

PAN VEGANO ADICIONADO CON *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG Y HARINA DE *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* Y *Moringa oleifera*

VEGAN BREAD ADDED WITH *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG AND FLOUR OF *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* AND *Moringa oleifera*

Ek-Chulim, A.R.¹; Ventura-Canseco, L.M.C.^{1*}; Álvarez-Gutiérrez, P.E.¹; Gutiérrez-Miceli, F.A.¹; Abud-Archila, M.¹

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km 1080, Col. Plan de Ayala, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

*Autor de correspondencia: mventura@ittg.edu.mx

ABSTRACT

Bread constitutes a food that is highly consumed by the vegetarian and vegan community. This culture of food is often deficient in nutrients which can be added by incorporating ingredients such as vegetable flours, in addition to the addition of probiotics in order to obtain symbiotic products. Therefore, the objective of this project was to evaluate the functional characteristics of vegan bread supplemented with leaf flours of *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* and *Moringa oleifera*, as well as *Lactobacillus plantarum* (BAL-03-ITTG) microencapsulated. Vegan bread was formulated by replacing wheat flour with *Crotalaria longirostrata* flour, *Cnidisculus aconitifolius* and *Moringa oleifera* (3 and 5%). Bread without the addition of these vegetable flours was used as a control. In addition, 10% of *Lactobacillus plantarum* microencapsulated was added. The results showed that with the substitution of wheat flour the nutritional properties were improved in terms of phenols and flavonoids content, antioxidant activity and protein content, being the best flours those of *Crotalaria longirostrata* and *Moringa oleifera*. However, the baking process caused the death of microencapsulated *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: Nutraceutical, vegans, bread, vegetable flours.

RESUMEN

El pan constituye un alimento que es altamente consumido por la comunidad vegetariana y vegana. Esta cultura de alimentación, es muchas veces deficiente en nutrientes, mismos que pueden ser adicionados mediante la incorporación de ingredientes como las harinas vegetales, además de la adición de probióticos con la finalidad de obtener productos simbióticos. Por lo anterior el objetivo del presente proyecto fue de evaluar las características funcionales de pan vegano suplementado con harinas de hojas de *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* y *Moringa oleifera*, así como *Lactobacillus plantarum* microencapsulado. Se formuló pan vegano sustituyendo harina de trigo por harina de *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* y *Moringa oleifera* (3 y 5%). Se utilizó como testigo pan sin la adición de estas harinas vegetales. Al pan se le adicionó, además, 10% de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG microencapsulado. Los resultados mostraron que con la sustitución de harina de trigo se mejoraron las propiedades nutrimentales en términos del contenido de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y contenido de proteínas, siendo las mejores harinas las de *Crotalaria longirostrata* y *Moringa oleifera*. Sin embargo, el proceso de horneado provocó la muerte del *Lactobacillus plantarum* microencapsulado.

Palabras clave: Nutracéutica, veganos, pan, harinas vegetales.



INTRODUCCIÓN

En la actualidad el consumo de alimentos funcionales ha incrementado, mismos que son definidos como "alimentos modificados o que contienen ingredientes que demuestren acciones que incrementan el bienestar del individuo o que disminuyen los riesgos de enfermedades, más allá de la función tradicional de los ingredientes que contienen" (Valenzuela, 2014). Particularmente las tendencias del consumo de pan se encaminan en dos sentidos: alimentos muy sofisticados de compleja elaboración y productos naturales y saludables, además la importancia de una alimentación rica en fibras se ha acentuado lo que ha ampliado el consumo de panes integrales. Investigaciones encaminadas a la adición de principios biológicos con reconocido beneficio a la salud, a productos de panificación han sido reportadas. Bautista-Justo *et al.* (2007) desarrollaron 6 diferentes panes integrales empleando harina de trigo integral, chía, linaza y ácido fólico, formulados especialmente para la mujer. Los resultados mostraron una buena aceptación de los productos elaborados, además revelaron más altos niveles de proteína respecto al pan testigo. En relación con la adición de fuentes naturales de antioxidantes, Chlopicka *et al.* (2012) evaluaron la adición de 15 y 30% de harina de trigo sarraceno (alforfón), amaranto y quinoa sobre propiedades antioxidantes y sensoriales. La adición de 30% de trigo sarraceno tuvo 3.64 veces mayor actividad antioxidante que la adición de amaranto y quinoa (1.79 y 1.71 veces respectivamente más que el pan sin adición). En cuanto a incrementar el contenido de antocianinas y fenoles totales al pan, Ceballos *et al.* (2016) utilizaron la cáscara de la uva (*Vitis labrusca* L.) y la semilla (orujo) para elaborar harina (HCUS), empleándola como ingrediente funcional. Se encontró que la actividad antioxidante que aporta la HCUS al pan es de 7.98%, antocianinas totales de 1.85 mg g⁻¹ de pan y fenoles totales de 0.4076 mg EqAG g⁻¹. Relacionado con la adición de fenoles con actividad antioxidante a los panes, Meral y Sait Dogan (2013) determinaron los efectos de la semilla de uva (GS) en las propiedades reológicas y panificables, la actividad antioxidante y la composición fenólica del pan. La harina de trigo fue reemplazada por GS a niveles de 2.5, 5.0 y 7.5%. Las actividades antioxidantes del pan aumentaron significativamente con la sustitución de GS. Los resultados de este estudio indican que GS se puede utilizar con éxito en fórmulas de pan para mejorar las propiedades reológicas de la masa y aumentar la actividad antioxidante del pan.

A pesar de los intentos por desarrollar panes funcionales que contienen microorganismos viables, esto aún no se ha logrado debido a la alta temperatura durante la cocción. Seyedain-Ardabili *et al.* (2016) realizaron un estudio para obtener pan simbiótico, por lo que se seleccionaron pan de hamburguesa y pan blanco al cual se le adicionaron *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *L. casei* 431 encapsulados. Se observó un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en la supervivencia probiótica cuando se utilizó quitosano además de la primera capa de alginato de calcio y almidón resistente.

En cuanto a la adición de harinas de hojas se han realizado diversos estudios. Chinma *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la semilla de *Cyperus esculentus* (chufa) germinada y la adición de moringa en las características de calidad del pan de trigo. La adición de hasta un 15% de chufa germinada y moringa a la harina de trigo aumentó la proteína, la fibra cruda y el contenido de ceniza del pan sin modificar las propiedades sensoriales con respecto al pan de trigo. Por su parte Dachana *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la sustitución de la harina de trigo con 5, 10 y 15 % de hojas secas de moringa sobre las características reológicas, microestructurales, nutricionales y de calidad de las galletas. Ellos reportaron aumento de la dureza y la disminución de la cohesión de masa además de que la evaluación sensorial mostró que las galletas incorporados con un 10% de polvo de DML fueron aceptables.

La chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) y chipilín (*Crotalaria longirostrata*) son nativas de México y América Central. Se consumen en las zonas rurales y urbanas como alimentos o en medicina tradicional. Actualmente, hay información limitada sobre su composición nutricional y fitoquímica. Sin embargo, existen reportes en los cuales se ha demostrado el nivel nutricio de ambas hojas (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015).

Por lo anterior el objetivo del presente fue de evaluar las características funcionales de pan vegano suplementado con harinas de hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*), chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) y moringa (*Moringa oleifera*) y *Lactobacillus plantarum* (BAL-03-ITTG) microencapsulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las materias primas vegetales

Las harinas fueron elaboradas empleando hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*), chaya (*Cnidoscolus*

aconitifolius), y moringa (*Moringa oleifera*) adquiridas en el mercado de Terán en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Las hojas fueron lavadas mediante inmersión en agua clorada (5 ppm) durante 5 minutos y enjuagadas posteriormente con agua potable. Las hojas de chaya fueron escaldadas durante 1.5 min en agua a 100 °C (López, 2003). Las hojas fueron después secadas a la sombra, molidas en licuadora doméstica hasta un tamaño de partícula de 0.149 mm (malla N° 100). Finalmente, las harinas vegetales se almacenaron en frascos color ámbar herméticamente en refrigeración hasta su empleo.

Obtención de microcápsulas de *L. plantarum* mediante secado por aspersión

Para la siembra y cosecha de *Lactobacillus plantarum* se utilizó la metodología reportada por Gutiérrez-Sarmiento (2016).

La microencapsulación de *L. plantarum* se realizó mediante secado por aspersión según la metodología reportada por Robles-Flores (2015). Las microcápsulas obtenidas se conservaron en bolsas metálicas herméticas selladas al vacío a 4°C hasta su uso. La sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* (BAL-03-ITTG) después del secado fue determinado mediante la técnica de siembra en placa. La sobrevivencia fue calculada con la ayuda del número de unidades formadoras de colonia alimentadas y el número de microorganismos viables después del secado por aspersión.

Elaboración de los panes

Los productos de panificación fueron elaborados con los siguientes ingredientes: 50 mL de aceite de oliva marca Selecto Choice, 30 g de levadura marca Nevada, 15 g de sal marca La fina, 20 g de harina de malta marca Brillapan La Florida, 125 mL de agua marca Santorini, 165 mL de leche de almendra marca Silk almond Vainilla, 20 g de salvado de trigo marca Cerepack, 20 g de mejorante para panificación marca Magnopro, 500 g de harina de trigo marca Medalla de oro. Los ingredientes son de grado alimenticio, adquiridos en comercios locales. El polvo de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado fue adicionado en 10 g 100 g⁻¹ de harina de trigo y las harinas vegetales fueron agregadas en proporciones de 3 g 100 g⁻¹ y 5 g 100 g⁻¹ de harina de trigo. Los ingredientes se mezclaron en una batidora marca Hamilton Beach, modelo 64655 (HAMILTON, Carolina del Norte, USA). La masa obtenida se distribuyó equitativamente en moldes metálicos y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente (28-30 °C). Finalmente la masa

fue horneada a 180 °C durante 20 min, en horno marca IEM-E13030 (IEM, SLP, México). Al término del horneado se dejaron enfriar y se empacaron individualmente en bolsas de plástico, los cuales se almacenaron en un lugar fresco y seco. La preparación del pan se llevó a cabo con buenas prácticas de higiene de acuerdo a la norma NOM-120-SSA1-1996.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones para cada harina. Los factores a estudiar fueron el porcentaje de sustitución de la harina en la mezcla (3 y 5%). El testigo fue pan sin la sustitución de harina de trigo. Todos los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de confianza del 0.05 y las medias fueron comparadas mediante el análisis de la diferencia mínima significativa. El monitoreo se realizó al terminó del horneado y a los 3 y 5 días de almacenamiento.

Caracterización de los productos de panificación

Análisis proximales y microbiológicos

Los productos de panificación formulados con harina de trigo adicionados con *L. plantarum* BAL-03-ITTG y suplementados con harina de chipilín, chaya y moringa se analizaron en base a los métodos establecidos por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999). Los análisis microbiológicos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para productos de panificación (NOM-092-SSA1-1996).

Evaluación de antioxidantes, fenoles totales y flavonoides en los productos de panificación

Después del horneado y una vez a temperatura ambiente, se tomaron muestras de los panes a t₀ (tiempo cero), t₃ (3 días después de almacenamiento) y t₅ (5 días después de almacenamiento). Las muestras fueron sometidas a extracción empleando la metodología de Chlopicka et al. (2012).

Los fenoles totales se determinaron en los extractos de cada unidad experimental, de acuerdo al método de Folin-Ciocalteau (Singleton, 1999). El estándar empleado fue ácido gálico (SIGMA) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de harina vegetal o pan (mg EqAG g⁻¹ de harina o mg EqAG g⁻¹ de pan).

Los flavonoides se cuantificaron en los extractos de cada unidad experimental, con el método colorimétrico de cloruro de aluminio (Chang et al., 2002). Los resultados



se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de harina vegetal o pan (mg EqQ g^{-1} de harina o mg EqQ g^{-1} de pan).

La capacidad antioxidante en los extractos de cada unidad experimental se determinó con el método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) de acuerdo con lo reportado por Mensor (2001). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por gramo de harina vegetal o pan (mg EqAA g^{-1} de harina o mg EqAA g^{-1} de pan).

Sobrevivencia de *Lactobacillus plantarum* en los productos de panificación

Para evaluar la sobrevivencia del *L. plantarum* en los productos de panificación, se tomó 1 g de cada pan y se agregó en 9 mL de agua peptonada estéril (15 g L^{-1}). La muestra se agitó vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea y de ésta se realizaron diluciones seriadas y siembra en placa con agar MRS. El porcentaje de sobrevivencia se determinó mediante la relación del número de microorganismos adicionados a la masa y el número de microorganismos viables después del horneado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Caracterización de las harinas

Los rendimientos promedio de obtención de las harinas a partir de hojas secas fueron de 18.2% para chipilín, 25% para chaya y 24% para moringa. El contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en las harinas de chipilín, chaya y moringa se muestran en el Cuadro 1. La concentración de flavonoides en nuestras harinas de chipilín y chaya fueron 9.4 y 9.7 (mg EqQ g^{-1} harina). Estos valores son superiores a los reportados por Jiménez-Aguilar y Grusak (2015), 0.658 y 1.83 (mg EqCat g^{-1}) respectivamente. La diferencia podría deberse a la metodología utilizada. Por otra parte, la harina de moringa contiene 11.064 mg EqQ g^{-1} harina, mientras que Verma *et al.* (2009) reportaron 0.807 mg EqQ g^{-1} .

En cuanto al contenido de fenoles, Jiménez-Aguilar y Grusak (2015) reportaron 22.64 y 13.52 (mg EqAG g^{-1} peso seco) para la hoja de chaya y chipilín respectivamente. Estos valores son superiores a 19.9 y 14.9 (mg EqAG g^{-1} harina). Por otra parte, la moringa tiene un contenido de fenoles

de 16.7 mg AG g^{-1} , valor superior a lo reportado por Verma *et al.* (2009) de 0.5344 mg AG g^{-1} .

Estas diferencias podrían ser debido a las condiciones de cultivo de cada planta, al clima, tipo de suelo, estación del año, así como también a la especie, parte de la planta usada para realizar el extracto vegetal y las condiciones de la extracción (Pinelo *et al.*, 2004).

La baja actividad antioxidante de la chaya (0.7 mg EqAA g^{-1}) se puede relacionar al método térmico (escaldado). Mendoza-Corvis *et al.* (2015) reportaron la degradación del ácido ascórbico con respecto a la temperatura y tiempo de escaldado, disminuyendo un promedio de 1.2 $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (pulpa de mango) por cada minuto de escaldado a 85 °C. Los autores citan que la degradación térmica del ácido ascórbico está relacionada con la formación de compuestos aquirales indeseables y/o isomerización; en nuestro caso el escaldado se realizó a 100 °C durante 1.5 min.

Sobrevivencia de *L. plantarum* en los productos de panificación

En el Cuadro 2 se observa la sobrevivencia de *L. plantarum* en la masa de pan y después del proceso de horneado de los panes. Es posible observar que antes del horneado el número de unidades formadoras de colonia por gramo de masa de panificación varió en el orden de 10^9 , no habiendo diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). Sin embargo, después del horneado, el porcentaje de sobrevivencia del microorganismo en el pan fue de 3% no habiendo diferencia estadística significativa entre los tratamientos ni con el testigo ni con la adición de cualquiera de las harinas vegetales.

La microencapsulación genera un microambiente y protección para que las bacterias soporten las condiciones de secado e incrementen su tiempo de vida durante el almacenamiento. Robles-Flores (2015) reportó 90% de

Cuadro 1. Contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en hojas secas de *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* y *Moringa oleifera*.

Harina vegetal	Fenoles (mg EqAG g^{-1} harina seca)	Flavonoides (mg EqQ g^{-1} harina seca)	Actividad antioxidante (mg EqAA g^{-1} de harina seca)
<i>Crotalaria longirostrata</i>	19.90±0.014	9.407±0.005	11.030±0.009
<i>Cnidisculus aconitifolius</i>	14.955±0.004	9.714±0.021	0.7±0.001
<i>Moringa oleifera</i>	16.698±0.34	11.064±0.08	17.14±0.11

Cuadro 2. Microorganismos viables en la masa de panificación y sobrevivencia de *L. plantarum* en panes adicionados con chipilín, chaya y moringa.

Pan adicionado con harina	Microorganismos viables (UFC g ⁻¹ de masa)	Sobrevivencia de <i>L. plantarum</i> en pan (%)
Pan testigo	1.5×10 ⁹ a	3.7 a
Pan y chipilín 3%	1.8×10 ⁹ a	3.1 a
Pan y chipilín 5%	1.7×10 ⁹ a	2.8 a
Pan y chaya 3%	2.1×10 ⁹ a	3.0 a
Pan y chaya 5%	2.2×10 ⁹ a	3.8 a
Pan y moringa 3%	1.5×10 ⁹ a	3.8 a
Pan y moringa 5%	1.8×10 ⁹ a	3.1 a
DMS	1×10 ⁹	1

Letras iguales en cada columna corresponde a tratamientos iguales estadísticamente ($P \leq 0.05$).

sobrevivencia para *L. plantarum* durante 8 meses en almacenamiento en condiciones de refrigeración. La leche de soya, goma arábiga y maltodextrina constituyen un buen agente encapsulante. Sin embargo, las microcápsulas al ser adicionadas a la masa conteniendo agua, éstas probablemente se hidrataron, permitiendo la liberación del microorganismo previo al horneado. Estos microorganismos liberados fueron expuestos a la temperatura durante el proceso de horneado provocando su muerte. Jordan-Cogan (1999) y Aryani et al. (2016) reportaron que la inactivación de *Lactobacillus plantarum* ocurre entre 63 a 65 °C y que al exponerlas a temperaturas altas (150 °C) durante menos de 2 min, éstas fueron eliminadas.

Caracterización de panes adicionados con harinas vegetales

En cuanto al pan testigo se encontró que contiene 7.75% de proteínas, 25% de humedad y 5% de cenizas. Así mis-

mo, el pan testigo demostró tener un contenido promedio de fenoles de 1.74 mg EqAG g⁻¹, 0.28 mg EqQ g⁻¹ y una actividad antioxidante de 1.85 mg EqAA g⁻¹ (Cuadro 2).

El Cuadro 3 muestra que la mayor aportación de fenoles totales (2.49 mg EqAG g⁻¹), se logra con la adición de 5 g 100 g⁻¹ de harina de hoja de moringa. Chlopicka et al. (2012) evaluaron la adición de 15 g 100 g⁻¹ y 30 g 100 g⁻¹ de harina de trigo sarraceno, amaranto y quinoa, reportando que el mayor contenido de fenoles totales en pan (2.65 mg EqAG g⁻¹) lo aportó la adición de 30 g 100 g⁻¹ de trigo sarraceno; aportación 6.04% superior, pero con sustitución de la harina de trigo 6 veces superior a la nuestra.

Nuestros resultados reportan que la adición de 3 g 100 g⁻¹ de harina de hoja de moringa genera un contenido de fenoles totales semejante a los aportados por 5 g 100 g⁻¹ de harinas de hojas de chaya y chipilín, contenidos superiores a los presentes en pan con 15 g 100 g⁻¹ de amaranto y 15 g 100 g⁻¹ de quinoa, de 1.73 y 1.88 (mg EqAG g⁻¹) respectivamente. Por su parte, Ceballos et al. (2016) utilizaron la cáscara de la uva (*Vitis labrusca* L.) y la semilla (orujito) para elaborar harina (HCUS), empleándola como ingrediente funcional. Ellos reportaron 0.4076 mg EqAG g⁻¹, contenido inferior a cualquiera de nuestros tratamientos. Semejante efecto es el reportado por Meral y Sait Dogan (2013), quienes reemplazaron harina de trigo por polvo de semilla de uva (GS) a niveles de 2.5%, 5.0% y 7.5%, lo cual generó valores de fenoles totales en el pan desde 0.37 a 10.9 mg EqAG 100 g⁻¹, valores también inferiores a los nuestros. En cuanto al contenido de flavonoides en nuestros panes, el mayor fue de 1.01, seguido

Cuadro 3. Fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y contenido de proteínas de pan adicionado con diferentes harinas vegetales.

Tratamiento	Fenoles (mg EqAG g ⁻¹)		Flavonoides (mg EqQ g ⁻¹)		Actividad Antioxidante (mg EqAA g ⁻¹)		Proteína (%)	
	Tiempo de almacenamiento		Tiempo de almacenamiento		Tiempo de almacenamiento		Tiempo de almacenamiento	
	0 días	5 días	0 días	5 días	0 días	5 días	0 días	5 días
Pan testigo	1.74±0.02	1.43±0.03	0.28±0.08	0.25±0.03	1.85±0.02	1.42±0.04	7.75±0.04	7.50±0.06
Pan con chipilín (3%)	1.97±0.02	1.62±0.01	0.73±0.041	0.66±0.03	2.08±0.02	1.58±0.01	8.37±0.23	8.39±0.24
Pan con chipilín (5%)	2.13±0.03	1.8±0.03	1.01±0.06	1.00±0.08	2.28±0.04	1.8±0.04	9.19±0.34	9.17±0.26
Pan con chaya (3%)	1.91±0.01	1.59±0.01	0.59±0.03	0.56±0.03	1.87±0.00	1.44±0.00	8.39±0.06	8.33±0.02
Pan con chaya (5%)	2.07±0.02	1.73±0.03	0.84±0.04	0.84±0.05	1.88±0.00	1.45±0.00	9.28±0.12	9.26±0.08
Pan con moringa (3%)	2.19±0.05	1.8±0.04	0.53±0.02	0.43±0.01	2.2±0.04	1.83±0.04	8.56±0.32	8.51±0.1
Pan con moringa (5%)	2.49±0.07	2.09±0.06	0.83±0.06	0.72±0.03	2.64±0.08	2.18±0.06	9.69±0.5	9.68±0.4



por 0.84 y 0.83 mg EqQ g⁻¹ en los panes adicionados con 5 g 100 g⁻¹ de chipilín, chaya y moringa respectivamente, todos ellos superiores al contenido más elevado reportado por Chlopicka *et al.* (2012) de 34.9 μg EqCatequina g⁻¹ al adicionar 30 g/100 g⁻¹ de harina de amaranto. Las diferencias probablemente se deben al origen de las plantas, condiciones de extracción y de elaboración del pan. Respecto a la actividad antioxidante, Dziki *et al.* (2014) mencionan que la adición de extractos verdes o harinas, permite incrementar la actividad antioxidante del pan sin embargo, concluyen que es importante encontrar el equilibrio entre incrementar el valor nutricional y mantener la calidad sensorial. En nuestro caso la mayor aportación de actividad antioxidante fue generada por la adición de 5 g 100 g⁻¹ de harina de hoja de moringa, seguida por la adición de 5g 100 g⁻¹ de chipilín y 5 g 100 g⁻¹ de chaya. La mayor aportación representa un incremento del 42.7% comparada con la actividad antioxidante del pan testigo. El porcentaje anterior es mayor al reportado por Ceballos *et al.* (2016), quienes utilizaron la cáscara de la uva (*Vitis labrusca* L.) y la semilla (orujito) para elaborar harina (HCUS), empleándola como ingrediente funcional e incorporándola en un 4% a la harina de trigo. Ellos encontraron que la actividad antioxidante que aporta la HCUS al pan es de 7.98%.

La aportación en el contenido de proteínas en los panes es también una propiedad importante que puede ser incrementada por la adición de pseudocereales, harinas, especias, semillas, partes de plantas e incluso subproductos de la industria de alimentos. En cuanto al aporte de proteínas Chinma *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la adición de chufa germinada y moringa en las características de calidad del pan de trigo. La adición de 15% de chufa germinada y moringa a la harina de trigo aumentó la proteína del pan de 1.21 a 2.63%. En nuestro caso, la adición de 5 g 100 g⁻¹ de harina de hojas de moringa provocó un aumento de 7.75 a 9.69%, incrementos ligeramente menores fueron los generados por la adición de 5 g 100 g⁻¹ de chipilín y chaya. Incrementos semejantes a los nuestros fueron reportados por Bautista-Justo *et al.* (2007), quienes reportaron incrementos de entre 2.23 a 9.24% en los niveles de proteína respecto al pan testigo.

La estabilidad de las moléculas bioactivas durante el horneado y almacenamiento es muy importante. Sin embargo, las interacciones de los compuestos fenólicos durante la preparación tienen múltiples efectos sobre la calidad del pan; esto afecta la eficacia antioxidante de flavonoides (Dziki *et al.*, 2014). En nuestro caso, después

de 5 días de almacenamiento todos los panes, incluyendo el testigo, perdieron entre 15.4 y 17.8 % de su contenido de fenoles totales, en cuanto a los flavonoides su disminución osciló entre 0 a 18.8 %. La disminución mayor en la actividad antioxidante se observó para todos los tratamientos cuyos valores variaron entre 16.8 a 24% (Cuadro 3). En los panes adicionados con 3 g 100 g⁻¹ y 5 g 100 g⁻¹ de chaya, chipilín y moringa, el contenido de proteínas fue estable, ya que disminuyeron entre 0 y 0.7% durante los 5 días de almacenamiento, a diferencia del pan testigo cuyo contenido de proteínas disminuyó 3.23%; lo anterior indica que la adición de harinas de hojas de chipilín, chaya y moringa aportan proteínas cuyo contenido es estable durante el almacenamiento.

En cuanto a la calidad microbiana, los panes elaborados cumplen con la Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1996), hubo ausencia de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y mohos, después del horneado y a los 5 días de almacenamiento.

CONCLUSIONES

La adición de harinas de hojas de moringa, chipilín y chaya mejoran la calidad antioxidante y el contenido de proteínas del pan vegano. La adición de 5 g 100 g⁻¹ de moringa proporcionó el mayor incremento de actividad antioxidante y contenido de proteínas. *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG no sobrevivió el proceso de horneado del pan vegano, por lo que se sugiere utilizar otros agentes encapsulantes que den mayor protección al microorganismo durante el horneado.

AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento al proyecto 5907.16-P y al CONACyT por la beca otorgada.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 1999. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Aryani D.C., den Besten H.M.W, Zwietering M.H. 2016. Quantifying variability in growth and thermal inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum*. Applied Environmental Microbiology 82: 4896-4908.
- Bautista-Justo M., Castro-Alfaro A.D., Camarena-Aguilar E., Wrobel K., Wrobel K., Guzmán-Guadalupe A., Gamiño-Sierra Z., Da Mota Z.V. 2007. Desarrollo de pan integral con soya, chía, linaza y ácido fólico como alimento funcional para la mujer. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 57: 78-84.
- Ceballos P.Y., Figueroa M.A., Giraldo G.D., Gómez M.A., Montañón D.L., Velasco M., Mazo R., Martínez-Correa C., Vanegas M.P. 2016. Elaboración de pan con adición de harina orujito de uva Isabella

- (*Vitis labrusca* L.) como componente funcional. *Agronomía Colombiana* 34: S1046-S1049.
- Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chinma C.E., Abu J.O., Akoma S.N. 2014. Effect of germinated tigernut and moringa flour blends on the quality of wheat-based bread. *Journal of Food Processing and Preservation* 38: 721-727.
- Chlopicka J., Pasko P., Gorinstein S., Jedryas A., Zagrodzki P. 2012. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *LWT-Food Science and Technology* 46: 548-555.
- Dachana K.B., Rajiv J., Indrani D., Prakash J. 2010. Effect of dried moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaves on rheological, microstructural, nutritional, textural and organoleptic characteristics of cookies. *Journal of Food Quality* 33: 660-677.
- Dziki D., Rózyło R., Gawlik-Dziki U., Świeca M. 2014. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science and Technology* 40: 48-61.
- Gutiérrez-Sarmiento W. 2016. Optimización de la agitación, aireación y concentración de Tween 80 en el cultivo de *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG para su uso como probiótico. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.
- Jiménez-Aguilar D.M., Grusak M. A. 2015. Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables. *Plant Foods Human Nutrition* 70: 357-364.
- Jordan K.N., Cogan T.M. 1999. Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology* 29: 136-140.
- López Camelo A.F. 2003. Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Boletín de servicios agrícolas de la FAO.151.
- Mendoza-Corvis F.A., Hernández E.J., Ruiz L.E. 2015. Efecto del Escaldado sobre el Color y Cinética de Degradación Térmica de la Vitamina C de la Pulpa de Mango de Hilacha (*Mangifera indica* var Magdalena River). *Información Tecnológica* 26: 54-60.
- Mensor L.L., Boylan F., Leitao G., Guimaraes-Leitão, S. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research* 15: 127-30.
- Meral R., Sait Dog I. 2013. Grape seed as a functional food ingredient in bread-making. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 64: 372-379.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1996, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-120-SSA1-1996: Bienes y servicios, prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los estados unidos mexicanos. México D.F.
- Pinelo M., Rubilar M., Sineiro J., Núñez M. 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* 85: 267-273.
- Robles-Flores G.C. 2015. Secado por aspersión de leche de soya adicionada con *Lactobacillus plantarum* e inulina. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.
- Seyedain-Ardabili M., Sharifan A., Ghiassi Tarzi B. 2016. The Production of Synbiotic Bread by Microencapsulation. *Food Technology and Biotechnology* 54: 52-59.
- Singleton V., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology* 299C: 152-178.
- Valenzuela, A. 2014. Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación?. *Nutricion chilena. Revista Chilena de Nutrición* 41: 198-204.
- Verma A.R., Vijayakumar M., Mathela C.S., Rao C.V. 2009. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chemistry and Toxicology* 47: 2196-2201.

