de largo, con algunas formas más cortas y alargadas (Figura 24C). Las bacterias presentan una distribución aleatoria en la bebida fermentada, asociada con la penetración de las mismas en los espacios intracelulares, poros y capilares de los tejidos vegetales (Brackett y Splittstoesser 2001).



**Figura 25: Microestructuras mediante SEM de la bebida de lupino: A) Antes de fermentar (500x), B) Después de fermentar (250x) y C) Viabilidad de *L. plantarum* 299v después de fermentar (4000x)**

a: bacterias; Det: detector con detector de electrones retrodispersados (BSED - Back Scattered Electron Detector); Mag: magnificación o aumento y WD: distancia de trabajo.

- **Características fisicoquímicas y reológicas**

En el Cuadro 25 se muestra las características fisicoquímicas de la bebida a base de lupino almacenada durante un periodo de 28 días a 4 °C. El pH de la bebida al inicio del almacenamiento fue de 4.72, posterior a los 28 días el pH desciende a 3.85. lo cual se asocia directamente con la disminución de la viabilidad de las bacterias probióticas. En trabajos anteriores se observó una disminución en el pH de un producto similar al yogur a base de maíz simbiótico de aproximadamente 4.50 a 3.88 durante el almacenamiento (Wang, Zheng, Liu, Wang y Guo 2017). En cuanto a la acidez titulable de la bebida, inicialmente fue 0.31 %, posterior a la etapa de almacenamiento alcanzo a 0.76 %. Los valores de acidez obtenida al inicio del almacenamiento fueron similares a los reportados por Beuchat *et al.* (1978), en leche de maní fermentada (0.3-0.53 %) durante 48-72 h. El patrón de comportamiento del pH y la acidez titulable de la bebida se atribuye a la acumulación de algunos ácidos orgánicos y ácido acético como resultado de las actividades metabólicas de los microorganismos fermentativos como las bacterias del ácido láctico (Gesinde *et al.* 2008; Almeida *et al.* 2007).

**Cuadro 25: Características fisicoquímicas y reológicas de la bebida fermentada**

Tiempo de almacenamiento (días)	pH	AT (% ácido láctico)	Firmeza (mN)	Viscosidad (cP)
1	4.72±0.015 <sup>a</sup>	0.31±0.02 <sup>a</sup>	62.63±1.47 <sup>a</sup>	1327.8±6.94 <sup>a</sup>
7	4.18±0.006 <sup>b</sup>	0.53±0.01 <sup>b</sup>	61.75±0.29 <sup>ab</sup>	869.0±2.31 <sup>b</sup>
14	4.02±0.035 <sup>c</sup>	0.54±0.02 <sup>b</sup>	60.37±0.28 <sup>ab</sup>	464.6±3.95 <sup>d</sup>
21	3.87±0.006 <sup>d</sup>	0.71±0.01 <sup>c</sup>	59.30±1.69 <sup>c</sup>	465.2±4.67 <sup>d</sup>
28	3.85±0.020 <sup>d</sup>	0.76±0.01 <sup>d</sup>	60.93±1.42 <sup>ab</sup>	534.4±5.09 <sup>c</sup>

Valores expresados como promedio ± desviación estándar. AT: Acidez titulable. \*Bebida sin frutar

Por otro lado, la firmeza de la bebida posterior al proceso de fermentación fue de 62.63 mN. Durante los 28 días de almacenamiento, la tendencia de la firmeza de la bebida tuvo un comportamiento constante con excepción del día 21 (Cuadro 25). Características muy similares se observaron en trabajos previos de yogurt fortificado con fitoesteroles (Izadi *et al.* 2015). Al respecto Tamime *et al.* (1991), reportaron que la diferencia en la firmeza de los yogures podría atribuirse a la estructura de la matriz proteica del gel. Finalmente, la viscosidad de la bebida disminuyó de 1327.8 ± 6.94 a 534.4 ± 5.09 cP durante los 28 días de

almacenamiento, este comportamiento probablemente esté relacionado con la capacidad de retención de agua (Duru *et al.* 2019). Sathe *et al.* (1982) mencionan que la capacidad de absorción de agua de la harina de *L. mutabilis* es menor debido a la presencia de grasa (17,9 %); así mismo, la baja capacidad de absorción de agua puede estar relacionada con una baja disponibilidad de aminoácidos polares, que son los sitios principales para la interacción de proteínas con el agua. Los valores obtenidos de la viscosidad de la bebida fueron muy inferiores a los reportados por Izadi *et al.* (2015); sin embargo, al comparar con una bebida fermentada a base de quinoa, los valores obtenidos fueron mayores (Lorusso *et al.* 2018)

## V. CONCLUSIONES

1. Se realizó la caracterización física y química proximal, observándose una mayor concentración de proteínas posterior al proceso de desamargado.
2. Se identificaron y cuantificaron los alcaloides en los diez ecotipos de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) sin desamargar y desamargados, identificándose ocho alcaloides en las semillas sin desamargar y dos alcaloides residuales posterior al proceso de desamargado acuoso, la concentración de los alcaloides en las semillas desamargadas tuvieron un valor muy bajo respecto al nivel máximo permitido por las regulaciones internacionales.
3. Se identificaron y cuantificaron los flavonoides (isoflavonas y flavonas) en los diez ecotipos de lupino sin desamargar y desamargados. Observándose que posterior al proceso de desamargado acuoso los flavonoides disminuyen en los distintos ecotipos, así mismo se observaron diferencias significativas entre los diez ecotipos evaluados.
4. De las semillas desamargadas, se seleccionó el ecotipo apropiado para la elaboración de la bebida, siendo el ecotipo Altagracia el que presentó mayor concentración de proteínas, niveles no significativos de alcaloides residuales y un importante contenido de flavonoides (isoflavonas y flavonas).
5. Se evaluó los factores de formulación de la bebida sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 299v y el nivel de pH. La viabilidad de las bacterias probióticas y el pH en la bebida a base de lupino estuvo influenciada principalmente por el tipo de bacteria probiótica, concentración de azúcar y relación de lupino: agua. La tasa de crecimiento de las bacterias probióticas en la bebida fue significativa, lo que permitió considerarla bebida potencialmente probiótica de acuerdo a los niveles terapéuticos establecidos, y el nivel de pH alcanzo valores deseados en la bebida.

6. Se realizó la caracterización fisicoquímica y sensorial de la bebida probiótica óptima, cuyos resultados mostraron una buena aceptabilidad por parte de los consumidores.
7. Se identificaron los cambios fisicoquímicos en la bebida durante el tiempo de almacenamiento, la bebida presentó características similares a otras bebidas a base de fuentes vegetales en relación al pH, acidez, viscosidad y nivel de viabilidad de bacterias probióticas, demostrándose en el estudio, que las matrices vegetales podrían actuar como vehículos de bacterias.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar tipos de estabilizantes y tiempos de homogenización para mejorar la viscosidad de la bebida probiótica.
2. Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios generados posterior al proceso de fermentación.
3. Realizar estudios *in vitro* que simulen la digestión, para evaluar la estabilidad de los probióticos, utilizados en la matriz alimentaria.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlerberth, I; Ahrné, S; Johansson, ML; Molin, G; Hanson, LÅ; Wold, AE. 1996. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied Environment Microbiology* 62:2244-51
- Adlercreutz, H; Mazur, W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Journal Annals of Medicine* 29:95-120
- Aisyah, S; Vincken, JP; Andini, S; Mardiah, Z; Gruppen, H. 2016. Compositional changes in (iso)flavonoids and estrogenic activity of three edible *Lupinus* species by germination and *Rhizopus-elicitation*. *Phytochemistry* 122:65-75
- Aguilar-Toalá, JE; Garcia-Varela, R; Garcia, HS; Mata-Haro, V; González-Córdova, AF; Vallejo-Cordoba, B; Hernández-Mendoza, A. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75:105-114
- Almeida, EG; Rachid, CC; Schwan, RF. 2007. Microbial population present in fermented beverage “cauin” produced by Brazilian Amerindians. *International Journal of Food Microbiology* 120:146-151.
- Andrade, JE; Ju, YH; Baker, C; Doerge, DR; Helferich, WC. 2015. Longterm exposure to dietary sources of genistein induces estrogen-independence in the human breast cancer (MCF 7) xenograft model *Molecular Nutrition and Food Research* 59:413-423
- Angelov, A; Gotcheva, V; Kuncheva, R; Hristozova, T. 2006. Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology* 112:75–80
- Ankenman, GL; Morr, CV. 1996. Producción mejorada de ácido, sabor y compuestos volátiles en productos similares a yogur con alto contenido de proteína y fibra de soja. *Journal Food Science* 61:331-336
- A.O.A.C. 2005. *Official Methods of Analysis*. 19 th. Dr. George W. Latimer J, editor.
- Aragon-Alegro, L; Alegro, JHA; Cardarelli, HR; Chiu, MC; Saad, SMI. 2007. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT – Food Science Technology* 40(4): 669-675.
- Ashengropha, M; Nahvib, I; Aminic, J. 2013. Application of Taguchi Design and Response Surface Methodology for Improving Conversion of Isoeugenol into Vanillin by Resting

- Cells of *Psychrobacter* sp. CSW4 Morahem. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2 (3): 411-421
- Australia New Zealand Food Standards Code, 2011. Standard 2.5.3. Fermented Milk Products. Commonwealth of Australia [online] Available at: <<http://www.comlaw.gov.au/Details/F2011C00622>> [Accessed 03 Febrero 2020]
- Ayala, J; Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. Lima, Perú, CONCYTEC. 261 p.
- Barbaros, H; Huseyin, A. 2010. Review: Functional milks and dairy beverages. International Journal of Dairy Technology 63:1.
- Barceló, AR; Muñoz, R. 1989. Epigenetic control of a cell wall scopoletin peroxidase by lupisoflavone in *Lupinus*. Phytochemistry 28:1331-1333
- Bednarek, P; Kerhoas, L; Einhorn, J; Franski, R; Wojtaszek, P; Rybus-Zajac, M; Stobiecki M. 2003. Profiling of flavonoid conjugates in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* responding to biotic and abiotic stimuli. Journal Chemical Ecology. 29:1127-1142
- Beuchat, LR; Nail, BJ. 1978. fermentación de la leche de maní con *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*. Journal Food Science 43:1109 - 1112.
- Bernat, N; Chafer, M; Gonzalez-Martínez, C; Rodríguez-García, J; Chiralt, A. 2013. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. Food Science and Technology International 0(0):1-13
- Bertazzoni, E; Donelli, G; Midtvedt, T; Nicoli, J; Sanz, Y. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? 2013. Journal Chemother 25:1932-12
- Bianchi, F; Rossi, EA; Gomes, RG; Sivieri, K. 2014. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy Food Science and Technology International 21(6):403-415
- Brackett, RE; Splittstoesser, DF. 2001. Fruits and vegetables F.P. Downes, K. Ito (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association – APHA, Washington, DC pp. 515-520
- Buruleanu, LC; Bratu, MG; Manea, I; Avram, D; Nicolescu, CL. 2013. Fermentation of vegetable juices by *Lactobacillus acidophilus* LA-5. J.M. Kongo (Ed.), Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, InTech, Rijeka, Croatia, pp. 173-194
- Cai, R; Klamczynska, B; Baik, BK. 2001. Preparation of bean curds from protein fractions of six legumes Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:3068-307

- Calabrò S, Cutrignelli MI, Lo Presti V et al. 2015. Characterization and effect of year of harvest on the nutritional properties of three varieties of white lupine (*Lupinus albus* L.). *Journal Science Food Agriculture* 95 (15):3127-3136.
- Capela, P; Hay, TKC; Shah, NP. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International* 39:203-211
- Caplice, E; Fitzgerald, G. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50:131–149
- Carvajal-Larenas, FE; Linnemann, AR; Nout, MJR; Coziol, M; Van Boekel, MAJS .2016. Critical Reviews in Food Science and Nutrition *Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering. *Critical Review Food Science Nutrition* 56:1454-1487.
- Carvajal-Larenas, FE. 2019. Nutritional, rheological and sensory evaluation of *Lupinus mutabilis* food products - a Review. *Czech Journal of Food Sciences* 5(37):301-311
- Carvalho, IS; Chaves, M; Ricardo, CP. 2005. Influence of water stress on the chemical composition of seeds of two lupins (*Lupinus albus* and *Lupinus mutabilis*). *Journal Agronomy and Crop Science* 191:95-98.
- Carrão-Panizzi, MC; Kitamura, K; Beleia, AD; Oliveira, MCN. 1998. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. *Breeding Science* 48: 409-413
- Champagne, CP; Raymond, Y; Gagnon, R. 2008. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. *Journal Food Science* 73:M221-M226
- Chirinos, R; Pedreschi, R; Rogez, H; Larondelle, Y; Campos, D. 2013a. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products* 47:145–152
- Chirinos, R; Zuloeta, G; Pedreschi, R; Mignolet, E; Larondelle, Y; Campos, D. 2013b. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): a seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141, 1732–1739
- Coda, R; Lanera, A; Trani, A; Gobbetti, M; Di Cagno, R. 2012. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *International Journal of Food Microbiology* 155: 120-127
- Cortés-Avenidaño, P; Tarvainen, M; Suomela, JP; Glorio-Paulet, P; Yang, B; Repo-Carrasco-Valencia, R. 2020. Profile and Content of Residual Alkaloids in Ten Ecotypes

of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process. Plant Foods for Human Nutrition

- Cuevas-González, PF; Liceaga, AM; Aguilar-Toalá, JE. 2020. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications: Review. Food Research International 136: 109502
- Curti, CA; Curti, R; Bonini, N; Ramón, A. 2018. Short communication. Changes in the fatty acid composition in bitter *Lupinus* species depend on the debittering process. Food Chemistry 15(263):151-154
- da Silva Sabo, S; Converti, A; Todorov, SD; Domínguez, JM; de Souza Oliveira, RP. 2015. Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in stationary and shaken cultures International Journal of Food Science & Technology 50:864-870
- Dai, J; Mumper, RJ. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15: 7313-7352
- de Cortés, M; Altares, P; Pedrosa, MM; Burbano, C; Cuadrado, C; Goyoaga, C; Muzquiz, M; Jimenez- Martínez, C. 2005. Variación alcaloide durante la germinación en diferentes especies de altramuces. Food Chemistry 90:347-355
- Dini, I; Schettino, O; Dini, A. 1998. Studies on the constituents of *Lupinus mutabilis* (Fabaceae). Isolation and characterization of two new isoflavonoid derivatives Journal of Agricultural and Food Chemistry 46:5089-5092
- Donohue, DC; Salminen, S. 1996. Safety of Probiotic Bacteria. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 5(1):25-8
- Dueñas, M; Hernández, T; Estrella, I; Fernández, D. 2009. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). Food Chemistry 117(4):599-607
- Dueñas, M; Muñoz-Gonzalez, I; Cueva, C; Jimenez-Giron, A; Sanchez-Patan, F; Santos-Buelga, C; Moreno-Arribas, MV; Bartolome, B. 2015. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. BioMed Research International 5:850902
- Duru, KC; Kovaleva, E; Danilova, I; Belousova, A. 2019. Production and assessment of novel probiotic fermented oat flour enriched with isoflavones. LWT - Food Science and Technology 111:9–15
- Elagöz, A; Abdi, A; Hubert, J.-C.; Kammerer, B. 1996. "Structure and organisation of the pyrimidine biosynthesis pathway genes in *Lactobacillus plantarum*: A PCR strategy for sequencing without cloning. Gene 182 (1-2): 37-43.

- Espírito-Santo, A, Lagazzo, A, Sousa, A; Perego, P; Converti, A; Oliveira, MN. 2013. Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International* 50(1):224-231
- FAO/WHO 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>
- Faraj, A; Vasanthan, T. 2004. Soybean isoflavones: effects of processing and health benefits *Food Reviews International* 20: 51-75
- FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC> (accessed Marzo 28, 2020)
- FDA. 2013. Yogurt. 21 CFR 131.200, Code of Federal Regulations. U. S. Dept. of Health and Human Services, Washington, DC.
- Feyza, E; Tutuncu, S; Ozcelika, B. 2020. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects *Journal of Functional Foods* 70:103975
- Fijan, S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal Environmental Research Public Health* 11: 4745-4767
- Frick, KM; Foley, RC; Garg, G; Singh, KB; Kamphuis, LG. 2018. Characterization of the genetic factors affecting quinolizidine alkaloid biosynthesis and its response to abiotic stress in narrow - leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Frontiers in Plant Science* 41:2155-2168
- Gálvez, L; Apostolidis, E; Genoves, M; Lajolo, F; Shetty, K. 2009. Evaluation of Indigenous Grains from the Peruvian Andean Region for Antidiabetes and Antihypertension Potential Using In Vitro Methods. *Journal of Medicinal Food* 12 (4):704-713.
- Ganzera, M; Krügera, A; Wink, M. 2010. Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53:1231-1235
- Gangoiti, MV; Puertas, AI; Hamet, MF; Peruzzo, PJ; Llamas, MG; Medrano, M; Prieto, A; Dueñas, MT; Abraham, AG. 2017. *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An  $\alpha$ -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydrate Polymers* 170:52–59.
- Gbassi, GK; Vandamme, T; Ennahar, S; Marchioni, E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal Food Microbiology* 129:103–105.
- Genovese, MI; Hassimotto, NMA; Lajolo, FM. 2004. Isoflavone Profile and Antioxidant

- Activity of Brazilian Soybean Varieties. *Food Science and Technology International* 11(3):205–211
- Gesinde, AF; Oyawoye, OM; Adebisi, A. 2008. Comparative studies on the quality and quantity of soymilk from different varieties of soybean. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (1): 157-160
- Gibson, G; Roberfroid, M.1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125:1401-1412.
- Gibson, G; Williams, C. 2000. *Functional Foods: Concept to Product*, pp 374. Cambridge: Woodhead Publishing
- Gibson, GR; Hutkins, RW; Sanders, ME; Prescott, SL; Reimer, RA; Salminen, SJ; Scott, K; Stanton, C; Swanson, KS; Cani, PD; Verbeke, K; Reid, G. 2017. "The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics". *Faculty Publications in Food Science and Technology*. 234.
- Granato, D; Branco, G; Nazzaro, F; Cruz, A; Faria, JAF. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9: 292-302
- GRAS notice (GRN), No. 685 Generally Recognized as Safe (GRAS). 2020. Determination for the Use of *Lactobacillus plantarum* 299v in Conventional Foods. Available online: <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm544492.pdf> (accessed on 10 february 2020)
- Gross, R; von Baer, E; Koch, F; Marquard, R; Trugo, L; Wink, M. 1988. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) with low-alkaloid content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1(4):353-361
- Guerin, M; Souidi, K; Remize, F. 2020. Review Lactic Fermented Fruit or Vegetable Juices: Past, Present and Future Cyrielle Garcia. *Beberage* 6:8
- Gupta, S; Cox, S; Abu-Ghannam, A. 2010. Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochemical Engineering Journal* 52:199-204
- Guarner, F; Perdigon, G; Corthier, G; Salminen, S; Koletzko, B; Morelli, L. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition* 93:783-786
- Gürakan, CG; Cebeci, A; Özer, B. 2010. Probiotic dairy beverages: Microbiology and technology. In Yıldız F (Ed.) *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. CRC Press, London, pp 166–180

- Güemes-Vera, N; Peña-Bautista, RJ; Jiménez-Martínez, C; Dávila-Ortiz, G; Calderón-Domínguez, G. 2008. Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. *Journal Science Food Agriculture* 88:1135-1143
- Gutiérrez, B; Arro, J; Zhong, GY; Brown, S. 2018. Linkage and association analysis of dihydrochalcones phloridzin, sieboldin, and trilobatin in *Malus*. *Tree Genetics & Genomes* 14: 91
- Guven, M; Yasar, K; karaca, O; Hayaloglu, A. 2005. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology* 58: 3
- Halliwell, D. 2002. Hands up for probiotics! The mechanism for health benefits is unclear, but interest remains strong. *World of Food Ingredients* March 46–50
- Hamilton, J; Gibson, M; Bruck, W. 2003. Some insight into the derivation and early uses of the word ‘probiotic’. *British Journal of Nutrition* 90:845
- Hatzold, T; Elmadfa, I; Gross, R; Wink, M; Hartmann, T; Witte, L.1983. Quinolizidine Alkaloids in Seeds of *Lupinus mutabilis*. *Journal Agriculture Food Chemistry* 31(5):934-930
- Hattingh, A; Viljoen, B. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11: 1-17
- Health Canada. 2009. Accepted Claims about the Nature of Probiotic Microorganisms in Food. Health Canada [online], [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/probiotics\\_claims-allegations\\_probiotiques-eng.php%20](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/label-etiquet/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20).
- Hill, C; Guarner, F; Reid, G; Gibson, GR; Merenstein, DJ; Pot, B; Morelli, L; Canani, R B; Flint, H. J; Salminen, S; Calder, P C; Sander, ME. 2014. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11: 506-514
- Hilliam, M. 2004. Healthier dairy. *World Food Ingredients* 52-54
- Hutkins, RW; Nannen, NL. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria *Journal Dairy Science*. 76:2354-2365
- Hodgson, J; Lee, Y. 2008. Potential for benefit of lupin on obesity and cardiovascular disease risk in humans. In *Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference*; Palta, J. A., Berger, J. B., Eds.; Fremantle: Canterbury, Western Australia, 466–468

- Istvan, S; Kapolna, E; Kapolna, B, Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite* 51: 456-467
- IBPGR. 1981. Lupin descriptors, Secretariat Rome
- IDF, International Dairy Federation.1991. IDF/ISO Standard 150:1991 Yogurt. Determination of titratable acidity
- ICMSF, International Commission Microbiological Specifications for Food. 2000. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de Análisis Microbiológico. Volumen 1. Editorial Acribia. Zaragoza, España
- Izadi, Z; Nasirpour, A; Garoosi, G, Tamjidi, F. 2015. Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. *Journal Food Science Technology* 52(8):5341–5346
- Jacobsen, E; Mujica, A. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 458-482
- Jappe, U; Vieths, S. 2010. Lupine, a source of new as well as hidden food allergens. *Molecular Nutrition and Food Research* 54:113-126
- Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Álvarez-Manilla, G; Robledo-Quintos, N; Martínez-Herrera, J; Dávila-Ortiz, G. 2001. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. *Journal Science Food Agriculture* 81:421-428.
- Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Dávila-Ortiz, G. 2003a. Production of a yogurt-like product from *Lupinus campestris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 515-522.
- Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Dávila-Ortiz, G. 2003b. Lupines: An alternative for debittering and utilization in foods. *In* Gutiérrez-López, G; Barbosa-Cánovas, G (eds.). *Food Science and Food Biotechnology*. Florida, USA, CRC Press, p. 233-252.
- Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Dávila-Ortiz, G. 2007. Diminution of quinolizidine alkaloids, oligosaccharides and phenolic compounds from two species of *Lupinus* and soybean seeds by the effect of *Rhizopus oligosporus*. *Journal Science Food Agriculture* 87 (7):1315-1322.
- Johansson, ML; Nobaek, S; Berggren, A; Nyman, M; Björck, I; Ahrné, S; Jeppsson, B, Molin, G.1998. Survival of *Lactobacillus Plantarum* DSM 9843 (299v), and Effect on the Short-Chain Fatty Acid Content of Faeces After Ingestion of a Rose-Hip Drink With Fermented Oats. *International Journal Food Microbiology* 30;42(1-2):29-38.

- Kachlicki, P; Marczak, L; Kerhoas, L; Einhorn, J; Stobiecki, M. 2005. Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *Journal Mass Spectrometry* 40(8):1088-1103.
- Kachlicki, P; Piasecka, A; Stobiecki, M; Marczak, Ł. 2016. Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. *Molecules* 21(11):1494
- Khan, MK; Karnpanit, W; Nasar-Abbas, SM; Huma, V; Jayasena, ZE. 2015. Phytochemical composition and bioactivities of lupin: A review. *International Journal of Food Science and Technology* 50:2004-2012.
- Kollath, W. 1953. Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift* 8:7-16
- Kučerka, N; Gallová, J; Uhríková, D. 2019. The Membrane Structure and Function Affected by Water. *Chemistry and Physics of Lipids* 221:140-144
- Lamsal, BP; Faubion, JM. 2009. The beneficial use of cereal and cereal component in probiotic foods. *Food Reviews International* 25:103-114
- Les Grands Prix SIAL Innovation. Available online: <https://www.sialparis.fr/Programme/SIAL-Innovation/Les-gagnants-du-prix-SIAL-Innovation/GRAND-PRIX-OR-Namaste-water-kefirs> (accessed on 20 April 2020).
- Lilly, DM; Stillwell, RH. (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747–748. Linsalata, M., Russo, F., Berloco, P., Caruso, M. L., Matteo, G
- Li, L; Mendis, N; Trigui, H; Oliver, JD; Faucher, SP. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 5:258.
- Liu, P; Lindstedt, A; Markkinen, N; Sinkkonen, J; Suomela, JP; Yang, B. 2014. Characterization of Metabolite Profiles of Leaves of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- Lorusso, A; Coda, R; Montemurro, M; Rizzello, CJ. 2018. Use of Selected Lactic Acid Bacteria and Quinoa Flour for Manufacturing Novel Yogurt-Like Beverages. *Foods* 7(4): 51
- Lucas, MM; Stoddard, FL; Annicchiarico, P; Frías, J; Martínez- Villaluenga, C; Sussmann, D; Duranti, M; Seger, A; Zander, PM; Pueyo, JJ. 2015. The future of lupin as a protein crop in Europe. *Front Plant Science* 6:705
- Lucas, A; Sodini, I; Monnet, C; Jolivet, P; Corrieu, G. 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein

- hydrolysates. *International Dairy Journal* 14:47-53
- Ludeña, F; García, M, Tolonen, T; Jaakkola, M; Pena-Niebuhr, M; von Wright, A; Repo-Carrasco-Valencia, R; Korhonen, H, Plumed-Ferrer, C. 2016. Development of a fermented quinoa- based beverage. *Food Science Nutrition* 5:602–608
- Maestri, DM; Labuckas, DO; Guzman, CA. 2000. Chemical and physical characteristics of a soybean beverage with improved flavor by addition of ethylenediaminetetraacetic acid. *Grasas Aceites* 51(5):316–319
- Magalhães, SCQ; Fernandes, F; Cabrita, ARJ; Fonseca, AJM; Valentão, P; Andrade, P. 2017. Alkaloids in the valorization of European *Lupinus* spp. seeds crop. *Industrial Crop Products* 95:286-295.
- Mäkinen, OE; Uniacke-Lowe, T; O’Mahony, JA; Arendt, EK. 2015. Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk *Food Chemistry* 168 (1):630-638
- Mäkinen, OE; Wanhalinna, V; Zannini, E; Arendt, EK. 2016. Foods for special dietary needs: non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy type products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(3):339-349
- Mantegazza, C; Molinari, P, D’Auria, E; Sonnino, M; Morelli, L; Vincenzo, GV. 2018. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacological Research* 128:63-72
- Mariotti, M; Alamprese, C; Pagani, MA; Lucisano. 2006. Effect of puffing on ultrastructure and physical characteristics of cereal grains and flours. *Journal of Cereal Science* 43(1):47-56
- MarketResearch.com. 2020. Global Dairy Alternatives Market 2020 by Manufacturers, Regions, Type and Application, Forecast to (2020-2025) (MarketResearch.com)
- MarketResearch.com. 2020. Global Probiotic Ingredients Market 2020 by Manufacturers, Regions, Type and Application, Forecast to 2025 (MarketResearch.com)
- Markowiak, P; Śliżewska, K. 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 9:1021
- Mårtensson, O; Öste, R; Holst, O. 2002. Lactic acid bacteria in an oat-based non-daily milk substitute: Fermentation characteristics and exopolysaccharide formation. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie* 33:525–530.
- Martínez-Villaluenga; Gómez, R. 2007. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic.

International Dairy Journal 17 (2):116-122

- Matusek, A; Merész, P; Le, TKD; Örsi, F. 2009. Effect of temperature and pH on the degradation of fructo-oligosaccharides. *European Food Research and Technology* 228: 355-365
- Melgar-Lalanne, G; Rivera-Espinoza, Y; Farrera-Rebollo, R; Hernández-Sánchez, H. 2014. Survival under stress of halotolerant lactobacilli with probiotic properties. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13: 323-335
- Miano, AC; García, JA; Augusto, PED. 2015. Correlation between morphology, hydration kinetics and mathematical models on Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) grains. *LWT-Food Science Technology* 61 (2):290-298
- Ming, T; Han, J; Li, Y; Lu, Ch; Qiu, D; Li, Y; Zhou, J; Su, X. 2018. A metabolomics and proteomics study of the *Lactobacillus plantarum* in the grass carp fermentation. *BMC Microbiology* 18, 216
- Mital, BK; Steinkraus, KH; Naylor, HB. 1974. Growth of lactic acid bacteria in soy milks *Journal Food Science* 39:1018-1022
- Mridula, D; Sharma, M. 2015. Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk *LWT Food Science Technology* 62:482-487
- Molin, G. 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 380S-385S
- Molin, N; Albertsson, KE; Bengmark, S; Larsson, K. 1993. Nutrient composition and method for the preparation. Swedish patent 463796. (Norwegian patent 178321, Danish patent 171057, German patent DE 689 07 057 T2, European patent 0415941, US patent 5.190755, Australian patent 620858.)
- Mohammadi, R; Mortazavian, AM; Khosrokhavar, R; da Cruz, AG. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*, 61(3):411-424
- Mortensen, A; Kulling, SE; Schwartz, H; Rowland, I; Ruefer, CE; Rimbach, G; Cassidy, A; Magee, P; Millar, J; Hall, WL; Kramer, Birkved, F; Sorensen, IK; Sontag, G. 2009. Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research* 53:S266-S309
- Muth, D; Marsden-Edwards, E; Kachlicki, P; Stobiecki, M. 2008. Differentiation of isomeric malonylated flavonoid glyconjugates in plant extracts with UPLC-ESI/MS/MS. *Phytochemical Analysis* 19(5): 444-452

- Muzquiz, M; Cuadrado, C; Ayet, G; de la Cuadra, C; Burbano, C; Osagie, A. 1994. Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* from different countries and locations. *Journal Agriculture Food Chemistry* 42:1447-1450
- Nazir, M; Arifb, S; Khanc, R; Nazirc, W; Khalidc, N; Maqsoodd, S. 2019. Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends. *Trends in Food Science & Technology* 88:513-526
- Neffe-Skocińska, K; Rzepkowska, A; Szydłowska, A; Kołożyn-Krajewska, D. 2018. *Alternative and Replacement Foods*. Academic Press; Cambridge, MA, USA: Chapter 3-Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production; pp. 65–94.
- Nelson, AI; Steinberg, MP; Wei, LS. 1976. Illinois process for preparation of soymilk. *Journal Food Science* 41:57-61
- Nualkaekul, S; Salmeron, I; Charalampopoulos, D. 2011. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry* 129:1037–1044
- Oliveira, D; Vidal, L; Ares, G; Walter, EH; Rosenthal, A; Deliza, R. 2017. Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. *LWT-Food Science and Technology* 79:234-241
- Ortega, E; Rodríguez, A; David, A; Zamora, A. 2010. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Revista Acta Agronómica* 59(1): 111-118
- Panghal, A; Virkar, K; Kumar, V; Dhull, SB; Gat, Y; Chhikara, N. 2017. Development of probiotic beetroot drink. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 5(3)
- Panghal, P; Janghu, S, Virkar, K; Gat, Y; Kumar, V; Chhikara, N. 2018. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Bioscience* 21:80–89
- Patterson, CA; Curran, J; Der, T. 2017. Effect of processing on antinutrient compounds in pulses. *Cereal Chemistry* 94 (1):1-41
- Petrova, P; Petrov, K. 2020. Lactic Acid Fermentation of Cereals and Pseudocereals: Ancient Nutritional Biotechnologies with Modern Applications. *Nutrients* 12(4): 1118
- Plaza-Diaz, J; Ruiz-Ojeda, F; Gil-Campos, M; Gil, A. 2019. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances Nutrition* 10: S49–S66
- Prado, F; Parada, J; Pandey, A; Soccol, C. 2008. Trends in non-dairy beverages. *Food Research International* 41: 111-123

- Przybylak JK, Ciesiołka D, Wysocka W, et al. 2005. Alkaloid profiles of Mexican wild lupin and an effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annuum* L). *Ind Crops Prod* 21:1-7.
- Rafter, J. 2003. Probiotics and colon cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17:849-859
- Ranilla, L; Genovese, M; Lajolo, F. 2009. Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22:397-404
- Rastall, RA; Gibson, GR. 2015. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology* 32:42-46
- Rathore, S; Salmerón, I; Pandiella, S. 2012. Production of Potentially Probiotic Beverages Using Single and Mixed Cereal Substrates Fermented with Lactic Acid Bacteria Cultures. *Food Microbiol* 30(1):239-44 Affiliations expand PMID: 22265307 DOI: 10.1016/j.fm.2011.09.001
- Ribeiroa, A; dos Santos, F; Olbrich, K; da Mattab, V; Castro, D; Pessanha, M; Conteb, C; Duarte, S; Ribeiroc, L; Godoy, R; Miranda, E. 2020. Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. *LWT - Food Science and Technology journal* 118:108756
- Rybiński, W; Kroc, M; Świącicki, W; Wilczura, P; Kamel, K; Barzyk, P; Mikulski, W. 2018. Preliminary Estimation of Variation of Alkaloids Content in White Lupin (*Lupinus albus* L.) Collection. In. G. Brazauskas, G; Statkeviciut, G; Jonaviciene, K. (Eds.): *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*, pp. 131-136.
- Roberfroid, M; Gibson, GR; Hoyles, L; McCartney, AL; Rastall, R; Rowland, I; Wolvers, D; Watzl, B; Szajewska, H; Stahl, B; Guarner, F; Respondek, F; Whelan, K; Coxam, V; Davicco, MJ; Léotoing, L; Wittrant, Y; Delzenne, NM; Cani, PD; Neyrinck, AM; Meheust, A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition* 104 Suppl 2:S1-63.
- Roder, M; Kleiner, K; Sachs, A; Keil, N; Holzhauser, T. 2013. Detectability of Lupine Seeds by ELISA and PCR May Be Strongly Influenced by Potential Differences between Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(25):5936-45
- Rolfe, DR. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition* 130:396-342
- Romeo, FV; Fabroni, S; Ballistreri, G; Muccilli, S; Spina, A; Rapisarda, P. 2018.

- Characterization and Antimicrobial Activity of Alkaloid Extracts from Seeds of Different Genotypes of *Lupinus* spp. Sustainability 10 (3):1-12.
- Ruiz-López, MA; Barrientos-Ramírez, L; García-López PM; Valdés-Miramontes, EM; Zamora-Natera, JF; Rodríguez-Macias; Salcedo-Pérez, RE; Bañuelos-Pineda, J; Vargas-Radillo, JJ. 2019. Nutritional and Bioactive Compounds in Mexican Lupin Beans Species: A Mini-Review. Nutrients 11:1785
- Saarela, M. 2009. Probiotics as ingredients in functional beverages. In Functional and Speciality Beverage Technology 55-70
- Salmerón, I; Thomas, K; Pandiella, S. 2014. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. LWT - Food Science and Technology 55(1):240-247
- Salminen, S; Salminen, K; Gorbach, S. 1991. *Lactobacillus* GG fermented whey drink and yoghurt-new clinically tested dairy product to promote health. Scandinavian dairy information 3: 66-67.
- Salminen, MK; Tynkkynen, S; Rautelin, H; Saxelin, M; Vaara, M; Ruutu, P; Sarna, S; Valtonen, V; Järvinen, A. 2002. *Lactobacillus* Bacteremia during a Rapid Increase in Probiotic Use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. Clinical Infectious Diseases 35 (10): 1155–1160
- Santana, FMC; Fialho, AM; Sá-Correia, I; Empis, JMA. 1996. Isolation of bacterial strains capable of using lupanine, the predominant quinolizidine alkaloid in white lupin, as sole carbon and energy source. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 17(2):110-115
- Santos, CCA; Libeck, BS; Schwan, RF. 2014. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. International Journal of Food Microbiology 186:32-41
- Sathe, SK; Deshpande, S; Salunkhe, K. 1982. Functional Properties of Lupin Seed (*Lupinus mutabilis*) Proteins and Protein Concentrates. Journal of Food Science 47(2):491-497
- Savedboworn, W; Wanchaitanawong, P. 2015. Viability and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in spray-dried fermented cereal extracts. Maejo International Journal of Science and Technology 9:382-393
- Savedboworn, W; Niyomrat, S; Naknovn, J; Phattayakornb, K. 2017. Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract. Agriculture and Natural Resources 51: 463e469
- Saxelin, M; Kajander, K; Korpela, RA. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* GG. In handbook of

Probiotics and Prebiotics. 2 ed. 484p.

- Sharma, M; Mridula, D; Gupta, RK. 2014. Development of sprouted wheat based probiotic beverage. *Journal of Food Science and Technology* 51 (12): 3926–3933
- Sreerama, YN; Sashikala, VB; Mratape, VM. 2012. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. *Food Chemistry* 133(1):156–162
- Septembre-Malaterre, A; Remize, F; Poucheret, P. 2018. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International* 104:86–99
- Sethi, S; Tyagi, SK; Anurag, R. 2016. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal Food Science Technology* 53(9):3408-3423
- Siger, A; Czubinski, J; Kachlicki, P; Dwiecki, K; Lampart-Szczapa, E; Nogala-Kalucka, M. 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal Food Composition Analysis* 25(2):190-197
- Singh, S; Bajaj, BK. 2016. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46:717-724
- Singh, B; Pal Singh, J; Kaur, A; Singh, N. 2017. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review Balwinder. *Food Research International*.
- Silva, A; Silva, M; Ribeiro, B. 2020. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International* 131:108972
- Shirai, K; Gutiérrez-Durán, M; Marshal, VME; Revah-Moiseev, S; García-Garibay, M. 1992. Production of a yogurt-like product from plant foodstuffs and whey. Sensory evaluation and physical attributes. *Journal Science of Food Agriculture* 59:199-204
- Stobiecki, M; Staszaków, A; Piasecka, A; Garcia-Lopez, P. M; Zamora-Natera, F; Kachlicki, P. 2010. LC-MSMS profiling of flavonoid conjugates in wild Mexican lupine, *Lupinus reflexus*. *Journal of Natural Products* 73(7):1254-1260
- Sorenson, D; Bogue, J. 2005. A conjoint-based approach to concept optimization: Probiotic beverages. *British Food Journal*. 107: 870-883
- Subramaniyam, RS; Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature* 3:480–486
- Succi, M; Tremonte, P; Pannella, G; Tipaldi, L; Cozzolino, A; Coppola, R; Sorrentino, E.

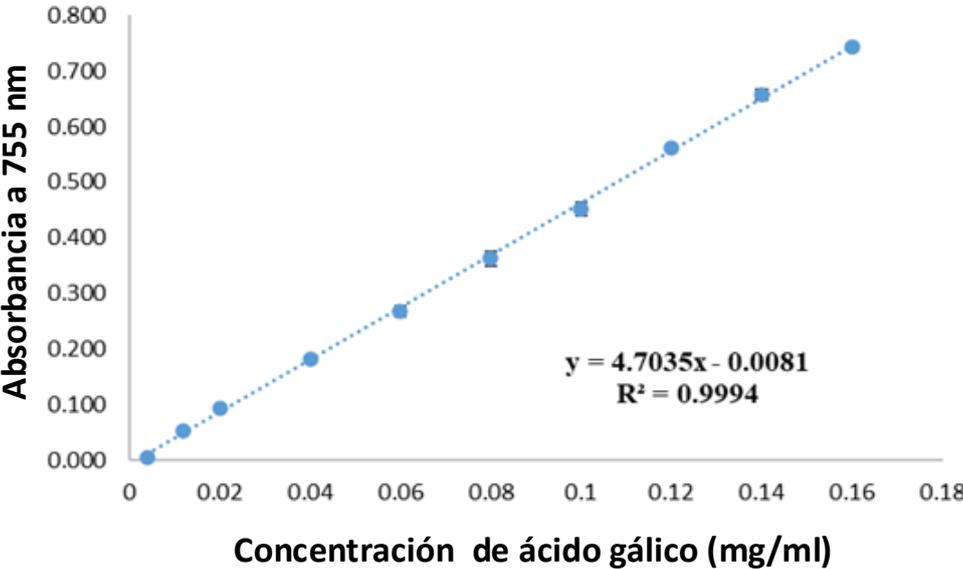
2017. Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*, 35:60-67
- Sunny-Roberts, E.O; Ananta, E; Knorr, D. 2007. Flow cytometry assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) response to non-electrolytes stress. *Nutrition Food Science* 37:184–200.
- Sun Jin, H; Seung Yuan, L; Young-Chan, K; Inwook, C; Geun-Bae, K. 2014. Review. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* 160: 346–356
- Tahara, S; Ingham, LJ; Nakahara, S; Mizutani, J; Harborne, JB. 1984. Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 23(9):1889-1900
- Tamime, AY; Kaláb, M, Davies, G. 1991. The effect of processing temperature on the microstructure and firmness of labneh made from cow's milk by traditional method or by ultrafiltration. *Food Structure* 10:345– 352
- Terpou, A; Papadaki, A; Lappa, I; Kachrimanidou, V; Bosnea, L; Kopsahelis, N. 2019. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients* 11(7): 1591
- Tian, Y; Liimatainen, J; Alanne, AL; Lindstedt, A; Liu, P; Sinkkonen, J; Kallio, H; Yang, B. 2017. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry* 220:266-281.
- Tian, Y; Laaksonen, O; Haikonen, H; Vanag, A; Ejaz, H; Linderborg, K; Karhu, S; Yang, B. 2019. Compositional diversity among blackcurrant (*Ribes nigrum*) cultivars originating from European countries. *Journal Agriculture Food Chemistry* 67(19):5621-5633
- Toneli, J; Park, KJ; Negreiros, A; Murr, F. 2010. Spray-drying process optimization of chicory root inulin. *Drying Technology: An International Journal* 28(3):369-379.
- Tripathi, MK; Giri, SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal Functional Foods* 9:225-241.
- Trugo, LC; Von Baer, D; Von Baer E. 2003. " LUPIN ", en *Enciclopedia de Ciencias de la Alimentación y Nutrición*, Ed. Caballero B., editor. (Oxford: Academic Press;), 3623–3629. 10.1016 / B0-12-227055-X / 00717-3 [ CrossRef ]
- Ureña, M; D'Arrigo, M; Girón, O. 1999. Evaluación sensorial de los alimentos: aplicación didáctica. Lima, Perú. Editor Universidad Nacional Agraria La Molina p. 197.

- Van Niel, CW; Feudtner, C; Garrison, MM; Christakis, DA. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. *Pediatrics* 109: 678-684
- Vasiljevic, T; Shah, N. 2008. Review Probiotics -From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18: 714-728
- Vergin, F. 1954. Anti- und Probiotika. *Hippokrates*, 25:116-119
- Villacrés, E; Caicedo, C; Peralta, E. 2000. Diagnóstico del procesamiento artesanal, comercialización y consumo del chocho. In: Zonificación Potencial, Sistemas de Producción y Procesamiento Artesanal del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweed) en Ecuador, pp. 24–41. Caicedo, C. and Peralta, E. (Eds.), INIAP-FUNDACIT, Quito, Ecuador. In: Chocho o producción de lupino, Fito nutrición, enfermedades y plagas, zonificación, mercado y postcosecha, agroindustria, guía del cultivo de chocho y costos de producción, ed. Peralta, E., Published as CD by INIAP-FUNDACIT. Quito, Ecuador
- Vinderola, CG; Reinhermer, JA. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Vinderola, G; Ouwehand, A; Salminen, S; von Wright, A. 2019. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 5th Edición. CRC Press Taylor & Francis Group. 764p
- Wang, C; Zheng, H; Liu, T; Wang, D; Guo, M. 2017. Physiochemical properties and probiotic survivability of symbiotic corn-based yogurt-like product. *Journal of Food Science* 82: 2142–2150
- Waridel, P; Wolfender, JL; Ndjoko, K; Hobby, KR; Major, HJ; Hostettmann, K. 2001. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *Journal of Chromatography A* 926(1):29-41
- Wojakowska, A; Piasecka, A; García-López, PM; Zamora-Natera, F; Krajewski, P; Marczak, Ł; Kachlicki, P; Stobiecki, M. 2013. Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC-MS techniques. *Phytochemistry* 92:71-86.
- Wood, BJB; Holzappel, WH. 1995. *Genera of lactic acid bacteria*. London: Blackie Academic and Professional, 420 pp. ISBN 075140215X.
- Wink, M; Meibner, C; Witte, L. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* 38:139-153
- Xiao, Z; Lu, JR. 2014. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A

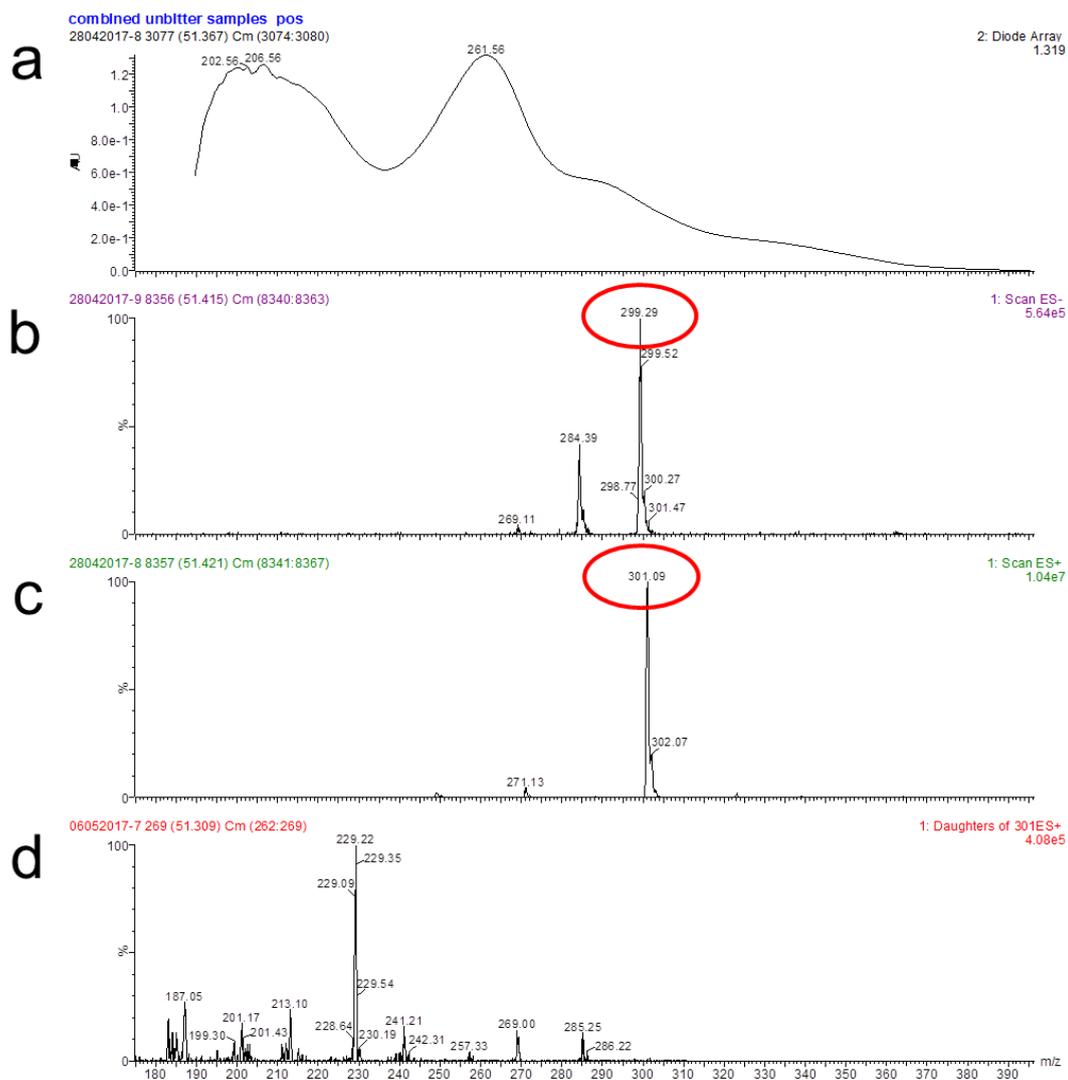
- review. *Biotechnology Advances* 32(2): 492-50.
- Yeo, SK; Liong, MT. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61:161-181
- Yeo, SK; Liong, MT. 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soy milk. *Journal Science Food and Agriculture* 90(2):267-275
- Yoon, KY; Woodams, EE; Hang, YD. 2004. Probiotication of juice juice by bacteria láctica. *Journal of Microbiology (Seúl, Corea)* 42(4):315-318
- Zanninia, E; Jeskea, S, Lyncha, KM; Arendta, EK. 2018. Development of novel quinoa-based yoghurt fermented with dextran producer *Weissella cibaria* MG1. *International Journal of Food Microbiology* 268(2):19-26

## **VIII. ANEXOS**

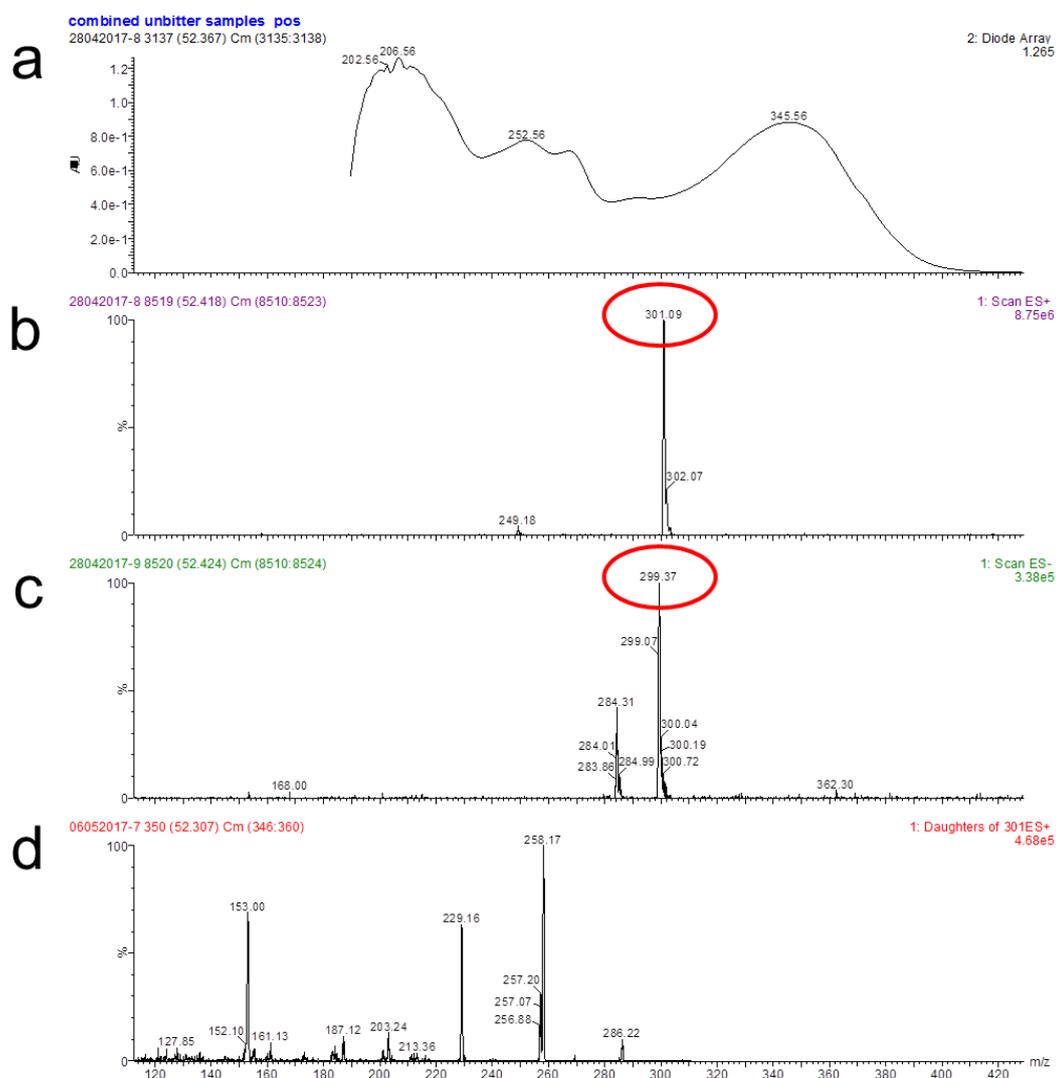
**Anexo 1: Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales.**



**Anexo 2:** Información del compuesto 20 (aglicona de isoflavona desconocida). a. Absorción UV, b. Espectro de masas (MS) a modo negativo, c. Espectro de masas (MS) a modo positivo, d. Scanner del producto de 301 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$ ).



**Anexo 3:** Información del compuesto 21 (aglicona de flavona desconocida). a. Absorción UV, b. Espectro de masas (MS) a modo negativo, c. Espectro de masas (MS) a modo positivo, d. Scanner del producto de 301 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$ ).



**Anexo 4: Análisis de varianza del diseño experimental Taguchi L<sub>8</sub> (2<sup>7</sup>)**

Análisis de varianza					
(Mean = 27.3413 Sigma = 6.44408)					
	<b>SS</b>	<b>DF</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>F1</b>	66.4462	1	66.4462	42.9558	0.000318
<b>F2</b>	24.3355	1	24.3355	15.7323	0.005417
<b>F3</b>	0.2066	1	0.2066	0.1336	0.725566
<b>F4</b>	440.3982	1	440.3982	284.7064	0.000001
<b>F5</b>	61.0353	1	61.0353	39.4578	0.000411
<b>F6</b>	13.3789	1	13.3789	8.6491	0.021684
<b>F7</b>	6.2643	1	6.2643	4.0497	0.084070
<b>Residual</b>	10.8280	7	1.5469		

## **Anexo 5: Artículos publicados y por publicar derivadas de la tesis**

### **Artículos publicados en revistas indizadas**

- ✓ Cortés-Avenidaño, P; Tarvainen, M; Suomela, JP; Glorio-Paulet, P; Yang, B; Repo-Carrasco-Valencia, R. 2020. Profile and Content of Residual Alkaloids in Ten Ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process. *Plant Foods for Human Nutrition*.

### **Publicaciones en congresos científicos**

- ✓ Identificación y cuantificación de alcaloides de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet). Valparaíso-Chile. 2017.
- ✓ Optimization of fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus plantarum* 299v in lupin (*Lupinus mutabilis*. Sweet). Cochabamba, Bolivia. 2019.

### **Artículos en preparación**

- ✓ Profile and Content of Isoflavone and flavone in Ten Ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after Aqueous Debittering Process.
- ✓ Development of non-dairy probiotic drink based of *Lupinus mutabilis* Sweet